



Tesis Doctoral

Alternativa agroecológica mediante el uso de hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga en granos almacenados

Ing. Agrónoma Anahi Musso

Directora: Dra. Claudia Cristina López Lastra

Codirectora: Ing. Agrónoma Susana Beatriz Padín

Codirector: Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

Universidad Nacional de La Plata

- 2023 -

A mis hermanas: Eli y Mary, por su amor incondicional

Agradecimientos

Quiero agradecer primeramente a mis directores, Dra. Claudia Lopez Lastra, Ing. Agrónoma Susana Beatriz Padín y Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida, por la confianza y las oportunidades que me dieron durante el desarrollo de la tesis, por motivarme y alentarme para crecer en mi formación profesional y en la especialidad de la investigación.

A la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, que me brindó la posibilidad de realizar mis estudios de grado y de posgrado.

A la Comisión de Investigación Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el apoyo económico mediante becas y subsidios de investigación, con los cuales pude llevar a cabo mi trabajo de tesis.

Al Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), por brindar un lugar de trabajo y poner a mi disposición lo que necesite para la realización de las tareas. Lo más importante: A los integrantes, con quienes compartí espacios de trabajo, muchas gracias por su colaboración y generosidad.

A la Cátedra de Terapéutica Vegetal y sus integrantes, me recibieron con amabilidad y predisposición para todo lo que necesite. Gracias por el apoyo y ayuda. En mi corazón quedan grabados los buenos momentos compartidos con Ceci.

Al Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI) y a las autoridades, por abrirme las puertas del laboratorio y permitirme la utilización de las instalaciones en los primeros años de tesis, por su amabilidad y calidez. Especialmente a Gustavo Dal Bello, quien me inició en este camino como director de Beca de Estudio, gracias por la oportunidad.

También quiero agradecer de manera especial a mis compañeros del Laboratorio de Hongos Entomopatógenos del CEPAVE que me acompañaron durante todos estos años: Romi, Ale, Mari F., Mari M., Eli, Cele, Byron, Manu, July, por las palabras de aliento, por cada consejo y, sobre todo, por esos buenos momentos que hemos pasado.

A la Lic. Graciela Minardi por su asesoramiento en el análisis estadístico, por la paciencia en las innumerables horas de trabajo con el programa R. Igualmente, a Luis Giambelluca, Personal Técnico del CEPAVE, por su ayuda y dedicación en la obtención de las fotografías.

A las Dras. Andrea Nesci y Paula Barra, de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico- Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto, por recibirme y ayudarme en la pasantía de formación académica en el laboratorio de Microbiología e Inmunología.

A todos los integrantes de la Unidad Laboratorio de Referencia (ULR) del Instituto Biológico ubicado en Campinas (San Pablo, Brasil), por darme la enorme posibilidad de realizar una estadía de formación, por la ayuda y acompañamiento en la

obtención de parte de los resultados de esta tesis. Especialmente a los chicos del laboratorio y del alojamiento por su amabilidad y calidez.

A las chicas, Barbi, Anto, Eli y Yani, por su amistad, sus consejos y por saber transitar este camino juntas.

A Gior, amiga de la infancia, quien colaboró en la revisión del inglés. Gracias por ser una gran compañera.

A los colegas de Agronomía y a sus hermanos, que hoy ya son amigos, por todo el cariño, los consejos y por saber comprender mis ausencias.

A mis amigas Vicky y Noe, por su hermosa energía y por cada palabra de aliento a través de cada mensaje o llamada.

A mis papás, que desde la distancia me apoyaron en todas mis decisiones siendo mi sostén y mi motor. Gracias a ellos, he llegado hasta acá, sus valores son mi bandera.

A mis hermanas, por ser mis pilares incondicionales y por su amor. Me escucharon y abrazaron cuando hacía falta y me apoyaron desde siempre. Tienen un lugar muy especial en todos mis logros.

A Jona, compañero que ha sabido siempre compartir mi felicidad y empujar en aquellos momentos difíciles. Gracias por la paciencia y afecto a lo largo de toda la tesis.

Y aquellos que desde su lugar me acompañaron y ayudaron cuando los necesite. A todos ellos, GRACIAS.

Publicaciones derivadas de la tesis

Revistas

- **Musso, A.**, Lopez Lastra, C.C., Padin, S.B., Minardi, G.M., & Marcondes Almeida, J.E. 2023. "Effects of the combination of phytosanitary products and entomopathogenic fungi for the control of insect pests". *Acta Agronómica*. 71(2). <https://doi.org/10.15446/acag.v71n2.97313>
- **Musso, A.**, Marcondes de Almeida, J.E., Padín, S., Ordoqui, E., & Lopez Lastra, C.C. 2020. "Efficacy of entomopathogenic fungi against *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae) under laboratory conditions". *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo*. Argentina, 52(2), 317-324. ISSN on line: 1853-8665. <http://revistas.uncu.edu.ar/ojs/index.php/RFCFA/article/view/2829>
- **Musso, A.**, Padín, S., & Dal Bello, G. 2017. "Control de insectos en granos almacenados con hongos entomopatógenos". *Revista Electrónica: Investigación Joven*, Volumen 04 – Número 02. ISSN 2314-3991.

Congresos/ Jornadas

- **Musso A.**, Padin, S.B., & López Lastra, C.C. 2018. "Evaluation of pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Bals-Crivelli) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) against *Rhyzopertha dominica* Fabricius (Coleoptera: Bostrichidae) in stored grains." III *Congreso Paranaense de Microbiología*. Expositor (López Lastra C.C.). 12 a 14 de septiembre, Londrina, Paraná.
- **Musso A.**, Padín, S., Falvo, M., Ordoqui, E., Minardi G., & López Lastra, C.C. 2018. "Evaluación de la patogenicidad de aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin sobre *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) en granos almacenados". IV *Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental*. Expositor (Poster). 11, 12 y 13 de abril, Mar del Plata. Libro de resúmenes: POSTER B26.

- **Musso A.**, Dal Bello, G., & Padín, S. 2017. “Control de insectos en granos almacenados con hongos entomopatógenos”. II *Jornada Jóvenes Investigadores*. Expositor (Ponencia). 13 de junio, FCsAyF, La Plata, Buenos Aires.
- **Musso A.**, Dal Bello G., & Padín, S. 2016. “Control de insectos en granos almacenados con Hongos Entomopatógenos”. Tercer *Congreso Internacional Científico Tecnológico – CIC*, Bs As. Expositor (Poster). 1 de septiembre, La Plata, Buenos Aires.

Índice

Resumen	XII
Abstract	XV

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL: INSECTOS PLAGA EN GRANOS ALMACENADOS, HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y PRODUCTOS FITOSANITARIOS

18

1. Generalidades acerca de los insectos plaga en granos almacenados	19
Insectos plaga en granos almacenados sobre los que se desarrollaron los bioensayos	20
- <i>Rhyzopertha dominica</i> (Fabricius, 1792).....	21
- <i>Sitophilus oryzae</i> (Linnaeus, 1763).....	25
- <i>Oryzaephilus surinamensis</i> (Linnaeus 1758)	26
- <i>Tribolium castaneum</i> (Herbst 1797).....	27
Importancia económica de los insectos plaga en granos almacenados	28
Métodos de control de los insectos plaga en granos almacenados.....	30
2. Generalidades acerca de los hongos entomopatógenos (HE)	32
Características del Phylum Ascomycota	34
Clasificación taxonómica y morfología de los hongos entomopatógenos sobre los que se desarrollaron los bioensayos.....	34
- <i>Beauveria bassiana</i>	35
- <i>Metarhizium anisopliae</i>	36
- <i>Cordyceps fumosorosea</i>	37
- <i>Purpureocillium lilacinum</i>	38
Ciclo de vida de los hongos entomopatógenos	39
Factores que inciden en las infecciones fúngicas	41
3. Manejo de insectos plaga con productos fitosanitarios (PF).....	41
Características de los productos fitosanitarios	43
Compatibilidad entre control químico y biológico sobre insectos plaga	44

Objetivo General	46
Objetivos Particulares	46
Hipótesis	46

CAPÍTULO II: SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DE ADULTOS DE *RHYZOPERTHA DOMINICA*

47	47
Introducción	48
Materiales y métodos	49
1. Origen y mantenimiento de la colonia de <i>Rhyzopertha dominica</i>	49
2. Origen de los hongos entomopatógenos	50
2.1. Aislamientos seleccionados de la Colección de Hongos Entomopatógenos del CEPAVE	50
2.2. Aislamientos realizados mediante el uso de insectos “cebo”	52
3. Selección del aislamiento para el control de adultos de <i>Rhyzopertha dominica</i>	55
3.1. Ensayo preliminar para la selección de los aislamientos	55
3.2. Evaluación de la mortalidad de <i>Rhyzopertha dominica</i> ocasionada por distintos aislamientos fúngicos	56
3.2.1. Preparación del inóculo y evaluación de la viabilidad	57
3.2.2. Bioensayos	57
3.2.3. Variables registradas y análisis de datos	59
3.3. Estimación de la virulencia	60
3.3.1. Bioensayos	60
3.3.2. Variables registradas y análisis de datos	60
Resultados	61
1. Selección del aislamiento para el control de adultos de <i>Rhyzopertha dominica</i>	61
1.1. Ensayo preliminar para la selección de los aislamientos	61
1.2. Evaluación de la mortalidad de <i>Rhyzopertha dominica</i> ocasionada por distintos aislamientos fúngicos	61
1.3. Estimación de la virulencia	64
Discusión	64

CAPÍTULO III: COMPATIBILIDAD DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS CON PRODUCTOS FITOSANITARIOS	67
Introducción	68
Materiales y métodos.....	69
1. Evaluación de la compatibilidad entre hongos entomopatógenos y los productos fitosanitarios	69
1.1. Hongos entomopatógenos <i>in vitro</i>	69
1.2. Productos fitosanitarios.....	70
1.3. Evaluación de la germinación: Prueba de caldo.....	71
1.4. Evaluación de la compatibilidad: Índice Biológico (IB).....	71
1.5. Evaluación de las unidades formadoras de colonias (UFCs): Compatibilidad de HE y PF sobre granos de trigo.....	73
1.6. Variables registradas y análisis de datos.....	74
2. Evaluación de la compatibilidad entre el aislamiento seleccionado y los productos fitosanitarios	75
2.1. Productos fitosanitarios.....	75
2.2. Evaluación de la germinación: Prueba de caldo.....	75
2.3. Evaluación de las unidades formadoras de colonias (UFCs): Compatibilidad entre el aislamiento seleccionado y los PF sobre granos de trigo.....	76
2.4. Variables registradas y análisis de datos.....	77
Resultados.....	77
1. Evaluación de la compatibilidad entre hongos entomopatógenos y los productos fitosanitarios	77
1.1. Evaluación de la germinación: Prueba de caldo.....	77
1.2. Evaluación de la compatibilidad: Índice Biológico (IB).....	78
1.3. Evaluación de las unidades formadoras de colonias (UFCs): Compatibilidad de HE y PF sobre granos de trigo.....	83
2. Evaluación de la compatibilidad entre el aislamiento seleccionado y los productos fitosanitarios	86
Discusión	88

CAPÍTULO IV: PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE *BEAUVERIA BASSIANA* COMBINADO CON PRODUCTOS FITOSANITARIOS SOBRE UN RANGO DE HOSPEDADORES 91

Introducción 92

Materiales y métodos 94

1. Origen de las colonias 94

2. Origen del hongo entomopatógeno 94

2.1.Productos fitosanitarios 95

2.1.1. Bioensayos de patogenicidad y virulencia de *B. bassiana* s.l. combinado con PF en un rango de hospedadores 95

Resultados 97

1. Bioensayos de patogenicidad y virulencia de *B. bassiana* s.l. combinado con PF en un rango de hospedadores 97

2. Determinación de las interacciones aditivas, sinérgicas o antagónicas 99

Discusión 102

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS 105

Conclusiones generales 106

Perspectivas futuras 107

BIBLIOGRAFÍA 108

ANEXO 127

1. Medios de cultivo 128

Papa Dextrosa Agar (PDA) o Agar Papa Glucosa (APG) 128

Sabouraud Dextrosa Agar (SDAY) 128

Medio selectivo 128

Medio agar-agua 129

2. Antibióticos 129

Cloranfenicol 129

Pentabiótico ®	129
3. Colorantes	129
Azul de algodón	129
4. Dietas para la cría de los insectos plaga.....	130

Resumen

Los insectos plaga, principalmente del Orden Coleoptera, causan importantes pérdidas económicas en el almacenamiento de granos. Los insectos de infestación primaria son *Sitophilus oryzae* (Linnaeus, 1763) y *Rhyzopertha dominica* (Fabricius, 1792). Los de infestación secundaria son *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus, 1758) y *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797). Una estrategia de manejo integrado de plagas (MIP) es el control biológico mediante el uso de hongos entomopatógenos (HE) combinados con los productos fitosanitarios (PF).

En el primer experimento, se evaluó la patogenicidad y la virulencia de 10 aislamientos de HE contra adultos de *R. dominica*. Los HE fueron obtenidos de la Colección de Hongos Entomopatógenos del CEPAVE (CONICET-UNLP-Asociado a CICPBA): *Beauveria bassiana* sensu lato (s.l.) CEP 545, CEP 560 y CEP 567; *Metarhizium robertsii* s.l. CEP 381 y CEP 401; *M. anisopliae* s.l. CEP 615, CEP 616 y CEP 617 y *Cordyceps fumosorosea* sensu stricto (s.str.) CEP 303 y CEP 309. Los insectos fueron pulverizados con una suspensión de conidios (0,1 mL, 2×10^8 conidios/mL). Se registró la mortalidad de los insectos durante 15 días. El aislamiento *B. bassiana* s.l. CEP 545 ocasionó la mayor eficiencia contra *R. dominica*. El aislamiento causó el 65% de mortalidad, un tiempo de supervivencia mediana (TSM) de 8 días y una concentración letal media (CL_{50}) de $9,5 \times 10^9$ conidios/mL.

A continuación, se determinó la compatibilidad de los HE con los PF. El estudio se realizó en la Unidad Laboratorio de Referencia (ULR) del Instituto Biológico, Brasil. Los HE se obtuvieron de la Colección de Hongos Entomopatógenos de la ULR: *B. bassiana* s.l. IBCB 66, *M. anisopliae* s.l. IBCB 425 y *Purpureocillium lilacinum* IBCB 130 s.l. Los PF utilizados fueron: Pirimifós metil (PM), Lambdacialotrina (L) y su combinación. Los tratamientos de los PF fueron: PM6mL/L, PM10mL/L, PM16mL/L, PM8mL+L2mL/L y L7mL/L. En la prueba de caldo, se realizó la mezcla por separado de cada tratamiento de PF con los tres aislamientos. Se calculó el porcentaje de

germinación de conidios. El tratamiento PM16mL/L causó la disminución de la germinación de los tres aislamientos. Luego, el efecto entre los HE y el PF se evaluó basado en el Índice Biológico (IB), el cual relaciona el porcentaje del crecimiento vegetativo de la colonia (CV), el porcentaje de esporulación (ESP) y porcentaje de germinación (GER). El tratamiento L7mL/L fue tóxico para *M. anisopliae* IBCB 425 s.l. y *P. lilacinum* s.l. IBCB 130, y moderadamente tóxico para *B. bassiana* s.l. IBCB 66. El CV y ESP fue reducido sin interferir en el GER de los tres aislamientos. Además, en la evaluación de las unidades formadoras de colonia (UFCs), los tres aislamientos se inocularon por separado en la superficie de granos de trigo. Después de una hora, se aplicó los tratamientos de PF. El tiempo de persistencia del HE sobre los granos fue evaluado a las 24, 48 y 72 h. Los resultados mostraron que la variabilidad de UFCs se debió al factor aislamiento. *Metarhizium anisopliae* s.l. IBCB 425 presentó menor número de UFCs con respecto a *B. bassiana* s.l. IBCB 66 y *P. lilacinum* s.l. IBCB 130. En cambio, el factor tiempo no afectó a las UFCs.

A partir de los ensayos preliminares realizados en la ULR, se evaluó la compatibilidad con el aislamiento seleccionado: *B. bassiana* s.l. CEP 545. Los tratamientos de PF fueron: PM6mL/L, PM3mL/L, PM1.8mL/L, PM8mL+L2mL/L, PM4mL+L1mL/L y PM2.4mL+L0.6mL/L. En la prueba de caldo, cada tratamiento de PF fue mezclado con HE. Al igual que en los ensayos anteriores, el GER disminuyó con el aumento de la concentración de los PF. Con respecto a las UFCs, el tiempo de persistencia del HE fue medido a las 24 y 48 h. Los resultados mostraron que la variabilidad de UFCs se debe al factor tratamiento de PF.

Se evaluó la patogenicidad y la virulencia del HE seleccionado combinado con PF en concentraciones subletales sobre un rango de hospedadores: *R. dominica*, *S. oryzae*, *O. surinamensis* y *T. castaneum*. Los tratamientos de PF fueron: PM6mL/L, PM3mL/L, PM1.8mL/L, PM8mL+L2mL/L, PM4mL+L1mL/L y PM2.4mL+L0.6mL/L. Los insectos se pulverizaron con el HE, los tratamientos de PF y su combinación. Se registró la mortalidad durante 20 días. La mortalidad fue de 23% a 80,3% para *R.*

dominica, de 38% a 100% para *S. oryzae*, de 33,3% a 100% para *O. surinamensis* y de 24% a 89,3% para *T. castaneum*. La especie más susceptible a la aplicación del HE sólo fue *R. dominica*. Sin embargo, cuando se le aplicó los tratamientos PF en combinación con HE se observó menor susceptibilidad. El TSM varió de 3 a 12 días. Las interacciones entre HE y PF consistieron principalmente en efectos antagónicos y aditivos, sólo se observó sinergismo entre *B. bassiana* s.l. + PM2.4mL+L0.6mL/L.

En conclusión, *B. bassiana* s.l. CEP 545 combinado con PF en concentraciones subletales causó la mortalidad de *R. dominica*, *S. oryzae*, *O. surinamensis* y *T. castaneum*. La combinación más efectiva para el control de *R. dominica* estuvo dada por el tratamiento *B. bassiana* + PM2.4mL+L0.6mL/L, el cual combina el HE con pirimifós metil y lambdacialotrina en concentraciones subletales. Por lo tanto, este estudio sugiere que las aplicaciones combinadas de HE y PF sería una potencial alternativa para el control de insectos plaga en granos almacenados.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, producto fitosanitario, granos almacenados, *Rhyzopertha dominica*, compatibilidad, manejo integrado de plagas.

Abstract

Insect pests, mainly from the Order Coleoptera, cause important economic losses in stored grains. Insect primary infestation are *Sitophilus oryzae* (Linnaeus, 1763) and *Rhyzopertha dominica* (Fabricius, 1792). Secondary infestation are *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus, 1758) and *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797). A strategy of integrated pest management (IPM) is the biological control using entomopathogenic fungi (EF) combined with phytosanitary products (PP).

In the first experiment, pathogenicity and virulence of 10 EF isolates were evaluated against adults of *R. dominica*. The EF were obtained from the Entomopathogenic Fungi Collection (CONICET-UNLP-Associated with CICPBA) of CEPAVE: *Beauveria bassiana* sensu lato (s.l.) CEP 545, CEP 560, and CEP 567; *Metarhizium robertsii* s.l. CEP 381 and CEP 401; *M. anisopliae* s.l. CEP 615, CEP 616, and CEP 617, and *Cordyceps fumosorosea* sensu stricto (s.str.) CEP 303 and CEP 309. Insects were sprayed with a conidial suspension (0.1 mL, 2×10^8 conidia/mL). Insect mortality was recorded for 15 days. The isolate *B. bassiana* s.l. CEP 545 showed the greatest efficiency against *R. dominica*. This isolate caused 65% mortality, a median survival time (MST) of 8 days, and a median lethal concentration (LC_{50}) of 9.5×10^9 conidia/mL.

Secondly, the compatibility of EF with PP was determined. The study was carried out at the Reference Laboratory Unit (RLU) of the Instituto Biológico, Brazil. The EF were obtained from the Entomopathogenic Fungi Collection from the RLU: *B. bassiana* s.l. IBCB 66, *M. anisopliae* s.l. IBCB 425, and *Purpureocillium lilacinum* IBCB 130 s.l. The PP used were: Pirimiphos methyl (PM), Lambdacyalothrin (L), and their combination. The PP treatments were: PM6mL/L, PM10mL/L, PM16mL/L, PM8mL+L2mL/L, and L7mL/L. In the broth assay, the mixture of each PP treatment with each of the three isolates was carried out separately. The germination percentage of conidia was calculated. The PM16mL/L treatment caused a decrease in the

germination of the three isolates. Then, the effect between EF and PP was evaluated based on the Biological Index (BI), which relates the percentage of vegetative growth (VG), the percentage of sporulation (ESP), and the germination percentage (GER). Treatment with L7mL/L was toxic to *M. anisopliae* IBCB 425 s.l. and *P. lilacinum* s.l. IBCB 130, and moderately toxic to *B. bassiana* s.l. IBCB 66. The CV and ESP were reduced without interfering with the GER of the three isolates. Furthermore, in the evaluation of colony forming units (CFUs), the three isolates were inoculated separately on the surface of wheat grains. After an hour, the PP treatments were sprayed. The persistence time of EF on the grains was evaluated at 24, 48, and 72 h. The results showed that the variability of CFUs is due to the isolation factor. *Metarhizium anisopliae* s.l. IBCB 425 showed a lower number of CFUs compared to *B. bassiana* s.l. IBCB 66 and *P. lilacinum* s.l. IBCB 130. However, the time factor did not affect the CFUs.


Based on the preliminary assays carried out at the RLU, the compatibility with the selected isolate: *B. bassiana* s.l. CEP 545 was evaluated. The PP treatments were: PM6mL/L, PM3mL/L, PM1.8mL/L, PM8mL+L2mL/L, PM4mL+L1mL/L, and PM2.4mL+L0.6mL/L. In the broth assay, each PP treatment was mixed with EF. As in the previous assays, the GER decreased with the increasing PP concentration. With respect to the CFUs, the persistence time of EF was evaluated at 24 and 48 h. The results showed that the variability of CFUs is due to the PP treatment factor.

The pathogenicity and virulence of the selected EF combined with sublethal concentrations of PP were evaluated against the host range: *R. dominica*, *S. oryzae*, *O. surinamensis*, and *T. castaneum*. The PF treatments were: PM6mL/L, PM3mL/L, PM1.8mL/L, PM8mL+L2mL/L, PM4mL+L1mL/L, and PM2.4mL+L0.6mL/L. The insects were sprayed with the EF, PP treatments, and their combination. Mortality was recorded for 20 days. The mortality was 23% - 80.3% for *R. dominica*, 38% - 100% for *S. oryzae*, 33.3% - 100% for *O. surinamensis*, and 24% - 89.3% for *T. castaneum*. The most susceptible species to EF alone was *R. dominica*. However, when PP treatments

were applied in combination with EF, a lower susceptibility was observed. The TSM varied from 3 to 12 days. Interactions between EF and PP consisted mainly of antagonistic and additive effects, synergism was only observed between *B. bassiana* s.l. and PM2.4mL+L0.6mL/L.

In conclusion, *B. bassiana* s.l. CEP 545 combined with sublethal concentrations of PP caused mortality of *R. dominica*, *S. oryzae*, *O. surinamensis*, and *T. castaneum*. The most effective combination for the control of *R. dominica* was given by the treatment *B. bassiana* s.l. CEP 545 + PM2.4mL+L0.6mL/L, which combines EF with pirimiphos methyl and lambda-cyhalothrin in sublethal concentrations. Therefore, this study suggests that combined applications of EF and PP would be a potential alternative for the control of insect pests in stored grains.

Keywords: *Beauveria bassiana*, phytosanitary product, stored grains, *Rhyzopertha dominica*, compatibility, integrated pest management.



**Capítulo I: Introducción general: Insectos
plaga en granos almacenados, hongos
entomopatógenos y productos fitosanitarios**

1. Generalidades acerca de los insectos plaga en granos almacenados

El almacenamiento de la postcosecha consiste en acopiar los granos, en condiciones de temperatura y humedad determinadas. Se realiza para evitar pérdidas de la producción, preservando los granos por períodos más o menos prolongados sin que se deteriore la calidad y la inocuidad con que han sido cosechados (Nayak y Daghli, 2018). Los productores pueden almacenar los granos para la siembra futura, alimentación de animales o para la venta en una fecha posterior. En cambio, los acopiadores, manipulan la mercadería, garantizando la disponibilidad continua, periódica y de consumo permanente e ininterrumpido (Abadia y Bartosik, 2013).

El grano de cereal o cariósipide consta de tres partes: el pericarpio que comprende de 7 a 10%; el endospermo que abarca el 80 a 85%; y el germen/embrión que ocupa el 3 a 8%. A su vez, estas partes están normalmente protegidas con una cáscara, cuya proporción varía según la especie. Los insectos tienen el hábito de alimentarse del embrión, destruyendo el poder germinativo, como así también del endospermo, lo que provoca la reducción total o parcial del vigor. Esto ocasiona una disminución del peso del grano, y del contenido de proteína, lo que repercute directamente en la calidad general del producto. Los granos dañados por insectos se caracterizan por presentar agujeros de forma irregular (~1 mm de diámetro) y de profundidad creciente (Breese, 1960).

Durante este período, debido a que las condiciones de almacenamiento son también adecuadas para el desarrollo de ciertas plagas que viven en condiciones similares en sus hábitats naturales, los granos son susceptibles a la infestación de insectos plaga y/o enfermedades (FAO, 1983). Como consecuencia, una de las pérdidas económicas más importantes que sufren estos productos es producida principalmente por los insectos pertenecientes al Orden Coleoptera (Potter, 1935).

Los insectos que invaden los granos almacenados se dividen en primarios y secundarios, en base a su capacidad para causar daño. Los primarios son considerados como las plagas más destructivas afectando los granos enteros y sanos. Están representados por *Sitophilus oryzae* Linnaeus, *S. granarius* Linnaeus, *S. zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), *Rhizopertha dominica* Fabricius, (Coleoptera: Bostrichidae) y *Sitotroga cerealella* Olivier (Lepidoptera: Gelechiidae), entre otros. Los insectos de infestación secundaria son los que no consiguen invadir los granos enteros y se alimentan de los quebrados, de las partículas o el polvo que queda después del ataque de los primarios. Entre ellos se encuentran los coleópteros *Tribolium castaneum* Herbst y *T. confusum* Jaquelin Du Val (Tenebrionidae), *Cryptolestes ferrugineus* Stephens (Laemophloeidae), *Oryzaephilus surinamensis* Linnaeus (Silvanidae), *Prostephanus truncatus* Horn (Bostrichidae), *Tenebrio molitor* Linnaeus (Tenebrionidae), *Trogoderma granarium* Everts (Dermestidae) y *Lasioderma serricorne* Fabricius (Anobiidae) (FAO, 1983).

Insectos plaga en granos almacenados sobre los que se desarrollaron los bioensayos

Se utilizaron cuatro especies pertenecientes al Orden Coleoptera: *R. dominica*, *S. oryzae*, *O. surinamensis* y *T. castaneum*, consideradas insectos plaga y a su vez, aquellas encontradas de manera frecuente en la postcosecha. A continuación, se describen cada una de ellas.

***Rhyzopertha dominica* Fabricius**

Taxonomía, origen y distribución

Rhyzopertha dominica pertenece al Orden Coleoptera, Familia Bostrichidae, Subfamilia Dinoderinae. Es la única especie del género. La subfamilia también incluye otros cinco géneros: *Dinoderus* Stephens, *Prostephanus* Lesne, *Rhizophorthodes* Lesne, *Dinoderopsis* Lesne y *Stephanopachys* Waterhouse (Fisher, 1950).

Fabricius describió por primera vez a *R. dominica* en 1792 bajo el nombre de *Synodendron dominicum* a partir de especímenes presentes en nueces y raíces importadas de la India (Chittenden, 1911); posteriormente, en 1896, Lesne le asignó el nombre actual.

El origen de *R. dominica* no se conoce con certeza, pero la comunidad científica ha consensuado que fue en India, debido a que en la región existe gran cantidad de individuos de la familia Bostrichidae (Potter, 1935).

Rhyzopertha dominica está ampliamente distribuida y firmemente establecida en todo el mundo, en regiones del trópico más cálidas agrupadas entre la latitud 40° N y la latitud 40° S del Ecuador (Potter, 1935). También se encuentra en países templados, ya sea por su capacidad de vuelo prolongado o durante el transporte comercial internacional del grano. Esta especie es conocida vulgarmente como "barrenador del grano" debido a las tendencias barrenadoras de los escarabajos (Chittenden, 1911). Potter (1935) también proporciona otros nombres como "taladrillo de los granos" o "gorgojo de trigo australiano", que se debe posiblemente a las importaciones de trigo infestado desde Australia a los EE. UU. durante y después de la Primera Guerra Mundial (Doane, 1919).

Características generales, ciclo de vida y comportamiento

Rhyzopertha dominica es un insecto holometábolo, es decir, presenta una metamorfosis completa. El ciclo de vida incluye cuatro estados: huevo, larva, pupa y adulto. Por lo general, una hembra coloca entre 300 y 400 huevos a lo largo de su

vida, de los cuales aproximadamente el 80% son fértiles (Schwardt, 1933; Howe, 1950). El huevo es ovalado con los extremos suavemente redondeados, uno de ellos más angosto que el otro, midiendo aproximadamente 0,5-0,6 mm de largo y 0,2-0,3 mm de diámetro. Se depositan individualmente o en pequeños grupos (hasta 30) ubicados entre o sobre los granos (Edde, 2012). El huevo es al principio de color blanquecino con una apariencia cerosa, pasando con el tiempo a rosado opaco. Las puntas oxidadas oscuras de las mandíbulas y la espina abdominal de la larva son visibles a través del corion al final del desarrollo (Potter, 1935). El período de incubación varía de 5 a 11 días dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad (Edde, 2012).

Rhyzopertha dominica tiene en promedio cuatro estadios larvarios (entre cinco y siete en condiciones óptimas) (Potter, 1935). Las larvas del primer estadio, con piezas bucales mandibulares, se activan de inmediato, moviéndose rápidamente para alimentarse (Schwardt, 1933). El primer estadio, de 0,78 mm de largo y 0,13 mm de ancho en la cápsula de la cabeza, y segundo, de 1,1 mm de largo y 0,17 mm de ancho en la cápsula de la cabeza, son campodeiforme. Los estadios larvales tercero y cuarto son curvos y de forma escarabeiforme, y en gran medida inmóviles. La longitud corporal promedio y el diámetro de la cápsula cefálica del tercer estadio son 2,04 mm de largo y 0,26 mm, respectivamente (Potter, 1935). En el cuarto estadio, la región ventral es blanquecina, la cabeza es castaño claro y el color de las mandíbulas es marrón oscuro o casi negro (Winterbottom, 1922). La longitud del cuarto estadio maduro es de aproximadamente 3,2 mm y la cabeza tiene aproximadamente 0,4 mm de diámetro (Potter, 1935). La duración del estado de prepupa es de aproximadamente 1,5 días (Potter, 1935). El desarrollo larvario se completa en el interior del grano, donde luego empupa y emerge como adulto. La entrada de la larva al grano generalmente se debe a un daño previo producido por un adulto. La duración del estado de larva es de aproximadamente 16 días en condiciones óptimas (34°C y 70% de humedad relativa) (Birch, 1945a; Birch, 1945b). En el estado de prepupa, el

insecto no se alimenta, carece de movilidad y se endereza en su forma cilíndrica más alargada (3,2 mm de largo y el diámetro de la cápsula de la cabeza es de 0,5 mm). El insecto permanece casi inactivo y sólo es capaz de retorcerse de forma limitada.

El estado de pupa sucede en la celda excavada por la larva dentro del grano. Las pupas son generalmente inmóviles, su movimiento corporal se limita a los segmentos abdominales. Las pupas jóvenes son de color blanquecino, pero más tarde, se deposita un pigmento marrón en los ojos y en la boca (Winterbottom, 1922). Las longitudes promedio del cuerpo y la cápsula de la cabeza son 3,9 y 0,6 mm respectivamente. La tasa de desarrollo es directamente proporcional a la temperatura. En condiciones óptimas, este estado tiene una duración de 4 días (Birch, 1945a; Birch, 1945b; Birch, 1953). Durante este estado, es posible distinguir entre los sexos. El dimorfismo sexual se muestra en la punta del abdomen. Los genitales de las hembras son divergentes, de tres segmentos y protuberantes, mientras que los de los machos son convergentes, de dos segmentos y protuberantes (Potter, 1935).

Los adultos recién formados emergen del grano al masticar a través de la capa exterior del mismo y pueden permanecer sin alimentarse de 3 a 5 días (Schwardt, 1933). La cabeza se mantiene debajo y oculta desde arriba por el protórax. La longevidad es de 3 a 6 meses (Edde, 2012). Estos insectos vuelan y los tiempos de vuelo están influenciados por las estaciones y la iluminación (Potter, 1935). La duración mínima del ciclo de vida desde la oviposición hasta la emergencia del adulto es de 25 días a 34°C y 70% de humedad relativa.

Daños

Entre los sustratos más utilizados por *R. dominica* como alimentos y recursos para la reproducción se incluyen los granos de la familia Poaceae (gramínea) (arroz, trigo, sorgo, avena, mijo, cebada) (Figura 1) y de Leguminosae (garbanzos, maní, frijoles), entre otros sustratos que contengan almidón. *Rhyzopertha dominica* alcanza su máximo éxito reproductivo en cereales secos, especialmente en los granos de trigo

(Edde, 2012). Además, puede invadir productos farmacéuticos almacenados, relleno de cuero, yeso de barro, materiales de embalaje hechos de madera, papel, libros encuadernados y corcho.



Figura 1: *Rhyzopertha dominica* alimentándose sobre y dentro del grano de cebada.

Las pérdidas causadas por *R. dominica* son difíciles de determinar (Hodges *et al.*, 2011) dado que este insecto, se encuentra, generalmente, asociado a poblaciones de otras especies de insectos plaga, ya sean primarias o secundarias. Tiene la capacidad de moverse entre la masa de grano y el comportamiento críptico dificulta la detección temprana en los granos. Asimismo, posee una amplia tolerancia a las diferentes condiciones ambientales (temperatura y humedad relativa) y alta fecundidad, por lo tanto, pueden aumentar rápidamente el tamaño de la población (Cox y Collins, 2002; Rees, 2004).

Rhyzopertha dominica es una de las plagas más destructivas de los granos almacenados y de distribución mundial, considerada como el insecto más difícil de controlar debido a que se desarrolla dentro de los granos (Potter, 1935). Es por ello, que se utilizó como insecto blanco en los bioensayos del Capítulo II y IV.

***Sitophilus oryzae* Linnaeus**

Taxonomía, origen y distribución

Sitophilus oryzae pertenece al Orden Coleoptera, Familia Curculionidae, Subfamilia Dryophthorinae. Incluye otros géneros: *S. zeamais*, *S. granarius*, entre otros (Rees, 2004). Esta especie es conocida vulgarmente como “gorgojo del arroz”, “gorgojo del trigo” o “gorgojo de los cereales”. Es originario de la India. Se encuentran en un amplio rango de hábitats, la mayoría son fitófagos y muchas especies son importantes plagas de la agricultura, horticultura y forestales (Reichmuth *et al.*, 2007).

Características generales, ciclo de vida y comportamiento

El adulto es de color pardo oscuro o negro, mide entre 2,5 y 4 mm. Posee 4 manchas rojizas o amarillentas sobre el dorso, una en la base y otra en la extremidad de cada élitro, los cuales son funcionales (Reichmuth *et al.*, 2007).

La hembra coloca entre 300 y 400 huevos a lo largo de toda su vida. El grano es perforado con su aparato bucal atravesando el pericarpio, realiza una pequeña camarita donde deposita un huevo. Luego, obtura la entrada con una sustancia mucilaginoso que se torna imperceptible. La larva ápoda robusta de color blanco nacarado se alimenta del contenido del grano. Aproximadamente a la semana da lugar al adulto, el cual permanece dentro del grano hasta que sus tegumentos se endurecen y toman color. Rápidamente, el adulto sale al exterior mediante una perforación efectuada con el rostro (Reichmuth *et al.*, 2007).

Los adultos pueden volar desde los depósitos y sus alrededores hacia los cultivos. La temperatura óptima de desarrollo es de 26 a 30°C y la humedad relativa (HR) de 70%. En estas condiciones, su ciclo biológico puede durar de 26 a 30 días (Rees, 2004).

Daños

El daño provocado por *S. oryzae* favorece el ataque de plagas secundarias y el desarrollo de hongos por el aumento de temperatura y humedad dentro del silo. Los granos atacados presentan la superficie perforada y el interior vacío. Esta especie ataca al arroz, trigo, maíz, avena, mijo, cebada y centeno. También se los puede encontrar sobre harinas, galletitas y pan. Las larvas, además, pueden desarrollarse en fideos, arvejas, castañas y semillas de algodón (Rees, 2004).

***Oryzaephilus surinamensis* Linnaeus**

Taxonomía, origen y distribución

Oryzaephilus surinamensis pertenece al Orden Coleoptera, Familia Cucujidae. Conocida vulgarmente como “carcoma dentada” o “gorgojo dentado de los granos”. Es una especie cosmopolita, y asociada a las viviendas humanas. Su origen es posiblemente asiático. Su denominación se debe a que Linneo la describió de ejemplares recolectados en Surinam. Se lo encuentra en regiones tropicales y subtropicales; tolera las bajas temperaturas de los climas templados (Reichmuth *et al.*, 2007).

Características generales, ciclo de vida y comportamiento

El adulto presenta el cuerpo alargado, plano, de color castaño oscuro y de unos 2,5 a 3,5 mm de longitud. La cabeza es más ancha en la base y está bien diferenciada del protórax; los ojos son pequeños y presentan antenas con 11 segmentos, terminadas en una masa. El protórax tiene seis dientes claramente visibles en sus bordes laterales y tres protuberancias en forma de lomo en la parte central. Los élitros cubren todo el abdomen, del cual son visibles ventralmente 5 segmentos (Reichmuth *et al.*, 2007).

La hembra coloca aproximadamente 300 huevos en un período de 10 semanas. Las larvas neonatas son delgadas, de color cremoso, con dos manchas ligeramente más oscuras en cada uno de los segmentos. La larva madura construye un capullo en el cual pasa al estado de pupa (Reichmuth *et al.*, 2007). El adulto no vuela y puede vivir hasta 3 años. Pueden desarrollarse a una temperatura de 16 a 37 °C y una HR de 10 a 90%. Su ciclo biológico es de 20 a 25 días a 30 °C y HR de 70 a 90% (Rees, 2004).

Daños

Tanto la larva como el adulto son capaces de dañar los productos almacenados con muy bajo contenido de humedad, especialmente aquellos que han permanecido mucho tiempo almacenados. Se alimenta de los granos de cereales y sus productos como trigo, maíz, arroz, cebada, sorgo, además de frutas secas, dátiles, higos, uvas, ciruelas, pasas, cacao, nueces, alimento para ganado y especias (Reichmuth *et al.*, 2007).

***Tribolium castaneum* Herbst**

Taxonomía y distribución

Tribolium castaneum pertenece al Orden Coleoptera, Familia Tenebrionidae. Esta especie es conocida vulgarmente como “tribolio castaño”. Se la encuentra en las regiones tropicales y subtropicales.

Características generales, ciclo de vida y comportamiento

Tribolium castaneum posee metamorfosis completa: huevo; larva, pupa y adulto. El adulto mide de 3 a 4 mm de longitud. El cuerpo es de un tono castaño rojizo brillante. Las antenas presentan los 3 últimos artejos marcadamente más gruesos (Reichmuth *et al.*, 2007).

La hembra ovipone aisladamente, en harinas y otros alimentos, de 500 a 900 huevos recubiertos de una sustancia pegajosa que le permite adherirse a los productos o envases de estos. Tras un breve período de incubación, de 5 a 12 días, nacen larvas delgadas, cilíndricas, amarillentas, con la cápsula cefálica y el dorso ligeramente rojizo. Empupan sin ninguna protección. El ciclo completo puede durar de 4 a 6 semanas. Los adultos por lo general viven un año, pero pueden llegar hasta 3 años (Reichmuth *et al.*, 2007).

Daños

Larvas y adultos se alimentan de granos partidos o dañados de cereales y legumbres. Se desarrollan muy bien en la harina, y cuando la infestación es importante, estas toman un fuerte olor y tornan de color pardo. Además, atacan a derivados de harinas, levaduras, especias, frutas secas y chocolate.

Importancia económica de los insectos plaga en granos almacenados

Desde la cosecha hasta el momento del procesamiento o uso final, todas las operaciones a las cuales se someten los granos corresponden a la “postcosecha”. En esta etapa, los productores y acopiadores, almacenan la producción en lugares estratégicamente seleccionados y en condiciones adecuadas de conservación, a fin de mantener en el tiempo la calidad y las propiedades intrínsecas de los granos y las semillas.

Según estimaciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), las pérdidas en la producción agrícola mundial causadas por diferentes plagas fluctúan entre 20% y 40%, y al menos el 10% de las cosechas son destruidas por roedores e insectos en sus lugares de almacenamiento. Su magnitud varía según la región, el año, el cultivo y el tipo de plaga como factor causal (http://www.eurosur.org/medio_ambiente/bif62.htm). En los países

desarrollados, las pérdidas por insectos varían de 5 a 10%, mientras que en países emergentes pueden alcanzar el 30% (Vilchez y Miller, 2006).

En la Argentina, existen escasos antecedentes que cuantifiquen las pérdidas en la etapa de postcosecha. Se estima que entre el 5 y 10% de la producción total se pierde por causa de los insectos (Casini, 2006; Casini y Santajuliana, s/f), lo cual equivale a la cantidad de granos necesaria para alimentar a 130 millones de personas anualmente (FAO, 1983), representando unos 22.000 millones de dólares que dejan de ingresar en el sistema económico (Bartosik, 2013).

El sector de postcosecha se ve condicionado por una fuerte presión de los consumidores por alimentos inocuos y producidos en forma sustentable (Bartosik, 2013). Es importante mantener la integridad del grano que llega al depósito, ya que aquellos que ingresan con impurezas, tierra y con daños físicos son los más susceptibles de ser invadidos por plagas en general (Casini y Santajuliana, s/f).

Controlar a las plagas es imprescindible no sólo por los daños directos que causan en los granos, sino también porque los estándares de comercialización argentinos prohíben la venta de mercaderías con insectos vivos. A raíz del ataque de insectos, se reduce la calidad, peso, valor comercial y el poder germinativo de las semillas (Stefanazzi *et al.*, 2006). El trigo pan se comercializa mediante la aplicación de la "Norma de Calidad para la Comercialización de Trigo Pan – NORMA XX TRIGO PAN" (Resolución de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos N°1.262/2004, modificada por otras dos Resoluciones: la 825/05 y la 603/06). La norma establece tres grados de trigo pan: 1 o "corrector", 2 y 3 que involucra el peso hectolítrico, materias extrañas, granos dañados, entre otras tolerancias; y a su vez establece que la mercadería debe estar totalmente libre de insectos y/o arácnidos vivos, de lo contrario se la considera fuera de estándar. Para la entrega de mercadería libre de insectos existen tres herramientas fundamentales: prevención, monitoreo y control (Bartosik, 2012).

Métodos de control de los insectos plaga en granos almacenados

Métodos físicos y mecánicos (Casini y Santajuliana, s/f)

- Calor. Aire caliente a alta velocidad (60°C - 3'). La alta velocidad que posee la masa de aire caliente hace que el grano quede suspendido, y de esta forma, se elimine a los insectos plaga.
- Frío. Se insufla el aire frío a través de la masa de granos almacenada (14 y 17°C). El frío es conducido por el sistema de aireación sin utilizar el ventilador, el proceso puede durar horas, días o semanas.
- Temperatura. Conservación a bajas temperaturas. Los insectos no se reproducen a temperaturas inferiores a los 21°C o superiores a los 35°C por largos períodos de tiempo. Las temperaturas favorables a la reproducción están entre estos valores, considerándose como ideal los 28°C.
- Humedad. La principal fuente de humedad es la propia del grano. Cuando la humedad aumenta del 12 al 15%, los insectos se desarrollan y se reproducen con mayor intensidad. Por encima de estos límites, predominan los ácaros y los hongos, y a mayor humedad prevalecen las bacterias.
- Los polvos inertes. Las sustancias más usadas son la sílica en jalea, el magnesio calcinado, cenizas y las arcillas (FAO, 1983). Como así también, la tierra de diatomeas, que son antiquísimas algas microscópicas, huecas y con carga eléctrica negativa (Fusé *et al.*, 2013). El mecanismo de acción insecticida es por abrasión, dado que presentan una teca bivalva silíceas y absorción de los lípidos cuticulares del insecto que produce la muerte por deshidratación (Juárez y Calderón Fernández, 2007; Pedrini *et al.*, 2007).
- El almacenaje hermético. No se permite la entrada del aire al interior del silo. Los granos e insectos consumen el oxígeno presente y lo sustituyen por el CO₂, muriendo

por asfixia. También se puede realizar la aplicación de gases como CO₂ y N₂, aunque esto es muy costoso y requiere de instalaciones herméticas y de provisión de gases, entre otros.

- El impacto. Los granos son expulsados por fuerza centrífuga contra una superficie y con el impacto los insectos del exterior e interior mueren. Asimismo, los granos infestados se rompen y los insectos expuestos son retirados por aspiración.
- El transilaje. Consiste en pasar el grano de un silo a otro por medios mecánicos, lo que permite reducir la temperatura y dispersar la humedad acumulada en algunos puntos de la masa de granos.
- Variedades resistentes. Debido a su constitución genotípica, el grano se daña en menor intensidad por el ataque del insecto que otra variedad menos resistente, comparado con el grano estándar.

Métodos de control biológico

El control biológico se define como el uso de organismos vivos para reducir la densidad de la población o el impacto de un organismo considerado plaga (Eilenberg *et al.*, 2001).

- Patógenos. Microorganismos capaces de producir enfermedad en condiciones normales de resistencia del hospedador (López Lastra y Lecuona, 2019). Son altamente específicos, no generan resistencia y son compatibles con los insecticidas tradicionales. Entre ellos, los más utilizados son bacterias, hongos y virus. Los hongos entomopatógenos (HE) han sido evaluados para el control de coleópteros en granos almacenados (Tanya y Doberski, 1984; Adane *et al.*, 1996; Dal Bello *et al.*, 2001; Padín *et al.*, 2002; Lord, 2005; Vassilakos *et al.*, 2006; Athanassiou *et al.*, 2008; Wakil *et al.*, 2010; Luangsa-ard *et al.*, 2011, Barra *et al.*, 2013).

Métodos de control químico

- Productos Fitosanitarios (PF). Es el método habitual para el control de las plagas. Existen productos con principios activos fosforados (fosfina), clorados (clorpirifós, mercaptotion, pirimifós, diclorvos) y piretroides (deltametrina) que se presentan formulados en forma líquida o sólida.
- Ozono. Se usa en bajas dosis, pero suficiente como para eliminar los insectos.
- Insecticidas botánicos. Derivan de plantas y se usan en varias formas (polvos, extractos, aceites esenciales y plantas enteras). En el mercado existen pocos productos obtenidos de las plantas (Rozman *et al.*, 2007).
- Feromonas. Sustancias de naturaleza hormonal que se utilizan para alterar los hábitos sexuales y el comportamiento producidos por los machos para apareamiento (feromonas sexuales) o producidas por los machos de especies más longevas que atraen a los adultos de ambos sexos a una fuente de alimento adecuada (feromonas de agregación). Se usan en monitoreo para reducir la cópula por alteración del medio.
- Reguladores de crecimiento. Brindan protección por un largo plazo y dan como resultado la reducción de la población. Se pueden rociar o espolvorear directamente sobre el grano.

2. Generalidades acerca de los hongos entomopatógenos (HE)

Los HE son un grupo de microorganismos importantes como agentes de control biológico que se encuentran distribuidos en todo el mundo. Existen aproximadamente 700 especies conocidas como patógenos de insectos (Lacey, 2012). La mayoría pertenecen al Phyla Ascomycota (Orden Hypocreales) y Entomophthoromycota (Orden Entomophthorales). Aunque estos dos grupos se diferencian en algunos aspectos de

la historia de vida, ambos producen conidios u otras esporas asexuales que son las unidades infectivas (Roy *et al.*, 2006; Vega *et al.*, 2012).

Estos hongos pueden encontrarse en distintas ubicaciones geográficas y climáticas, tanto en suelos cultivados como naturales (Vega *et al.*, 2008). Tienen la particularidad de actuar como patógenos de diferentes tipos de artrópodos (insectos y ácaros) y pueden llegar a producir la muerte del hospedador (Humber, 2012).

Algunas de las ventajas de los HE son la alta especificidad, la dispersión natural, la posibilidad de cultivo *in vitro* y la seguridad para los humanos (Strasser *et al.*, 2000) y otros organismos vertebrados, preservando los enemigos naturales del organismo objetivo a combatir. Como así también, si se encuentran en las condiciones ambientales adecuadas, puede introducirse, colonizar y reproducirse con la posibilidad de mantener un control permanente una vez establecidos. Además, poseen la capacidad de multiplicarse y dispersarse en el ambiente (Lacey, 2012).

Sin embargo, hay algunas desventajas que están vinculadas con la velocidad de muerte del insecto blanco, debido a que estos mueren luego de varios días de ser infectados; y a su persistencia en el ambiente, dado que se encuentra ligada a las condiciones climáticas: temperatura, humedad relativa, luminosidad, etc. (Lacey, 2012; Padín y Passalacqua, 2018).

En la Argentina, las primeras referencias sobre HE corresponden a la especie *Sporotrichum globuliferum* Vuill. (= *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin) en larvas de coleópteros (Spegazzini, 1880) y a *Cordyceps unilateralis* (Tul. & C. Tul.) Sacc., en hormigas (Spegazzini, 1913). Posteriores referencias fueron publicadas sobre el uso de HE para controlar poblaciones de insectos plaga (Marchionatto, 1934, 1942; Fresa, 1971, 1979; López Lastra, 1988, 1989, 1990; Sosa-Gómez y Moscardi, 1991; Alves *et al.*, 1998; Lecuona, 1999; Sosa-Gómez, 1999; Dal Bello *et al.*, 2001, 2006; Toledo *et al.*, 2004; López Lastra y Scorsetti, 2006; Padín *et al.*, 1995; 1997, 2002; Scorsetti, 2007; Schapovaloff *et al.*, 2013).

Características del Phylum Ascomycota

Los organismos comprendidos dentro del Phylum Ascomycota, se caracterizan por presentar hifas septadas y por la estructura de saco que contiene las ascosporas (esporas sexuales). El ciclo de vida es pleomórfico, tiene una etapa asexual (mitótica) y otra sexual (meiótica) (Vega *et al.*, 2012). Estos hongos han sido encontrados en la naturaleza mayoritariamente en su estado anamórfico (de reproducción asexual mediante conidios) pero también en estado teleomórfico (de reproducción sexual). Algunos habitan el suelo (saprófitos) y otros conviven en estrecha relación con las plantas (endófitos) causando infecciones a los artrópodos (entomopatógenos).

Las especies más comunes son *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokīn, *M. robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber, *M. rileyi* (Farl.) Kepler, S.A. Rehner & Humber, *C. fumosorosea* (Wize) Kepler, B. Shrestha & Spatafora y *C. farinosa* (Holmsk.) Kepler, B. Shrestha & Spatafora (López Lastra y Lecuona, 2019).

Numerosos estudios previos documentan el uso del Phylum Ascomycota para el control de insectos del Orden Coleoptera. Entre ellos, se ha evaluado el potencial de las especies fúngicas *B. bassiana* y *M. anisopliae* (Tanya y Doberski, 1984; Adane *et al.*, 1996; Dal Bello *et al.*, 2001; Padín *et al.*, 2002; Lord, 2005; Vassilakos *et al.*, 2006; Athanassiou *et al.*, 2008; Wakil *et al.*, 2010) y *Purpureocillium lilacinum* (Thom) (Luangsa-ard *et al.*, 2011, Barra *et al.*, 2013).

Clasificación taxonómica y morfología de los hongos entomopatógenos sobre los que se desarrollaron los bioensayos

Se utilizaron cuatro HE del Phylum Ascomycota: *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *C. fumosorosea* y *P. lilacinum*, a continuación, se describe cada uno de ellos.

***Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin**

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Cordycipitaceae

Género: *Beauveria*

Ubicación Mycobank 199430*

*Clasificación taxonómica según Mycobank (Sitio Web: <http://www.mycobank.org/>).

El género *Beauveria* afecta a una gran cantidad de insectos y ácaros, siendo comúnmente encontrado en la naturaleza (insectos muertos y momificados). En el exoesqueleto del huésped forma una densa cubierta blanca, ocasionalmente con fascículos erectos de hifas. Las células conidiógenas están generalmente densamente agrupadas (verticiladas o solitarias) y son incoloras. El raquis posee la base globosa o con forma de matraz. A su vez, la extensión apical denticulada (dentada) se estrecha hacia la porción que sostiene el conidio, la cual se presenta en forma de zig-zag, después de que varios conidios se producen. El género se caracteriza morfológicamente por los conidios globosos a cilíndricos o vermiformes, aseptados, que son típicamente hialinos, de pared lisa; y los conidióforos forman densos grupos (Humber, 2012).

Actualmente, se acepta que el género comprende un complejo de varias especies crípticas. La identificación morfológica de las especies de *Beauveria* se ha basado tradicionalmente en la morfología de los conidios (Rehner y Buckley, 2005). Sin embargo, la amplia superposición en las dimensiones y la forma de los conidios entre las especies dificulta la identificación definitiva. El uso de herramientas moleculares ha posibilitado la diferenciación intraespecífica dentro del género

mediante el análisis comparativo de secuencias de ADN. En la actualidad hay más de 10 especies descritas, por ejemplo: *B. bassiana*, *B. brongniartii* (Sacc.) Petch, *B. caledonica* Bissett & Widden, *B. amorpha* (Höhn.) Minnis, S.A. Rehner & Humber, *B. asiatica* S.A. Rehner & Humber, *B. pseudobassiana* S.A. Rehner & Humber (Rehner *et al.*, 2011).

***Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokīn**

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Género: *Metarhizium*

Ubicación Mycobank 8912

El género *Metarhizium* se caracteriza por tener la capacidad de infectar una amplia gama de artrópodos y por ser muy común en insectos y en el suelo como su mayor reservorio. El micelio a menudo cubre a los huéspedes afectados; los conidióforos forman parches densos; mientras que conidióforos individuales son ampliamente ramificados (tipo candelabro), y aparecen densamente entrelazados. Las células conidiógenas se presentan con ápices redondeados a cónicos, formando un himenio denso con conidios aseptados, cilíndricos u ovoides. Constituyen largas cadenas que generalmente se adhieren lateralmente y forman columnas prismáticas o cilíndricas o placas sólidas de esporas. El color típico de esta especie se lo otorgan los conidios, los cuales varían de verde oliváceo, pálido o brillante a amarillo verdoso o sepia (Humber, 2012).

Según la bibliografía, los estudios taxonómicos de especies dentro de este género se realizaron basándose en las características morfológicas y los datos del marcador ITS (Rehner y Buckley, 2005), sin embargo, no fueron suficientes. En consecuencia, varios autores realizaron estudios taxonómicos moleculares de análisis de secuencia multilocus obteniendo una base más sensible y sólida (Rehner y Buckley, 2017), pudiendo determinar las especies más comunes como: *M. anisopliae*, *M. robertsii* y *M. rileyi* (= *Nomuraea rileyi*).

Metarhizium anisopliae s.l. presenta amplia distribución mundial y ha sido encontrado infectando insectos, como larvas de coleópteros, pulgones, trips, locústidos, cigarras, chinches y otras especies (Boucias y Pendland, 1998; López Lastra y Lecuona, 2019).

***Cordyceps fumosorosea* (Wize) Kepler**

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Cordycipitaceae

Género: *Cordyceps*

Ubicación Mycobank 1240

En el género *Cordyceps* los conidióforos suelen estar bien desarrollados, sinnematosos en muchas especies, con espirales de ramas divergentes y células conidiógenas (fiálides), incoloras a pigmentadas (pero no negras, marrones u olivas). Las células conidiógenas con un matraz distintivo en el cuello y en la base, son de forma de punzón estrecho o casi globoso, nacen solas o en grupos, en espirales, en conidióforos, en ramas laterales cortas o en espirales apicales. Los conidios

aseptados, hialinos o coloreados, se disponen en cadenas secas divergentes (Humber, 2012).

Las especies de ocurrencia más común son *C. fumosorosea*, *C. farinosa* (Holmsk.) Kepler, B. Shrestha & Spatafora y *C. tenuipes* (Peck) Kepler, B. Shrestha & Spatafora. Son conocidas por causar epizootias en poblaciones de diversas especies de insectos (López Lastra y Lecuona, 2019).

***Purpureocillium lilacinum* (Thom)**

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Ophiocordycipitaceae

Género: *Purpureocillium*

Ubicación Mycobank 519529

El género presenta hifas septadas y hialinas, de paredes delgadas. La mayoría presenta ramificaciones verticiladas o irregularmente ramificadas, llevan en su parte terminal en cada rama grupos de fiálides, las cuales pueden ser también solitarias. Las fiálides constan de una porción basal cilíndrica o hinchada, adelgazándose abruptamente a menudo para formar un cuello muy notorio. Los conidios son de forma globosa u oblonga y se encuentran agrupados en forma de cadena. Presentan un rápido crecimiento de sus hifas. El conidióforo presenta grupos de ramificaciones laterales, cada una de las cuales presenta de 2 a 4 divisiones ovaladas antes de los conidios. Estos últimos tienen una longitud de 2,5-3,0 μm de largo y de 2,0-2,2 μm de ancho y presentan coloración lila (Humber, 2012).

La especie *P. lilacinum* fue descrita por primera vez por (Thom) Luangsa-ard, Hou-Braken, Hywel-Jones y Samson, sin embargo, puede encontrarse en la bibliografía como *Penicillium lilacinum* (Thom); *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson; *Paecilomyces nostocoides* M.T. Dunn (Luangsa-ard *et al.*, 2011).

Ciclo de vida de los hongos entomopatógenos

1. Adhesión de la espora sobre la cutícula del huésped:

El ciclo del desarrollo de un HE comienza con una unidad infectiva, una espora asexual o conidio, que contacta al hospedador, mediante las propiedades físicas, químicas y electrostáticas de la superficie del conidio y de la cutícula. En este proceso también intervienen proteínas denominadas hidrofobinas (Holder y Keyhani, 2005; López Lastra y Lecuona, 2019).

2. Germinación y formación de apresorios:

Cuando los conidios quedan retenidos en la cutícula del hospedador, se adhieren e hidratan y ocurre su germinación. Originan un tubo germinativo y, en algunos casos, la formación de un apresorio. El apresorio favorece la fijación y el ingreso del hongo al interior del huésped, ayudando en la penetración.

3. Penetración de las hifas (liberación de enzimas) en el huésped:

La penetración ocurre en las partes más débiles de la cutícula (membranas intersegmentales, zonas de inserción de las patas, ojos y mandíbula), a través de la presión mecánica ejercida por el extremo de la hifa invasiva o por el apresorio y el mecanismo enzimático, lipasas, proteasas y quitinasas, que van degradando la cutícula (Tanada y Kaya, 1993).

4. Multiplicación del hongo en el hemocele del insecto (por medio de brotación de los cuerpos hifales/blastosporas):

El hongo, ya en el hemocele del insecto, convierte el crecimiento del micelio en un crecimiento por gemación. Las blastosporas, formas miceliales unicelulares similares a cuerpos hifales, proliferan rápidamente evadiendo la respuesta inmune del insecto (Tanada y Kaya, 1993; Boucias y Pendland, 1998).

5. Liberación de toxinas/metabolitos:

Las sustancias tóxicas químicas, micotoxinas (péptidos cíclicos) son secretadas por el hongo en el hemocele y se encuentran involucradas en el proceso infectivo (Tanada y Kaya, 1993; Boucias y Pendland, 1998).

6. Invasión de tejidos, lisis y muerte del insecto:

La multiplicación del hongo en el interior del insecto genera competencia por nutrientes y oxígeno. Por consiguiente, el hospedador progresivamente presenta carencia de coordinación, comportamientos alterados (Lecuona, 1996), parálisis y cambios de coloración (Alves, 1998). El insecto, ya muy debilitado, muere.

7. Esporulación externa del hongo a través de la cutícula del insecto hospedante:

Después de la muerte del insecto, si las condiciones de humedad relativa son altas, las estructuras fúngicas logran atravesar las partes más débiles de la cutícula (membranas intersegmentales). El cuerpo inicialmente se recubre de un micelio blanco con aspecto algodonoso y posteriormente es recubierto de conidios de la coloración característica de cada especie fúngica.

8. Infección a otros insectos sanos a través del inóculo fúngico (esporas, conidios, etc.):

Una vez fuera del hospedador se producen las esporas capaces de iniciar nuevos ciclos de infección en otro hospedador, tanto huéspedes primarios como

alternativos, diseminando el patógeno en el ambiente por acción de agentes abióticos o bióticos (Fuxa y Tanada, 1987; Hesketh *et al.*, 2010; López Lastra y Lecuona, 2019).

Factores que inciden en las infecciones fúngicas

Los factores ambientales más importantes que afectan el uso de los HE son la temperatura, la luz UV y la humedad relativa. En cuanto a la temperatura, el rango óptimo de crecimiento varía entre 10° y 30°C. En segundo lugar, la exposición a la radiación solar inhibe o retrasa la germinación. Por último, la humedad relativa y el agua libre afectan la germinación y la esporulación del hongo. Consecuentemente, la fluctuación de dichos factores podría tener un impacto sobre el efecto del control (Magan, 2001). Asimismo, se debe tener en cuenta el tipo de sustrato/ambiente, estado del hospedador, edad, dosis o concentración del patógeno, secuencia y tiempo de alimentación de cada patógeno (López Lastra y Lecuona, 2019).

3. Manejo de insectos plaga con productos fitosanitarios (PF)

En la actualidad, el control de insectos plaga en granos almacenados se realiza con PF, aprobados por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) (Tabla 1). Su uso es cada vez mayor, debido a la prolongación de la vida media de los alimentos y a que presentan diferente grado de selectividad frente a los organismos blancos. Sin embargo, pueden provocar efectos adversos sobre el hombre y otras especies del ambiente (Monro *et al.*, 1972; Sartori *et al.*, 1991, Pimentel *et al.*, 2009).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica en clases a todos los principios activos de los PF según su toxicidad (Tabla 2). En la parte inferior de los marbetes, se puede observar la banda de color que indica la categoría. Basándose en esta clasificación, cada principio activo requerirá precauciones y elementos de

protección personal cuando se los manipule que sean acordes a su nivel de peligrosidad (WHO, 2009; Pina, 2012; Padín y Passalacqua, 2018).

Tabla 1. Productos Fitosanitarios aprobados para el control de plagas en granos almacenados en Argentina.

Principio Activo	Familia o Tipo
Fosfuro de aluminio	Fumigante
Fosfuro de magnesio	Fumigante
Pirimifós metil	Fosforado
Pirimifós metil + lambdacialotrina	Fosforado + Piretroide
Deltametrina + Butóxido de piperonilo	Piretroide + agente sinérgico
Mercaptotion	Fosforado

Fuente: Resolución SENASA 934/2010 y Carpaneto, 2010.

Tabla 2. Clasificación toxicológica y etiquetado de productos fitosanitarios según la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Clasificación según los riesgos	Características	Clasificación	Color de banda	Leyenda de la banda
CLASE I a	Producto sumamente peligroso	Muy tóxico	Rojo	MUY TÓXICO
CLASE I b	Producto muy Peligroso	Tóxico	Rojo	TÓXICO
CLASE II	Producto moderadamente Peligroso	Nocivo	Amarillo	NOCIVO
CLASE III	Producto poco Peligroso	Cuidado	Azul	CUIDADO
CLASE IV	Productos que normalmente no ofrecen peligro	Cuidado	Verde	CUIDADO

Fuente: Extraído y modificado de: WHO, 2009; Pina, 2012; Padín y Passalacqua, 2018.

Los principales factores que pueden afectar la tasa de degradación y vida útil de los insecticidas, tanto de fosforados como de piretroides, son la temperatura y el contenido de humedad del grano (Strada *et al.*, 2014).

Características de los productos fitosanitarios

Los PF utilizados en los bioensayos realizados para la presente tesis son insecticidas orgánicos sintéticos destinados al tratamiento de granos y productos almacenados (Tabla 1). Se realiza una breve mención de las características de los principios activos.

Los *insecticidas fosforados*, denominados también fosforados orgánicos o ésteres del ácido fosfórico, inhiben las enzimas del sistema nervioso, como la acetilcolinesterasa. Esto provoca una acumulación de acetilcolina en las uniones o sinapsis neurona-neurona o neurona-músculo causando contracciones rápidas de los músculos voluntarios y finalmente parálisis y muerte. Son poco persistentes en el ambiente. Dentro de este grupo encontramos una gran variedad de principios activos como pirimifós metil y diclorvós, ampliamente distribuidos para el control de plagas en la producción agropecuaria (Tabla 1). Uno de los utilizados en el presente trabajo, el pirimifós metil, es un insecticida de amplio espectro de control con acción por contacto e inhalación. Muestra poder residual debido a su persistencia en superficies inertes (paredes, pisos, techos, costales). Por su penetración, el producto se acumula en el tegumento, por lo que la contaminación por residuos en harinas es muy leve (Arregui y Puricelli, 2008; Novo *et al.*, 2011).

Los *insecticidas piretroides*, son moduladores del canal de sodio, interfieren sobre el sistema nervioso central y periférico. Este fenómeno prolongado en el tiempo desencadena efectos tóxicos (hiperexcitación, convulsiones y temblores), pérdida de la postura normal, ataxia (falta de movimiento y descoordinación) que llevan a la muerte del insecto. Son persistentes en el ambiente (meses a años) dejando residuos en los alimentos, aunque se degradan con el tiempo de almacenaje y su procesamiento

(White y Leesch, 1996). Dentro de este grupo químico encontramos principios activos utilizados para el control de plagas como son cipermetrina, deltametrina, lambdacialotrina y algunos de más reciente aparición como la ciflutrina y β -ciflutrina. Uno de los utilizados en el presente trabajo, lambdacialotrina, es un insecticida que actúa por contacto e ingestión (Novo *et al.*, 2011).

A nivel mundial, existe una marcada tendencia en la disminución del uso de PF, esto surge de la demanda de los consumidores de productos libres de insectos y otras plagas, cada vez más preocupados por la seguridad alimentaria y por la acumulación de los residuos de PF en sus alimentos (Magnusson y Cranfield, 2005). Asimismo, estudios demuestran que el uso excesivo de dichos productos ha causado la resistencia de *R. dominica* a los insecticidas fosforados (clorpirifós metilo, fenitrotión, pirimifós metilo y malatión), a los piretroides y a los reguladores de crecimiento (metopreno) (Arthur, 1996; Stadler *et al.*, 2003). Como así también a la fosfina (Guedes *et al.*, 1996; Arthur, 2004; Collins, 2006; Edde, 2012).

Las limitaciones en el uso de los PF han llevado al estudio de alternativas de control biológico de bajo impacto ambiental que reducen el riesgo de resistencia, no tienen consecuencias letales en los enemigos naturales, disminuyen la aparición de plagas secundarias, son menos nocivas para el hombre y no ocasionan daños en el ambiente (Arthur, 1996).

Compatibilidad entre control químico y biológico sobre insectos plaga

La utilización de los PF en combinación con los HE aumenta la eficiencia de control, disminuyendo la cantidad de insecticidas requeridos, minimizando los riesgos de contaminación ambiental y la expresión de resistencia a plagas (Moino y Alves 1998; Quintela y McCoy, 1998).

Como los agentes biológicos, entre ellos los HE, no pueden reemplazar completamente a los PF es importante considerar una estrategia de control asociada (Inglis *et al.*, 2001). Por lo tanto, es necesario el estudio previo de la compatibilidad que permita conocer los efectos de los PF sobre los HE para el uso más eficiente y seleccionar compuestos químicos y aislamientos apropiados para garantizar el equilibrio de los agroecosistemas con la permanencia de los organismos benéficos y los enemigos naturales (Moino y Alves, 1998; Quintela y McCoy, 1998; Alves *et al.*, 1998).

Existe evidencia de los efectos nocivos de la acción de PF sobre la viabilidad, el desarrollo y la virulencia de los HE, reduciendo severamente el inicio de la colonización del hospedador (Alves *et al.*, 1998; Schumacher y Poehling, 2012). Alves *et al.* (1998) han estudiado en las pruebas de compatibilidad *in vitro*, que al exponer al hongo patógeno a la máxima actividad posible del PF tiene una alta toxicidad, sin significar que el producto siempre sea tóxico para ese patógeno *in vivo*, en cambio, si es compatible significa que existe una selectividad en condiciones de campo. La toxicidad sobre los HE varía según la especie y el aislamiento fúngico, la naturaleza química del ingrediente activo del PF, el modo de acción, la concentración utilizada y la formulación del producto (Alves y Lecuona, 1998).

Dado el contexto descrito, los objetivos y la hipótesis de este trabajo fueron:

Objetivo General

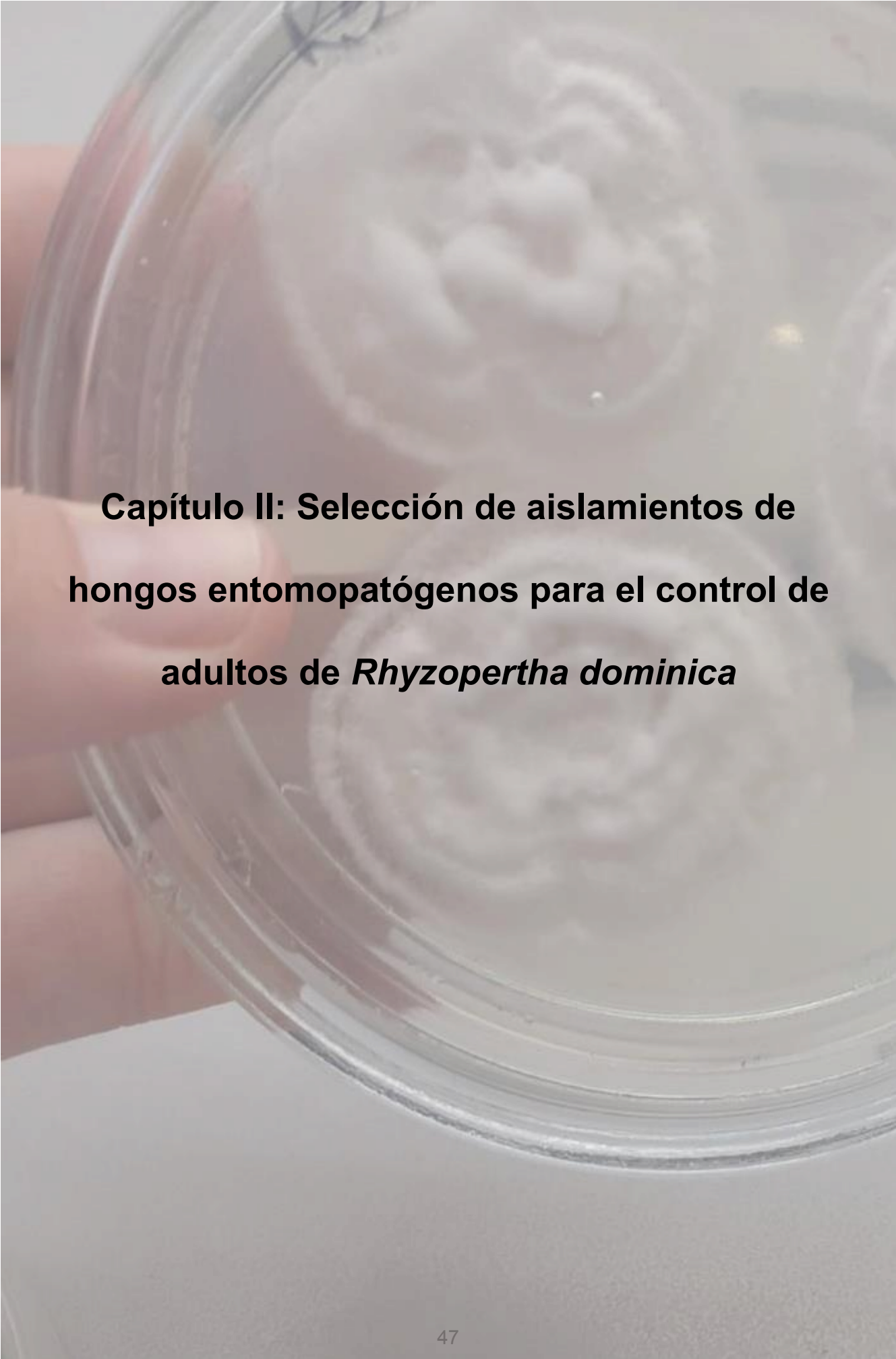
Desarrollar alternativas para el control biológico de los insectos plaga en granos almacenados mediante el empleo de hongos entomopatógenos en combinación con productos fitosanitarios.

Objetivos Particulares

- 1) Evaluar la patogenicidad y virulencia de diferentes hongos entomopatógenos y seleccionar aquel con mayor eficacia para el control de individuos adultos de *Rhyzopertha dominica*.
- 2) Determinar la compatibilidad del hongo entomopatógeno seleccionado combinado con los productos fitosanitarios comúnmente utilizados en Argentina y Brasil.
- 3) Evaluar la patogenicidad y virulencia del hongo entomopatógeno seleccionado combinado con productos fitosanitarios en concentraciones subletales sobre un rango de hospedadores: *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis* y *Tribolium castaneum*.

Hipótesis

Los hongos entomopatógenos presentan diferente virulencia para el control de individuos adultos de *R. dominica*. La compatibilidad de los hongos entomopatógenos combinados con los productos fitosanitarios varía según la especie y el aislamiento fúngico, la naturaleza química del ingrediente activo de los PF y la concentración utilizada. La virulencia del aislamiento seleccionado difiere según el rango de hospedadores: *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis* y *Tribolium castaneum*.

A close-up photograph of a hand holding a clear glass petri dish. Inside the dish, there is a white, fluffy, circular mass of fungal growth on a light-colored agar medium. The growth has a slightly irregular, textured appearance. The background is a plain, light-colored surface.

Capítulo II: Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos para el control de adultos de *Rhyzopertha dominica*

Introducción

Los insectos plaga son una de las principales causas de pérdidas durante la postcosecha de los granos almacenados. La presencia de insectos afecta el peso, los nutrientes y el porcentaje de germinación de los granos, disminuyendo así el valor de su calidad comercial (Abdel-Raheem *et al.*, 2015). Entre ellos, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) es la plaga más destructiva y difícil de controlar, debido a que se desarrolla dentro de los granos (Vardeman *et al.*, 2007). Tanto en la Argentina como en el resto del mundo, esto es importante debido a las normas de comercialización que prohíben la venta de mercancías infestadas con insectos vivos (Carpaneto, 2010).

El control convencional de insectos plaga en la postcosecha se ha basado tradicionalmente en la utilización de PF. Sin embargo, el empleo excesivo ha provocado resistencia a los insecticidas, residualidad química, eliminación de insectos beneficiosos, contaminación ambiental y toxicidad humana (Arnaud *et al.*, 2005). A causa de esto, varios autores estudiaron alternativas de control biológico, entre ellos el uso de los HE como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en condiciones de laboratorio y ensayos de campo (Padín *et al.*, 1995; Moino *et al.*, 1998; Rice y Cogburn 1999; Lord, 2005; Mahdeshin *et al.*, 2009; Wakil *et al.*, 2010; Barra *et al.*, 2013). Estos hongos tienen alta especificidad y eficacia. Además, son agentes de bajo impacto ambiental, sin dejar rastros residuales ni toxicidad en mamíferos y no seleccionan poblaciones resistentes (Strasser *et al.*, 2000; Lacey, 2012; Akmal *et al.*, 2017).

Las características biológicas de los HE deben ser evaluadas en un programa de control biológico. Entre las características se encuentran la patogenicidad, la virulencia y la agresividad. La patogenicidad es la cualidad de ser patogénico con el potencial de producir enfermedad, es usada en el sentido de grado de patogenicidad dentro de un grupo de especies, siendo una variable cualitativa. La virulencia es definida como la capacidad de un microorganismo de producir una enfermedad a un

hospedador, es una variable relativa que debe ser comparada con otros aislamientos sobre el mismo hospedante. Por lo tanto, es una variable cuantificable que se mide a través de la concentración letal media (CL₅₀), es decir, la concentración requerida para matar al 50% de los huéspedes expuestos al patógeno. La agresividad refiere a la situación en que dos aislamientos sean igualmente virulentos, pero uno de ellos mata al hospedante en menor tiempo que el otro; variable que se cuantifica comparando el tiempo letal 50 o 90 (TL₅₀, TL₉₀) entre aislamientos fúngicos (Alves y Lecuona, 1996; López Lastra y García, 2021).

En este capítulo se describe la metodología y los resultados obtenidos de la selección de los aislamientos a partir de la evaluación de la viabilidad y de los bioensayos realizados para la determinación de la eficacia de los aislamientos seleccionados para el control de adultos de *R. dominica*.

Materiales y métodos

1. Origen y mantenimiento de la colonia de *Rhyzopertha dominica*

Las colonias de *R. dominica* que se utilizaron como insectos blancos fueron criadas en el Insectario, ubicado en el Laboratorio de la Cátedra de Terapéutica Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata (FCAyF-UNLP). Los insectos adultos de 3 semanas de edad se colocaron dentro de frascos de vidrio (250mL) conteniendo granos de cebada perlada, libre de todo tipo de contaminación (esterilizados en autoclave y secados en estufa). Los granos fueron renovados semanalmente a fin de favorecer la producción de una cría sincronizada. Los frascos fueron rotulados para el seguimiento de las generaciones y se colocaron en cámaras de cría en condiciones controladas (26°C, 60%HR y en oscuridad). Se obtuvieron varias generaciones consecutivas de individuos adultos con edades estandarizadas, para posteriormente seleccionar y utilizar en los bioensayos.

2. Origen de los hongos entomopatógenos

2.1. Aislamientos seleccionados de la Colección de Hongos Entomopatógenos del CEPAVE

Se utilizaron 13 aislamientos nativos preservados en la Colección de Hongos Entomopatógenos del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) (CONICET-UNLP-Asociado a CICPBA). Los mismos fueron *B. bassiana sensu lato* (s.l.): CEP 75, CEP 136, CEP 418, CEP 420, CEP 428, CEP 545, CEP 560, CEP 567 y CEP 588, *M. robertsii* s.l.: CEP 381 y CEP 401 y *Cordyceps fumosorosea sensu stricto* (s.str.): CEP 303 y CEP 309 (D'Alessandro *et al.*, 2014). Los datos de la especie, hospedador, fuente de aislamiento y lugar de recolección se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Aislamientos de *B. bassiana*, *M. robertsii* y *C. fumosorosea* de la Colección de Hongos Entomopatógenos del CEPAVE.

N° en la Colección	Especie	Hospedador	Fuente de aislamiento	Lugar de Recolección
CEP 75	<i>B. bassiana</i> s.l.	Curculionidae no identificado	Insecto	Berazategui, Bs. As. 34°46'04" S, 58°12'48" O
CEP 136	<i>B. bassiana</i> s.l.	Coleoptera no identificado	Insecto	Berazategui, Bs. As. 34°46'04" S, 58°12'48" O
CEP 418	<i>B. bassiana</i> s.l.	Coleoptera no identificado	Insecto	Parque Nacional El Palmar, Entre Ríos 31°51'11" S, 58°19'21" O
CEP 420	<i>B. bassiana</i> s.l.	<i>Diabrotica</i> <i>speciosa</i> (Coleoptera: Chrysomelidae)	Insecto	Parque Nacional El Palmar, Entre Ríos 31°51'11" S, 58°19'21" O

CEP 428	<i>B. bassiana</i> s.l.	<i>Diabrotica speciosa</i> (Coleoptera: Chrysomelidae)	Insecto	Bs. As. 34°35'59" S, 58°22'55" O
CEP 545	<i>B. bassiana</i> s.l.	<i>Acromyrmex lobicornis</i> (Hymenoptera: Formicidae)	Insecto	La Lipela - Villa Llanquin, Neuquén 40°53'44" S, 71°02'12" O
CEP 560	<i>B. bassiana</i> s.l.	<i>Edessa meditabunda</i> (Hemiptera: Pentatomidae)	Insecto	Zavalla, Santa Fé 33°01'00" S, 60°53'00" O
CEP 567	<i>B. bassiana</i> s.l.	<i>Acromyrmex lundii</i> (Hymenoptera: Formicidae)	Insecto	La Plata, Bs. As. 34°54'39" S, 57°55'46" O
CEP 588	<i>B. bassiana</i> s.l.	Coleoptera no identificado	Insecto	La Plata, Bs. As. 34°54'39" S, 57°55'46" O
CEP 381	<i>M. robertsii</i> s.l.	<i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera: Tenebrionidae)	Suelo	Finca Tía Nora, San Juan 31°44'63" S, 68°51'45" O
CEP 401	<i>M. robertsii</i> s.l.	<i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera: Tenebrionidae)	Suelo	Pocito, San Juan 31°39'00" S, 68°33'00" O
CEP 303	<i>C. fumosorosea</i> s.str.	<i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Hemiptera: Aleyrodidae)	Insecto	Abasto, La Plata, Bs. As. 34°59'13" S 58°05'20" O
CEP 309	<i>C. fumosorosea</i> s.str.	<i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Hemiptera: Aleyrodidae)	Insecto	Colonia Urquiza, La Plata, Bs. As. 34°56'35" S 58°5'30" O

2.2. Aislamientos realizados mediante el uso de insectos “cebo”

Se recolectaron las muestras de suelo de: alrededores de la FCAYF, La Plata, Bs. As. y de la localidad de Coronel Martínez de Hoz, Lincoln, Bs. As. Para tal fin, en cada sitio fueron retirados los primeros centímetros de vegetación, recolectando 200 g de suelo hasta 5 cm de profundidad y fueron colocados en bolsas individuales de polipropileno, mediante el uso de una pala de jardín (Figura 1a). Las muestras fueron etiquetadas y conservadas en frío (en heladera a 4°C) hasta ser procesadas. Posteriormente, en el laboratorio, cada muestra fue acondicionada (tamizada), dejándola lo más homogénea posible sin restos de vegetación.

Para el aislamiento de los HE se utilizó *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) y *T. molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) como insectos cebos (Zimmermann, 1998; Lacey, 2012).

Una porción de cada muestra de suelo de los alrededores de la FCAYF-UNLP (10 g) fue colocada en una placa de Petri (9 cm de diámetro), humedecida con agua destilada, y luego se le agregaron las larvas de *G. mellonella* procedentes de colmenas de abejas y conservadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 2 semanas. Al mismo tiempo, una porción de cada muestra de suelo de Coronel Martínez de Hoz (20 g) fue colocada en un recipiente de plástico al que se le agregó larvas de *T. molitor* (Figura 1b y c) procedentes del Insectario, ubicado en el Laboratorio de la Cátedra de Terapéutica Vegetal de la FCAYF-UNLP. Éstas fueron acondicionadas y conservadas de la misma forma que las demás muestras.

Las larvas encontradas muertas fueron desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio 0,5% v / v durante 1 minuto, se colocaron en cámaras húmedas (placa de Petri esterilizada conteniendo papel de filtro humedecido con agua destilada estéril) que se incubaron a 25°C durante 10 días o hasta la aparición de signos de infección (cubiertos de micelio fúngico, Figura 1d).

A partir de los insectos infectados, con la ayuda de un microscopio binocular estereoscópico, se realizó el aislamiento directo de esporas (Figura 1e). Las esporas fueron tomadas de la cutícula con un ansa/aguja estéril y transferidas sobre una placa de Petri con medio de cultivo selectivo (Anexo) con el objeto de obtener cultivos puros (Figura 1f). Los cultivos fueron incubados a 25°C.

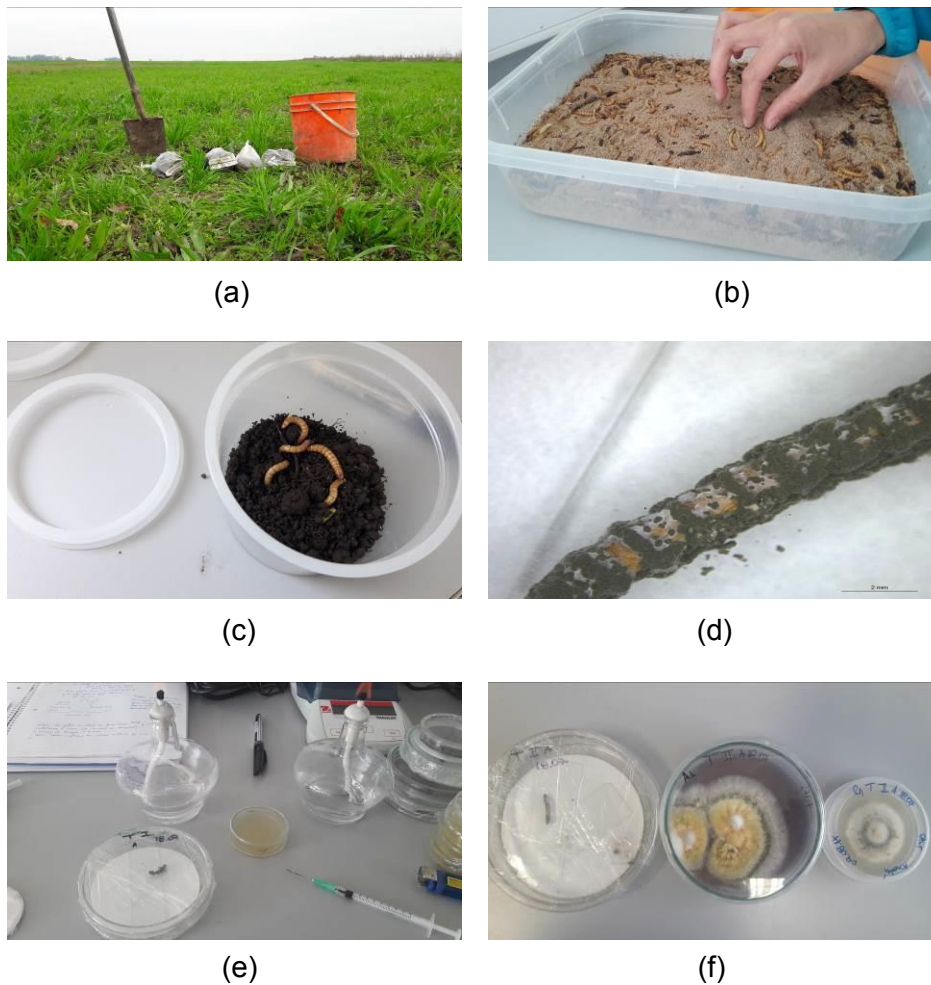


Figura 1. (a) Muestras de suelo. (b) Larvas de *T. molitor*. (c) Recipiente de plástico humedecido con las larvas. (d) Larva infectada. (e) Aislamiento directo. (f) Medio selectivo.

Las especies fueron identificadas como *B. bassiana* s.l. y *M. anisopliae* s.l. a partir de la descripción macroscópica y microscópica de las estructuras vegetativas y reproductivas (Humber, 2012) (Tabla 2). Para la descripción macroscópica se utilizaron los aislamientos monospóricos obtenidos de cada aislamiento, se observó el aspecto y color de la colonia. A partir de los cultivos fúngicos esporulados se realizaron preparados para la microscopía óptica, donde con una aguja se tomó una pequeña muestra de las hifas y se la dispersó sobre el portaobjetos en una gota del colorante, Azul de algodón-Lactofenol de Ammann (Anexo), por encima de éste se colocó un cubreobjetos para visualizar la forma y dimensiones de los conidios, fiálides e hifas. Estos preparados fueron observados bajo microscopio óptico con contrastes de fases (400x) (Olympus Japan CH30).

Tabla 2. Aislamientos realizados mediante insectos “cebo”.

N° en la Colección	Especie	Fuente de aislamiento	Insecto Cebo	Lugar de Recolección
CEP 612	<i>B. bassiana</i> s.l.	Suelo de Jardín	<i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera: Pyralidae)	La Plata, Bs. As. 35°19'00" S, 61°37'00" O
CEP 613	<i>B. bassiana</i> s.l.	Suelo de Jardín	<i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera: Pyralidae)	La Plata, Bs. As. 34°91'12" S, 57°92'81" O
CEP 614	<i>B. bassiana</i> s.l.	Suelo de Jardín	<i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera: Pyralidae)	La Plata, Bs. As. 34°91'08" S, 57°92'97" O
CEP 615	<i>M. anisopliae</i> s.l.	Suelo cultivado	<i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera: Tenebrionidae)	Lincoln, Bs. As. 35°30'06" S, 61°52'33" O
CEP 616	<i>M. anisopliae</i> s.l.	Suelo cultivado	<i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera: Tenebrionidae)	Lincoln, Bs. As. 35°32'71" S, 61°54'79" O
CEP 617	<i>M. anisopliae</i> s.l.	Suelo cultivado	<i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera: Tenebrionidae)	Lincoln, Bs. As. 35°32'70" S, 61°52'25" O

Los aislamientos fueron preservados y depositados en la Colección de Hongos Entomopatógenos del CEPAVE. Los métodos de preservación utilizados fueron la preservación en agua destilada estéril y en papel, el método de criopreservación a -20°C o a -70°C , en glicerol 10% y la liofilización descritos por Gutiérrez *et al.* (2017).

3. Selección del aislamiento para el control de adultos de *Rhizopertha dominica*

3.1. Ensayo preliminar para la selección de los aislamientos

El objetivo fue seleccionar los aislamientos a utilizar en los bioensayos descritos en este capítulo. Para esto, se determinó el porcentaje de germinación (viabilidad) de los aislamientos mencionados en las Tablas 1 y 2 utilizando la técnica modificada de Lane *et al.* (1988). Cada uno de los aislamientos se cultivaron en placas de Petri (10 cm de diámetro) con medio de cultivo Agar Papa Glucosa (APG) (Anexo) y se colocaron en incubadora ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 60%HR y en oscuridad), durante 15 días. Se realizó una suspensión de conidios en agua destilada estéril con Tween 80 al 0,01% (v / v) (polisorbato de sodio) y se ajustó la concentración a 1×10^5 conidios/mL mediante el uso de un hemocitómetro (cámara de Neubauer).

Al mismo tiempo, se acondicionó una cámara de viabilidad que consistió en una placa de Petri (10 cm de diámetro) con un papel de filtro humedecido con agua destilada estéril, por encima se colocaron dos portaobjetos ubicados perpendicularmente, el superior conteniendo 0,5 mL de medio de cultivo APG (2 mm de espesor). Luego, se inoculó 0,1 mL de la suspensión de conidios ajustada previamente, con una pipeta automática, sobre el medio de cultivo y se distribuyó homogéneamente con ayuda de una espátula de Drigalsky. Las cámaras de viabilidad se incubaron por 24 h a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, y se cuantificó el número de conidios germinados y no germinados mediante un microscopio óptico de contraste de fases (200x) (Olympus Japan CH30) (Figura 2). Se consideró germinado al conidio cuando la longitud del tubo

germinativo alcanzó la mitad de la longitud de la espora. Para cada aislamiento el procedimiento se realizó por triplicado y se cuantificó un total de 600 conidios por placa (Lane *et al.*, 1988).

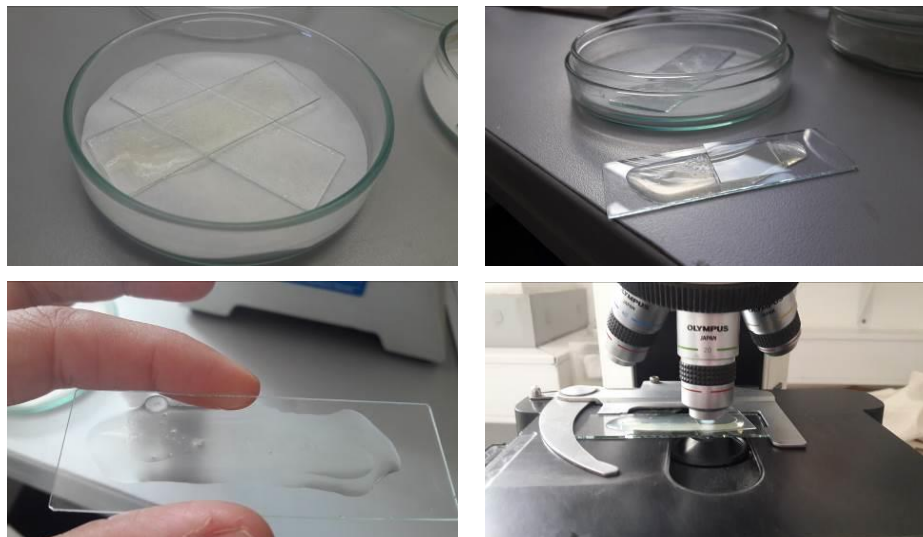


Figura 2. Cámaras de viabilidad para el recuento de conidios.

Los medios de cultivo como todo el material fueron esterilizados en autoclave tipo Chamberland a 120°C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos y la manipulación de los cultivos fúngicos fue realizada en condiciones de esterilidad (bajo una cámara de flujo de laminar). Los bioensayos que se describen a continuación fueron realizados utilizando sólo los aislamientos que, en los bioensayos preliminares, presentaron viabilidad por encima de 90%: CEP 545, CEP 560, CEP 567, CEP 381, CEP 401, CEP 303, CEP 309, CEP 615, CEP 616 y CEP 617 (Tablas 1 y 2).

3.2. Evaluación de la mortalidad de *Rhyzopertha dominica* ocasionada por distintos aislamientos fúngicos

Con el fin de garantizar la utilización del aislamiento virulento del “primer repique” y contar con material fúngico para los futuros ensayos, se aisló el hongo de manera directa desde el cadáver infectado de *R. dominica* y luego, se preservó en papel en forma individual en la heladera a 4°C (Gutiérrez *et al.*, 2017).

3.2.1. Preparación del inóculo y evaluación de la viabilidad

Cada aislamiento fue transferido a medio APG (CEP 545, CEP 560, CEP 567 y CEP 401) o Sabouraud dextrosa agar enriquecido con 1% de extracto de levadura (SDYA $\frac{1}{4}$) (CEP 615, CEP 616, CEP 617, CEP 303, CEP 309 y CEP 381) (Anexo) en placas de Petri estériles (90 mm de diámetro) y se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y 60%HR durante 15 días en oscuridad. Después de ese tiempo, los conidios se rasparon desde la superficie con una espátula estéril y fueron suspendidos en agua destilada estéril con Tween 80 al 0,01% (v / v). La suspensión de los conidios se agitó en vórtex durante 2 minutos para su homogeneización. La concentración se ajustó a 2×10^8 conidios/mL, de acuerdo con las pruebas preliminares, y la cuantificación fue realizada utilizando un hemocitómetro (cámara de Neubauer). Se evaluó la viabilidad de los conidios de cada aislamiento fúngico (Lane *et al.*, 1988) (**Sección 3.1.**).

3.2.2. Bioensayos

Para la realización de los bioensayos se utilizaron adultos de *R. dominica* obtenidos de la cría ya descrita. Previo al bioensayo, los insectos adultos se mantuvieron bajo inanición durante 24 h. Con el uso de una cuchara y un pincel, se colocaron un total de 20 individuos en un frasco de vidrio, que se cubrió con un tejido de 20 cm³ (49 agujeros/cm²) sujetado con una banda elástica. Las suspensiones de los conidios se aplicaron mediante la técnica de pulverización, utilizando un aerógrafo (FENGDA, BD-180, China) (Figura 3). Se inició con la aplicación a los insectos del control con 0,1 mL de agua destilada estéril con Tween 80 al 0,01%. Luego, se rociaron los restantes insectos con 0,1 mL de cada suspensión de conidios, 2×10^8 conidios/ mL en agua destilada estéril con Tween 80 al 0,01% (v / v). Después de la inoculación, se introdujeron al frasco tres gramos de granos de cebada perlada. Los frascos de vidrio se cubrieron con un paño de muselina y se incubaron durante 15 días a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$ HR y un fotoperíodo de 12:12 h. Por cada aislamiento a inocular se realizaron dos réplicas. El experimento se repitió dos veces en diferentes tiempos.

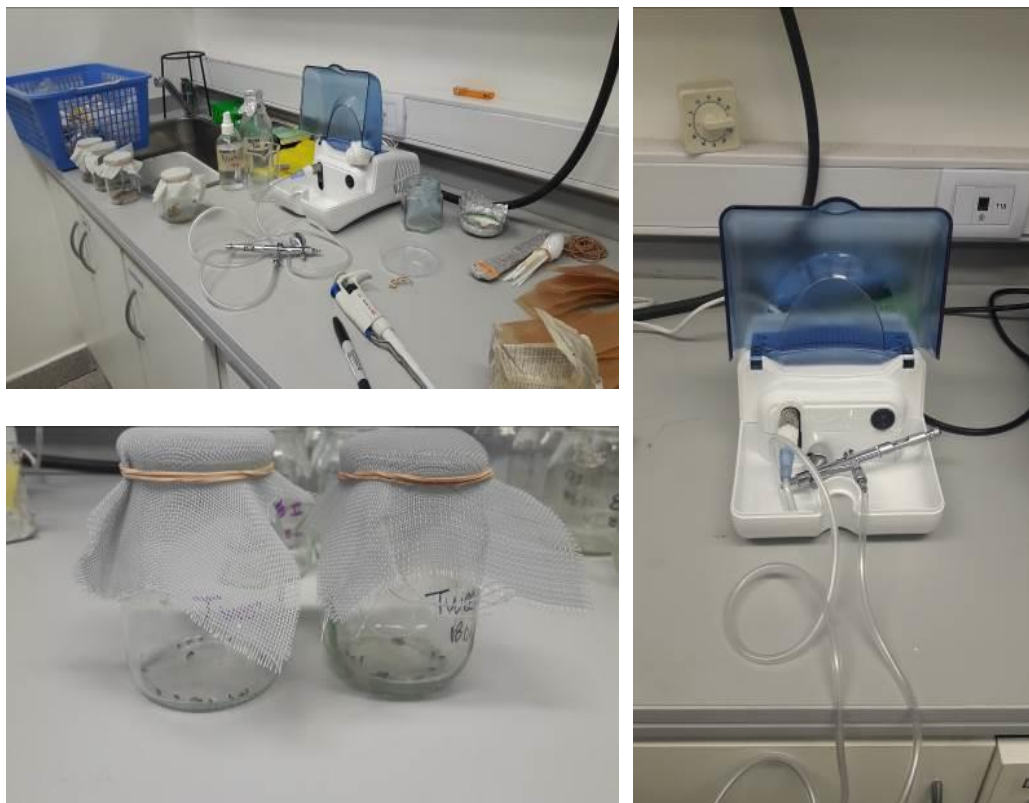


Figura 3. Material utilizado para la inoculación de los insectos mediante el método de pulverización, utilizando un aerógrafo (FENGDA, BD-180, China).

Se registró el número de insectos muertos cada 24 h hasta los 15 días del inicio de la aplicación. Para confirmar la infección fúngica, cada uno de los insectos muertos fue retirado y esterilizado en superficie con hipoclorito de sodio 0,5% v / v durante 1 minuto, luego se colocaron en cámaras húmedas. Las mismas consistían en placas de Petri de plástico (60 mm de diámetro) con medio de cultivo agar-agua (1%) (Anexo). Éstas se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante siete días adicionales para permitir el desarrollo de hongos.

La mortalidad causada por los HE se confirmó al observar signos de infección fúngica en los insectos y de la posibilidad de transferir conidios a nuevos medios de cultivos puros. Para ello, los insectos muertos se colocaron en medios estériles y fue confirmado el crecimiento de hongos en cada insecto (Figura 4). La infección por

hongos también se confirmó diseccionando los insectos para observar sus tejidos bajo microscopio óptico (Olympus Japan CH30).

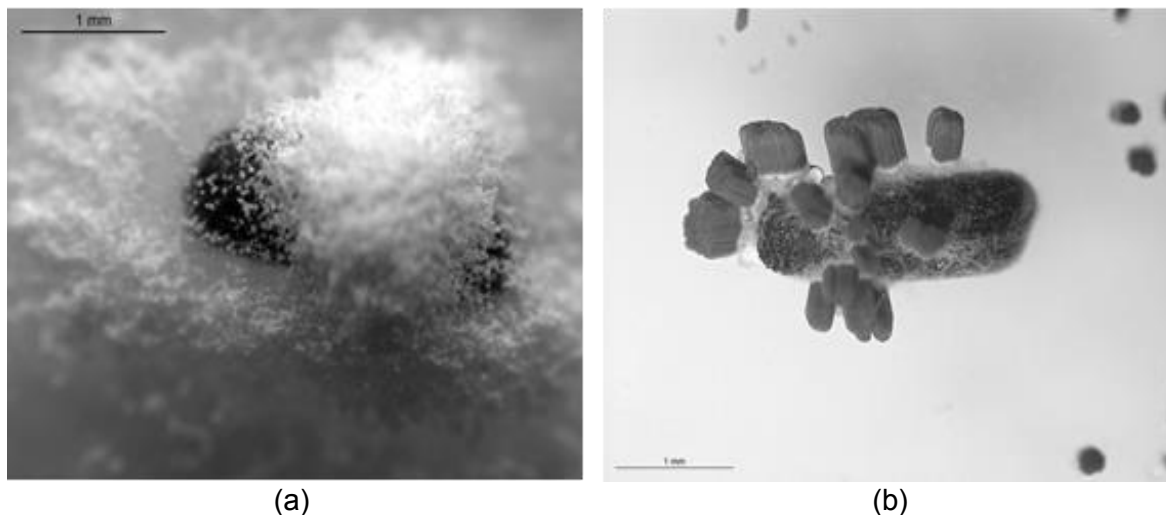


Figura 4. Adultos de *R. dominica* infectados por (a) *B. bassiana* s.l. y (b) *M. robertsii* s.l.

3.2.3. Variables registradas y análisis de datos

Se calculó el porcentaje de mortalidad diaria de los individuos de *R. dominica* infectados con los distintos aislamientos hasta los 15 días del inicio de la aplicación. Las diferencias estadísticas entre los porcentajes de mortalidad de cada aislamiento se analizaron mediante una prueba de Chi-cuadrado. Cuando fueron detectadas diferencias significativas ($P < 0,05$) se realizaron comparaciones post-hoc entre pares de cepas y se ajustaron de acuerdo con el método Sidak (Lyman Ott y Longnecker, 2001).

Fue evaluada la probabilidad de supervivencia en función del tiempo de observación del bioensayo. El tiempo de supervivencia mediana (TSM) de cada aislamiento fue estimado mediante el método de Kaplan-Meier (K-M), se compararon las curvas de supervivencia de *R. dominica* y las diferencias estadísticas se analizaron mediante una prueba de rango logarítmico. Cuando fueron encontradas diferencias

significativas se realizaron comparaciones post-hoc de a pares ajustando el nivel de significación según el método Sidak (Lyman Ott y Longnecker, 2001).

Los análisis se realizaron utilizando el software R versión 4.0.3 (R Core Team, 2018).

3.3. Estimación de la virulencia

A partir del aislamiento seleccionado como el más eficiente para el control de *R. dominica* fue evaluada la concentración letal media (CL₅₀) con cinco concentraciones de suspensión de conidios.

Se prepararon cinco suspensiones de cultivos esporulados (1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 y 1×10^{10}) conidios/mL siguiendo el procedimiento que se describió en la **Sección 3.2.1**. El ensayo de viabilidad del aislamiento seleccionado se realizó en simultáneo al bioensayo.

3.3.1. Bioensayos

Este segundo bioensayo se realizó en las mismas condiciones y procedimientos que los descritos anteriormente (**Sección 3.2.2**). Se utilizaron un total de 20 adultos de *R. dominica* por réplica. Los individuos presentaron las mismas condiciones que los utilizados anteriormente. Se realizaron controles sin aplicación fúngica para cada aislamiento con dos réplicas. El experimento se repitió dos veces en diferentes tiempos.

Diariamente, fue registrado el número de insectos muertos y se confirmó la infección fúngica.

3.3.2. Variables registradas y análisis de datos

Se estimó la virulencia por medio de la concentración letal media (CL₅₀) del aislamiento seleccionado como el más eficiente para el control de *R. dominica*, la cual

se relaciona los datos de mortalidad con los de concentración. Se utilizó el análisis Probit y se analizó con la función "lc" descrita por Savi *et al.* (2017).

Los análisis se realizaron con el software R versión 4.0.3 (R Core Team, 2018).

Resultados

1. Selección del aislamiento para el control de adultos de *Rhyzopertha dominica*

1.1. Ensayo preliminar para la selección de los aislamientos

Los aislamientos de *B. bassiana* s.l. CEP 545, CEP 560, CEP 567, *M. robertsii* s.l. CEP 381 y CEP 401, *C. fumosorosea* s.str. CEP 303 y CEP 309 presentaron un porcentaje de germinación mayor que 95%. Sin embargo, los aislamientos de *B. bassiana* s.l. CEP 75, CEP 136, CEP 418, CEP 420, CEP 428, CEP 588, CEP 612, CEP 613 y CEP 614 no presentaron un porcentaje de germinación de conidios superior al 90%.

1.2. Evaluación de la mortalidad de *Rhyzopertha dominica* ocasionada por distintos aislamientos fúngicos

Los 10 aislamientos fúngicos, CEP 545, CEP 560, CEP 567, CEP 381, CEP 401, CEP 303, CEP 309, CEP 615, CEP 616 y CEP 617 (Tablas 1 y 2), ocasionaron la infección y la muerte de los adultos de *R. dominica*. Se observó el desarrollo externo de micelio con el color característico de cada aislamiento.

El porcentaje de mortalidad de *R. dominica* para los 10 aislamientos evaluados fue significativamente diferente ($P < 0,05$). Los resultados indican que la mayor mortalidad se observa con la aplicación de los aislamientos de *B. bassiana* s.l. En particular, CEP 545 ocasionó el 65%; seguido por CEP 560 (47,50%) y CEP 567 (65%). En contraste, los aislamientos de *M. anisopliae* s.l. y *C. fumosorosea* s.str.

ocasionaron un porcentaje de mortalidad inferior al 22%. La menor mortalidad se observó con la aplicación del aislamiento *M. robertsii* s.l. CEP 381 (8,8%) (Tabla 3).

Por otra parte, las curvas de supervivencia (Figura 5) mostraron que sólo los aislamientos *B. bassiana* s.l. CEP 545 y CEP 567 lograron ocasionar el 50% de mortalidad en los individuos de *R. dominica* a los 8 y 9 días posteriores a la aplicación del inóculo, respectivamente. Con el resto de los aislamientos no se alcanzaron estos porcentajes de mortalidad durante los 15 días que duró el ensayo.

Tabla 3. Mortalidad (%) (media \pm ES) y tiempo de supervivencia mediana (TSM \pm ES) de adultos de *R. dominica*.

Nº en la Colección	Especie	Mortalidad (%) \pm ES	TSM (días) \pm ES
CEP 545	<i>B. bassiana</i> s.l.	65,0 \pm 5,3 a ¹	8,0 \pm 0,5
CEP 560	<i>B. bassiana</i> s.l.	47,5 \pm 5,6 a	DN ²
CEP 567	<i>B. bassiana</i> s.l.	60,0 \pm 5,5 a	9,0 \pm 0,5
CEP 381	<i>M. robertsii</i> s.l.	8,8 \pm 3,2 b	DN
CEP 401	<i>M. robertsii</i> s.l.	10,0 \pm 3,4 b	DN
CEP 615	<i>M. anisopliae</i> s.l.	10,0 \pm 3,4 b	DN
CEP 616	<i>M. anisopliae</i> s.l.	21,3 \pm 4,6 b	DN
CEP 617	<i>M. anisopliae</i> s.l.	17,5 \pm 4,3 b	DN
CEP 303	<i>C. fumosorosea</i> s.str.	12,5 \pm 3,7 b	DN
CEP 309	<i>C. fumosorosea</i> s.str.	21,3 \pm 4,6 b	DN

¹ Letras iguales corresponden a grupos similares.

² DN: Dato no determinado

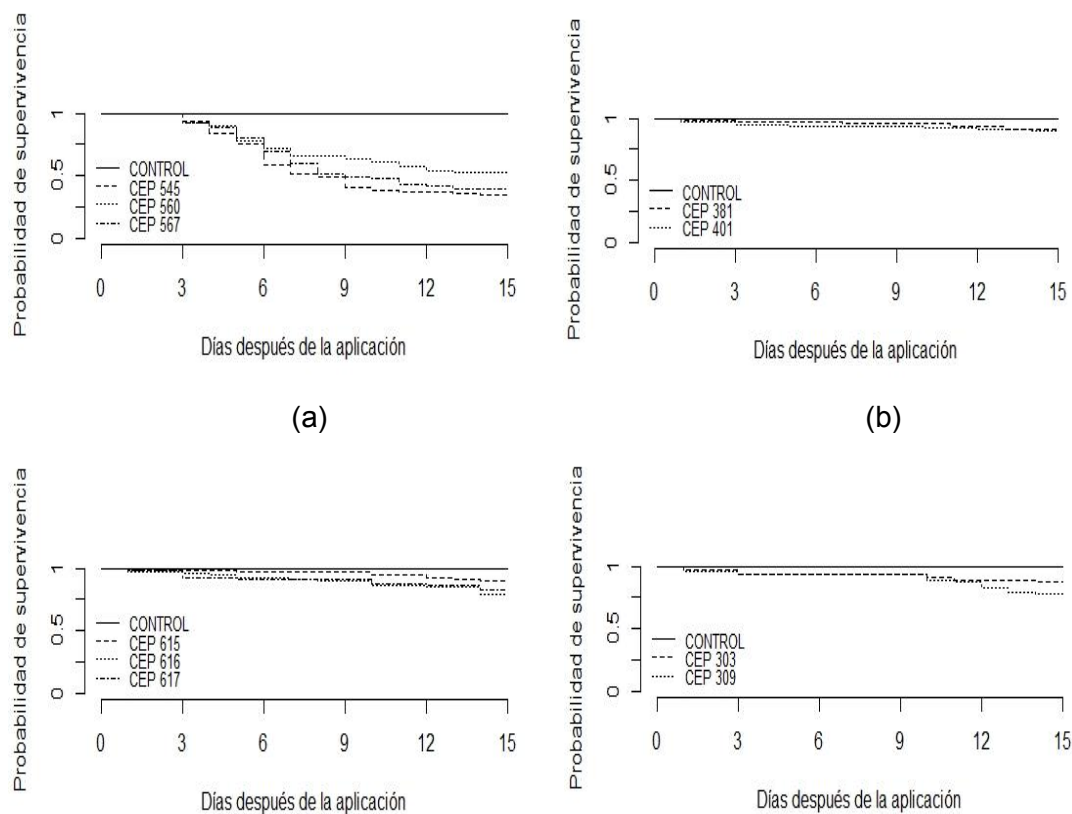


Figura 5. Tiempo de supervivencia de adultos de *R. dominica* tratados con aislamientos de (a) *B. bassiana* s.l.: CEP 545, CEP 560 y CEP 567; (b) *M. robertsii* s.l.: CEP 381 y CEP 401; (c) *M. anisopliae* s.l.: CEP 615, CEP 616 y CEP 617 y (d) *C. fumosorosea* s.str.: CEP 303 y CEP 309.

En función de los resultados expuestos, se puede indicar que el aislamiento de *B. bassiana* s.l. CEP 545 ocasionó el 65% de mortalidad en los adultos de *R. dominica* con un TSM de 8 días, lo cual destaca su eficiencia en el control de *R. dominica* y, por consiguiente, fue seleccionado para continuar con los futuros bioensayos.

1.3. Estimación de la virulencia

A medida que aumentó la concentración de los conidios del aislamiento *B. bassiana* s.l. CEP 545 se obtuvo un incremento en el porcentaje de mortalidad de los adultos de *R. dominica*. El valor máximo de mortalidad alcanzado fue de 78,8% con 1×10^{10} conidios/mL y el valor mínimo de 12,5% con 1×10^6 conidios/mL. La CL_{50} se estimó en $9,5 \times 10^9$ conidios/mL, 15 días después de la aplicación del hongo (Tabla 4).

Tabla 4. Mortalidad (%) (media \pm ES) de adultos de *R. dominica* tratados con *B. bassiana* s.l. CEP 545 a diferentes concentraciones.

Concentración (conidios/mL)	Mortalidad (%) \pm ES
Control	5,0 \pm 3,5 a ¹
1×10^6	12,5 \pm 3,7 a
1×10^7	30,0 \pm 5,1 ab
1×10^8	46,3 \pm 5,6 b
1×10^9	52,5 \pm 5,6 b
1×10^{10}	78,8 \pm 4,6 c

¹ Letras iguales corresponden a grupos similares.

Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que tres de los 10 aislamientos fúngicos evaluados fueron efectivos contra *R. dominica* en una concentración de 2×10^8 conidios/mL, tratados en condiciones de laboratorio. Los aislamientos de *B. bassiana* s.l. presentaron mayor virulencia, con respecto a los aislamientos de *M. robertsii* s.l., *M. anisopliae* s.l. y *C. fumosorosea* s.str.; además entre los aislamientos de *B. bassiana* s.l. hubo diferencias de mortalidad. De esta manera, se corroboró que los aislamientos seleccionados presentan variación de la virulencia sobre *R. dominica*. Padín *et al.* (1995) señalaron que los aislamientos de *B. bassiana* causaron alto porcentaje de mortalidad contra *R. dominica*, mientras que *M.*

anisopliae, *M. rileyi* y *Lecanicillium lecanii* ocasionaron un porcentaje de mortalidad inferior al 30%, comprobando que existe una variación interespecífica en el grado de virulencia entre los géneros de HE evaluados. Del mismo modo, Moino *et al.* (1998) indicaron diferencias en la mortalidad ocasionada por distintos aislamientos de la misma especie fúngica de *B. bassiana*, causando una mortalidad mayor que el 85% en el control *R. dominica*.

Los aislamientos de *B. bassiana* s.l. CEP 545 y CEP 567 ocasionaron una mortalidad del 50% sobre los adultos de *R. dominica* dentro de los 15 días que duró el ensayo (8 y 9 días, respectivamente). Los resultados de Mahdneshtin *et al.* (2009), utilizando aislamientos iraníes, mostraron un TL_{50} promedio de 7,77 para *B. bassiana* y de 7,86 para *M. anisopliae*. Otros reportes, Rice y Cogburn (1999) registraron una mortalidad de los individuos de *R. dominica* de 45%, 69% y 88% después de 7, 14 y 15 días, respectivamente, con la aplicación de *B. bassiana* (2×10^8 conidios g^{-1}). Se debe seleccionar aislamientos que produzcan una mortalidad más alta en el menor tiempo, desde la aplicación de los HE hasta la muerte del insecto, optimizando la eficiencia del programa de manejo integrado de plagas (MIP).

Adicionalmente, se comprobó que la concentración de los conidios de los hongos tiene un efecto sobre la mortalidad de los insectos y el tiempo de supervivencia. Esto concuerda con lo reportado por Mahdneshtin *et al.* (2009), quienes indicaron que en *R. dominica*, la mortalidad acumulada fue de 89,4% para las concentraciones más altas de *B. bassiana*, mientras que para las concentraciones más bajas de *M. anisopliae* fue de 14,8%. Estos parámetros, la concentración de los hongos y el tiempo de supervivencia, deben ser tenidos en cuenta para optimizar y favorecer la reducción de los costos.

El grado de virulencia de cada uno de los aislamientos está estrechamente relacionado con las características morfológicas y fisiológicas propias de cada aislamiento fúngico, como también de la especie a controlar (Aguilera, 2016). De esta manera, dicho autor ha demostrado que los aislamientos de *M. robertsii* s.l. CEP 381 y

CEP 401 han generado porcentajes de mortalidad cercana al 50% en ninfas de *Bemisia tabaci*. Sin embargo, en el presente estudio se observó que estos mismos aislamientos ocasionan un bajo porcentaje de mortalidad de 8,8% y 10% en adultos de *R. dominica*.

Los resultados presentados en este capítulo demostraron que algunos aislamientos de *B. bassiana* s.l., especialmente CEP 545, ocasionan altas tasas de mortalidad y bajo TSM. Si bien estos aislamientos podrían usarse potencialmente como agentes de control biológico de adultos de *R. dominica* en granos almacenados, es necesario realizar más investigaciones para desarrollar los mejores métodos de formulación que se utilizarán contra *R. dominica* en ensayos de campo.

La información suministrada en este capítulo ha sido publicada en el siguiente trabajo científico:

- **Musso, A.**, Marcondes de Almeida, J.E., Padín, S., Ordoqui, E., & Lopez Lastra, C.C. 2020. "Efficacy of entomopathogenic fungi against *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae) under laboratory conditions". Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Cuyo, 52(2), 317-324. <http://revistas.uncu.edu.ar/ojs/index.php/RFCA/article/view/2829>



**Capítulo III: Compatibilidad de hongos
entomopatógenos con productos
fitosanitarios**

Introducción

El uso excesivo y recurrente de PF en la agricultura ha provocado el desarrollo de resistencia de los organismos plaga a los insecticidas, mientras que elimina a los insectos benéficos (no blanco). Además, genera residuos químicos en los alimentos que son tóxicos para el humano y los animales (Arnaud *et al.*, 2005; Lacey *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2015). Debido a esto, en los últimos años, se ha promovido el desarrollo de medidas alternativas para el control de plagas y enfermedades.

Entre ellas se encuentran los HE, que son utilizados para controlar y reducir las poblaciones de plagas en la postcosecha. Una estrategia para reducir la utilización de los PF es la combinación con HE. Varios estudios han evaluado la combinación de HE y PF para ser usados en programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP) (Batista Filho *et al.*, 2001; Neves *et al.*, 2001; Tamai *et al.*, 2002). Esta combinación permite reducir la cantidad de insecticidas aplicados, disminuyendo las concentraciones, favoreciendo la eficiencia del control de plagas, para minimizar los peligros para la salud humana y animal y la contaminación ambiental (Quintela y McCoy, 1997; Moino y Alves, 1998; Sosa Gómez, 2005; Cazorla y Morales -Moreno 2010).

Previo a la recomendación de una combinación, se requiere el conocimiento y evaluación de la acción de estos productos sobre los microorganismos (Loureiro *et al.*, 2002). La toxicidad de estos productos sobre HE puede variar con las especies y los aislamientos de los hongos, la naturaleza química del ingrediente activo, el modo de acción, el tipo de formulación y la concentración del producto, así como con las condiciones ambientales (Pessoa *et al.*, 2020). Estos factores inhiben el crecimiento vegetativo de los hongos y la supervivencia de los conidios alterando la virulencia de HE (Anderson y Roberts 1983; Alves *et al.*, 2008).

En el presente capítulo fueron estudiados los efectos de dos PF comúnmente utilizados en Argentina y Brasil combinados con distintas especies de HE.

Materiales y métodos

1. Evaluación de la compatibilidad entre hongos entomopatógenos y los productos fitosanitarios

La puesta a punto de las técnicas para la evaluación de compatibilidad se realizó en la Unidad Laboratorio de Referencia (ULR) de Control Biológico del Centro Avanzado de Investigación en Protección de Plantas y Salud Animal (CAPSA) del Instituto Biológico, ubicado en Campinas, San Pablo, Brasil.

1.1. Hongos entomopatógenos *in vitro*

Los HE utilizados en este estudio se obtuvieron de la Colección de Hongos Entomopatógenos Oldemar Cardim Abreu de la ULR de Control Biológico del CAPSA del Instituto Biológico: *Beauveria bassiana* s.l. IBCB 66, *Metarhizium. anisopliae* s.l. IBCB 425 y *Purpureocillium lilacinum* s.l. IBCB 130 (Tabla 1). Los aislamientos nativos de Brasil se cultivaron en papa dextrosa agar (PDA) (Anexo) y se incubaron a 25 ± 2°C, 60%HR y un fotoperíodo de 12:12 h durante 14 días.

Tabla 1. Especie, fuente de aislamiento y lugar de recolección de los hongos entomopatógenos.

Número de colección	Especie	Fuente de aislamiento	Lugar de Recolección
IBCB 66	<i>B. bassiana</i> s.l.	<i>Hypothenemus hampei</i>	São José do Rio Pardo – San Pablo (SP) 21°35'44" S, 46°53'19" O
IBCB 425	<i>M. anisopliae</i> s.l.	Suelo	Iporanga – SP 24°35'14" S, 48°35'41" O
IBCB 130	<i>P. lilacinum</i> s.l.	Suelo	Florínea – SP 22°54'12"S, 50°44'16" O

1.2. Productos fitosanitarios

Los PF utilizados en este estudio están registrados y se recomiendan comúnmente para el control de insectos plaga en postcosecha de granos en Argentina y Brasil (Tabla 2).

Tabla 2. Lista de productos fitosanitarios utilizados para el control de insectos plaga en granos almacenados en Argentina y Brasil.

Origen	Ingrediente Activo	Grupo químico	Nombre comercial	Formulación ¹	Dosis recomendada ²
Argentina	Pirimifós metil	Fosforado	ACTELLIC 50®	EC	6-10 mL/L
	Pirimifós metil + Lambdacialotrina	Fosforado + Piretroide	ACTELLIC PLUS®	EC + SC	Parte 1: 8 cm ³ /L + Parte 2: 2cm ³ /L
Brasil	Pirimifós metil	Fosforado	ACTELLIC 500®	EC	8-16 mL/ L
	Lambdacialotrina	Piretroide	ACTELLICLAMBDA®	SC	7-10 mL/ L

¹ Tipo de Formulación: EC = concentrado emulsionable, SC = suspensión concentrada.

² Información provista por el fabricante.

Los tratamientos de los PF evaluados fueron: Pirimifós metil 6 mL/L (PM6mL/L), pirimifós metil 10 mL/L (PM10mL/L), pirimifós metil 16 mL/L (PM16mL/L), pirimifós metil 8 mL/L + Lambdacialotrina 2 mL/L (PM8mL+L2mL/L) y lambdacialotrina 7 mL/L (L7mL/L). Las cantidades (mL/L) se refieren al producto comercial.

1.3. Evaluación de la germinación: Prueba de caldo

En el primer experimento *in vitro*, 1 mL de cada tratamiento de PF fue disuelto en 200 mL de agua destilada estéril con Tween 80 al 0,01% (v / v) (polisorbato de sodio). Se le agregó 1 mL de conidios fúngicos de 2×10^8 conidios/mL de *B. bassiana* s.l., *M. anisopliae* s.l. o *P. lilacinum* s.l., mezclados por separado, formando tres suspensiones diferentes. El control presentó conidios fúngicos de cada uno de los tres aislamientos sin el agregado de PF. Las suspensiones (conidios + PF) fueron homogeneizadas con agitación en vórtex durante 2 minutos y se mantuvo en reposo absoluto por una hora, bajo la cámara de flujo laminar encendida. Dicho tiempo se determinó a partir de pruebas preliminares.

Luego, una alícuota de 0,1 mL de cada suspensión fue sembrada en cinco placas de Petri estériles (90 mm de diámetro) con PDA, siendo esparcida uniformemente con la ayuda de una espátula de Drigalsky e incubados a 25 ± 2 °C, 60%HR y un fotoperíodo de 12:12 h. El porcentaje de germinación de los conidios fue calculado después de 18 h del período de incubación. Las placas de Petri fueron observadas bajo el microscopio y se cuantificó el número de conidios germinados y no germinados. Se consideró germinado al conidio cuando la longitud del tubo germinativo alcanzó la mitad de la longitud de la espora (adaptado de Rossi-Zafal *et al.*, 2008). Se realizaron cinco réplicas por tratamiento, incluido el control con conidios fúngicos sin PF. El experimento se repitió dos veces en el tiempo.

1.4. Evaluación de la compatibilidad: Índice Biológico (IB)

La compatibilidad entre los diferentes tratamientos de PF y los HE fue determinada *in vitro*. Para ello, cada tratamiento de PF fue incorporado al PDA (esterilizado mediante uso de autoclave a 120°C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos) antes de su solidificación, a una T° aproximada de 40-45 °C, y previo al plaqueo. La mezcla fue vertida en cinco placas de Petri esterilizadas descartables (90

mm de diámetro). Posteriormente a la solidificación, *B. bassiana* s.l., *M. anisopliae* s.l. o *P. lilacinum* s.l. se inocularon con un ansa de platino en tres puntos equidistantes por placa en la superficie del medio. El control se realizó sin el agregado de los tratamientos de los PF al medio de cultivo. Las placas se incubaron a 25 ± 2 °C, 60%HR y un fotoperíodo de 12:12 h. El experimento se repitió dos veces en diferentes tiempos. Después de 14 días de incubación, para determinar el crecimiento vegetativo (CV) se realizaron dos medidas diametralmente opuestas para cada colonia fúngica, empleando una regla milimétrica.

Luego, las colonias fúngicas fueron cortadas con un bisturí y transferidas individualmente a un tubo de vidrio estéril con 10 mL de agua destilada estéril y Tween 80 al 0,01% (v / v) (polisorbato de sodio). Los conidios de la colonia se disgregaron del PDA con agitación en vórtex durante 2 minutos. Se realizaron diluciones sucesivas hasta obtener la suspensión deseable para la cuantificación de la esporulación (ESP) usando un hemocitómetro (cámara de Neubauer). Al mismo tiempo se tomó una alícuota de la suspensión obtenida y se sembró en placas de Petri para determinar el porcentaje de germinación de los conidios (GER) utilizando la metodología descrita anteriormente (adaptado de Rossi-Zafal *et al.*, 2008).

Para la evaluación del efecto de las formulaciones de PF sobre HE, Rossi-Zafal *et al.* (2008) han propuesto utilizar una expresión matemática denominada Índice Biológico (IB), basado en el porcentaje del crecimiento vegetativo (diámetro de la colonia) (CV), porcentaje de esporulación (ESP) y porcentaje de germinación (GER) de las colonias fúngicas con relación al control. $IB = [47 (CV) + 43 (ESP) + 10 (GER)] / 100$. Los límites establecidos son: Tóxico (T)= 0 a 41; moderadamente tóxico (MT) 44 a 66 y compatible (C) => 66.

1.5. Evaluación de las unidades formadoras de colonias (UFCs): Compatibilidad de HE y PF sobre granos de trigo

Los conidios fueron inoculados sobre la superficie de 15 g de granos de trigo en placas de Petri con la aplicación por separado de 1 mL de 2×10^8 conidios/mL de cada uno de los aislamientos de HE: *B. bassiana* s.l., *M. anisopliae* s.l. o *P. lilacinum* s.l., utilizando la torre de Potter (Burkard Manufacturing Ltd, Mod. 1, England). Después de una hora, todos los tratamientos de PF fueron aplicados sobre los granos previamente inoculados con cada HE. Dicho tiempo se determinó a partir de pruebas preliminares. El control presentó conidios fúngicos de cada uno de los tres aislamientos sin el agregado de PF. Se realizaron 5 réplicas por tratamiento. A continuación de la aplicación, se incubó bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

El tiempo de persistencia del HE sobre los granos, definido como el tiempo que el propágulo fúngico permanece viable sobre los granos (Pinto, 2016); fue evaluado a las 24, 48 y 72 h. Para ello, se recogió al azar 1 g de trigo de cada placa de Petri, se diluyó en 10 mL de agua destilada estéril con Tween 80 al 0,01% (v / v) (polisorbato de sodio) y se homogeneizó en vórtex durante 2 minutos. Luego, fueron inoculados 0,1 mL de cada dilución en placas de Petri (90 mm) con PDA previamente suplementado con pentabiótico 0,5 mg/L (Anexo), como antibacteriano, esparcido uniformemente mediante el uso de una espátula de Drigalsky. Fue incubado durante 4 días en las mismas condiciones descritas en el ensayo anterior. Posteriormente, se cuantificó el número de colonias para obtener las unidades formadoras de colonias (UFCs). El ensayo se repitió dos veces en el tiempo.

Se calculó el porcentaje de variación de las UFCs entre los distintos tiempos evaluados de la persistencia de los HE sobre los granos. La variación aumenta con valores positivos, en cambio, la variación disminuye con valores negativos.

1.6. Variables registradas y análisis de datos

Para cada uno de los tres aislamientos, las variables analizadas fueron el GER, el CV y la ESP. En cada caso se estudiaron las diferencias entre los distintos tratamientos de los PF. Fue verificado que los datos cumplen las hipótesis de normalidad y homogeneidad de varianza con Test de Shapiro–Wilk y Test Levene, respectivamente. Cuando fueron alcanzados los supuestos se usó la prueba de ANOVA F, pero en aquellos casos que no se alcanzaron se usó Test de ANOVA Welch (con normalidad y heterogeneidad de varianza), Kruskal–Wallis (con no normalidad y homogeneidad de varianza) o Test Fisher–Pitman permutation (no normalidad y heterogeneidad de varianza). Los análisis post-hoc correspondientes a cada una de las situaciones fueron Tukey HSD, T-test para diferencia de pares, Wilcoxon y diferencia de a pares con permutaciones. Las pruebas globales se consideraron significativas con $P < 0,05$. En el caso de comparaciones múltiples fue considerada una significancia de 5% para Tukey HSD, mientras que, para las restantes pruebas, se ajustaron los P empleando el método de Benjamini Hochberg.

Para el análisis del logaritmo del número de UFCs, el diseño experimental utilizado fue ANOVA de tres factores ($P < 0,05$), con las interacciones: aislamiento, tratamiento de PF y tiempo. Se analizaron los coeficientes η^2 parciales para indicar el aporte de cada factor a la variabilidad de la UFCs; en donde valores de η^2 parciales $>0,14$ corresponde a un aporte alto y valores $<0,6$ a un aporte bajo (Maxwell *et al.*, 2018).

Todos los cálculos fueron realizados con R versión 4.3.0. (R Core Team, 2023).

2. Evaluación de la compatibilidad entre el aislamiento seleccionado y los productos fitosanitarios

A partir de los ensayos preliminares realizados en la ULR de Control Biológico del CAPSA del Instituto Biológico, se evaluó la compatibilidad con el aislamiento seleccionado previamente en el Capítulo II (*B. bassiana* s.l. CEP 545). Se seleccionó el aislamiento *B. bassiana* s.l. CEP 545 dado que ocasionó mayor eficiencia contra *R. dominica*.

2.1. Productos fitosanitarios

Los PF utilizados en este estudio fueron los mismos que en la **Sección 1.2.** (Tabla 2). Los tratamientos de PF evaluados fueron: Pirimifós metil 6 mL/L (PM6mL/L), pirimifós metil 3 mL/L (PM3mL/L), pirimifós metil 1,8 mL/L (PM1.8mL/L), pirimifós metil 8 mL/L + Lambdacialotrina 2 mL/L (PM8mL+L2mL/L), pirimifós metil 4 mL/L + Lambdacialotrina 1 mL/L (PM4mL+L1mL/L) y pirimifós metil 2,4 mL/L + Lambdacialotrina 0,6 mL/L (PM2.4mL+L0.6mL/L). Las cantidades (mL/L) se refieren al producto comercial. Los tratamientos de PF fueron seleccionados a partir de los resultados obtenidos en la ULR de Control Biológico del CAPSA del Instituto Biológico.

2.2. Evaluación de la germinación: Prueba de caldo

La técnica se realizó con la misma metodología de la **Sección 1.3.**, en donde 1 mL de cada tratamiento de PF fue disuelto en 200 mL de agua destilada estéril con Tween 80 al 0,01% (v / v) (polisorbato de sodio). Luego, se le agregó 1 mL de 2×10^8 conidios/mL de *B. bassiana* s.l. CEP 545. El control presentó sólo conidios sin el agregado de PF. Las suspensiones (conidios + PF) fueron homogeneizadas con agitación en vórtex durante 2 minutos y se mantuvo en reposo absoluto por una hora, bajo la cámara de flujo laminar encendida. Dicho tiempo se determinó a partir de pruebas preliminares.

Luego, una alícuota de 0,1 mL de cada suspensión fue sembrada en placas de Petri estériles (90 mm de diámetro) con APG, siendo esparcida uniformemente con la ayuda de una espátula de Drigalsky y se incubaron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. El porcentaje de germinación de los conidios fue calculado después de 18 h del período de incubación. Las placas de Petri fueron observadas bajo el microscopio y se cuantificó el número de conidios germinados y no germinados. Se consideró germinado al conidio cuando la longitud del tubo germinativo alcanzó la mitad de la longitud de la espora (adaptado de Rossi-Zafal *et al.*, 2008). Se realizaron cinco réplicas por tratamiento, incluido el control con conidios fúngicos sin PF. El experimento se repitió tres veces en el tiempo.

2.3. Evaluación de las unidades formadoras de colonias (UFCs): Compatibilidad entre el aislamiento seleccionado y los PF sobre granos de trigo

Las inoculaciones de los conidios se realizaron con 1 mL de *B. bassiana* s.l. CEP 545 en una concentración de 2×10^8 conidios mL/L sobre la superficie de 15 g de granos de trigo en placas de Petri, utilizando un aerógrafo (FENGDA, BD-180, China). Después de una hora, los tratamientos de PF se aplicaron del mismo modo. Dicho tiempo se determinó a partir de pruebas preliminares. El control presentó sólo conidios sin el agregado de PF. Se realizaron 5 réplicas por tratamiento. A continuación de la aplicación, se incubaron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. A partir de los resultados obtenidos en la ULR de Control Biológico del CAPSA del Instituto Biológico, el tiempo de persistencia del HE sobre los granos fue evaluado a las 24 y 48 h. Luego, se procedió a realizar la misma metodología de la **Sección 1.5.** y se cuantificó el número de colonias para la obtención de las UFCs. El ensayo se repitió tres veces en el tiempo.

2.4. Variables registradas y análisis de datos

La variable analizada fue el GER. Se estudiaron las diferencias entre los distintos tratamientos de los PF y se verificó si los datos cumplen las hipótesis de normalidad y homogeneidad de varianza. Se aplicó las mismas metodologías y pruebas que en la **Sección 1.6**.

Para el análisis del logaritmo del número de UFCs, el diseño experimental utilizado fue ANOVA de dos factores ($P < 0,05$), con las interacciones: tratamiento de PF y tiempo (Maxwell *et al.*, 2018).

Todos los cálculos fueron realizados con R versión 4.3.0. (R Core Team, 2023).

Resultados

1. Evaluación de la compatibilidad entre hongos entomopatógenos y los productos fitosanitarios

1.1. Evaluación de la germinación: Prueba de caldo

Los resultados obtenidos en el GER de *B. bassiana* s.l. IBCB 66, *M. anisopliae* s.l. IBCB 425 y *P. lilacinum* s.l. IBCB 130 tratados con diferentes tratamientos de PF se muestran en la tabla 3. Según el análisis, todos los PF evaluados redujeron significativamente la germinación de los conidios de los tres aislamientos respecto al control (IBCB 66: $F_5=495,5$; $P < 2,2 \times 10^{-16}$; IBCB 425: $F_5=245,62$; $P < 2,2 \times 10^{-16}$; IBCB 130: $F_5=67,46$; $P < 2,2 \times 10^{-16}$). En particular, en el tratamiento con el ingrediente activo pirimifós metil a diferentes concentraciones, se observó una reducción gradual en el GER a medida que aumentó la concentración. El tratamiento PM16mL/L redujo en mayor medida el GER del aislamiento de *B. bassiana* s.l. y *M. anisopliae* s.l. Los tratamientos PM8mL+L2mL/L y L7mL/L resultaron ser los más compatibles, ocasionando menor inhibición en la germinación de los aislamientos.

Tabla 3. Porcentaje de germinación (media \pm ES) de *B. bassiana* s.l. IBCB 66, *M. anisopliae* s.l. IBCB 425 y *P. lilacinum* s.l. IBCB 130 con diferentes tratamientos de PF.

Tratamientos ¹	IBCB 66	IBCB 425	IBCB 130
Control	91,4 \pm 2,6 a ²	87,5 \pm 2,08 a	93,0 \pm 2 a
PM6mL/L	54,9 \pm 1,6 b	13,2 \pm 2,08 c	45,8 \pm 3,3 cd
PM10mL/L	22,7 \pm 3 c	7,9 \pm 1,3 c	38,1 \pm 2,4 d
PM16mL/L	4,2 \pm 0,5 d	5,6 \pm 1,09 c	22,9 \pm 2,4 e
PM8mL+L2mL/L	51,5 \pm 2,5 b	37,4 \pm 3,7 b	50,6 \pm 3,6 bc
L7mL/L	54,0 \pm 1,3 b	44,5 \pm 4,09 b	61,0 \pm 2,0 b

¹ Control= Tratamiento control, PM6mL/L= pirimifós metil 6 mL/L, PM10mL/L= pirimifós metil 10 mL/L, PM16mL/L= pirimifós metil 16 mL/L, PM8mL+L2mL/L= pirimifós metil 8 mL/L + Lambdacialotrina 2 mL/L, L7mL/L= lambdacialotrina 7 mL/L.

² Media seguida por letras diferentes dentro de cada columna es significativamente diferente ($P < 0,05$).

1.2. Evaluación de la compatibilidad: Índice Biológico (IB)

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos para IB: CV, ESP y GER de *B. bassiana* s.l. IBCB 66, *M. anisopliae* s.l. IBCB 425 y *P. lilacinum* s.l. IBCB 130 con diferentes tratamientos de PF. Todos los aislamientos evaluados mostraron diferencias significativas en las tres variables evaluadas entre los tratamientos de PF y el control (IBCB 66: CV: $X^2_5=92,21$, $P= < 2,0 e^{-4}$; ESP: $X^2_5=90,06$, $P= < 2,0 e^{-4}$; GER: $F_5=40,44$, $P=5,0e^{-14}$; IBCB 425: CV: $X^2_5=76,16$, $P= < 2,0 e^{-4}$; ESP: $X^2_5=78,18$, $P= < 2,0 e^{-4}$; GER: $F_5=68,30$, $P=< 2,2 e^{-16}$; IBCB 130: CV: $X^2_5=83,61$, $P= < 2,0 e^{-4}$; ESP: $X^2_5=76,81$, $P= < 2,0 e^{-4}$; GER: $X^2_5=90,03$, $P=< 2,0 e^{-4}$).

El CV de los tres aislamientos disminuyó frente a todos los PF (Figura 1). El diámetro menor, con respecto al control (IBCB 66: 28,2 mm; IBCB 425: 29,3 mm; IBCB 130: 34,8 mm), se observó en los tratamientos PM16mL/L (IBCB 66: 6,0 mm; IBCB 425: 9,7 mm; IBCB 130: 7,6 mm) y PM8mL+L2mL/L (IBCB 66: 6,0 mm; IBCB 425: 11,4 mm; IBCB 130: 7,1 mm), luego de PM10mL/L (IBCB 66: 7,9 mm; IBCB 425: 11,3 mm;

IBCB 130: 9,7 mm) y PM6mL/L (IBCB 66: 8,0 mm; IBCB 425: 11,6 mm; IBCB 130: 12,5 mm), seguido de L7mL/L (IBCB 66: 20,1 mm; IBCB 425: 17,0 mm; IBCB 130: 16,2 mm) (Tabla 4).

La ESP de todos los aislamientos disminuyó frente a los PF evaluados, con respecto al control. En *B. bassiana* s.l., la mayor ESP media se observó con la aplicación del tratamiento L7mL/L ($299,8 \times 10^6$ conidios/mL), seguida de los tratamientos PM6mL/L ($8,5 \times 10^6$ conidios/mL) y PM10mL/L ($10,1 \times 10^6$ conidios/mL), pero superiores a PM16mL/L ($4,3 \times 10^6$ conidios/mL) y PM8mL+L2mL/L ($6,6 \times 10^6$ conidios/mL). Al igual en *M. anisopliae* s.l., la mayor ESP media se observó con la aplicación de L7mL/L ($108,1 \times 10^6$ conidios/mL), seguida de los tratamientos PM6mL/L ($1,0 \times 10^6$ conidios/mL) y PM10mL/L ($13,3 \times 10^6$ conidios/mL), pero superiores a PM16mL/L ($4,1 \times 10^6$ conidios/mL) y PM8mL+L2mL/L ($3,2 \times 10^6$ conidios/mL). Finalmente, en *P. lilacinum* s.l., la mayor ESP media se observó con la aplicación de con la aplicación del tratamiento L7mL/L ($12,0 \times 10^6$ conidios/mL), seguida de PM6mL/L ($5,8 \times 10^6$ conidios/mL), pero superiores a PM16mL/L ($1,8 \times 10^6$ conidios/mL), PM10mL/L ($2,0 \times 10^6$ conidios/mL) y PM8mL+L2mL/L ($1,0 \times 10^6$ conidios/mL).

El GER en todos los aislamientos presentó una disminución frente a los PF, en comparación con el control, excepto el tratamiento L7mL/L en *M. anisopliae* s.l. y *P. lilacinum* s.l. En *B. bassiana* s.l., la GER media se observó reducida en mayor medida con la aplicación del tratamiento PM16mL/L (66,6%), PM10mL/L (69,8%) y PM6mL/L (70,7%) con respecto a los tratamientos PM8mL+L2mL/L (71,8%) y L7mL/L (81,8%). En *M. anisopliae*, la GER media se observó reducida en mayor medida con la aplicación del tratamiento PM16mL/L (47,1%), seguida de PM10mL/L (61,3%) y PM6mL/L (64,3%) con respecto al tratamiento PM8mL+L2mL/L (80,7%). Finalmente, en *P. lilacinum* s.l., la GER media se observó reducida en mayor medida con la aplicación de PM10mL/L (31,5%) y PM16mL/L (33,2%), seguida de PM6mL/L (44,8%) con respecto al tratamiento PM8mL+L2mL/L (73,1%) (Tabla 4).

De acuerdo con los valores de IB, según Rossi-Zafal *et al.* (2008), se puede considerar que los PF no fueron compatibles con *B. bassiana* s.l., *M. anisopliae* s.l. y *P. lilacinum* s.l. En los tratamientos PM6mL/L, PM10mL/L, PM16mL/L, PM8mL+L2mL/L se observó un rango de valores del IB de 13,9 a 39,4, considerándose tratamientos tóxicos (T) en los tres aislamientos evaluados. Sólo el tratamiento L7mL/L fue moderadamente tóxico (MT) sobre *B. bassiana* s.l. con valores de IB de 45,1 (Tabla 4).

El tratamiento L7mL/L fue T en los aislamientos *M. anisopliae* s.l. y *P. lilacinum* s.l., y MT en *B. bassiana* s.l. Asimismo, redujo el CV y ESP sin interferir en el GER de *M. anisopliae* s.l. ni de *P. lilacinum* s.l.

Tabla 4. Índice Biológico (IB): Diámetro de la colonia (media \pm ES), esporulación (media \pm ES) y porcentaje de germinación (media \pm ES) de *B. bassiana* s.l. IBCB 66, *M. anisopliae* s.l. IBCB 425 y *P. lilacinum* s.l. IBCB 130 con diferentes tratamientos de PF.

Tratamientos ¹	Diámetro de la Colonia		Esporulación		Germinación		Valores del IB Clasificación ⁴
	(mm)	Reducción (%) ^c	$n \times 10^3$	Reducción (%)	(%)	Reducción (%)	
IBCB 66							
Control	28,2 \pm 0,9 a ²		4762,6 \pm 815,1 a		92,8 \pm 1,0 a		
PM6mL/L	8,0 \pm 0,2 c	(-71,8)	8,5 \pm 1,7 c	(-99,8)	70,7 \pm 2,0 c	(-23,7)	21,0 T
PM10mL/L	7,9 \pm 0,2 c	(-72,0)	10,1 \pm 2,0 c	(-99,8)	69,8 \pm 2,5 c	(-24,7)	20,7 T
PM16mL/L	6,0 \pm 0,3 d	(-78,6)	4,3 \pm 0,5 d	(-99,9)	66,6 \pm 2,5 c	(-28,2)	17,3 T
PM8mL+L2mL/L	6,0 \pm 0,9 d	(-78,7)	6,6 \pm 3,5 d	(-99,9)	71,8 \pm 6,2 bc	(-22,6)	17,8 T
L7mL/L	20,1 \pm 1,4 b	(-28,6)	299,8 \pm 103,5 b	(-93,7)	81,8 \pm 1,1 b	(-11,8)	45,1 MT
IBCB 425							
Control	29,3 \pm 1,2 a		1710,8 \pm 201,1 a		93,3 \pm 0,8 a		
PM6mL/L	11,6 \pm 0,4 c	(-60,4)	1,0 \pm 1,6 c	(-99,4)	64,3 \pm 3,4 c	(-31,0)	25,8 T
PM10mL/L	11,3 \pm 0,5 cd	(-61,6)	13,3 \pm 3,3 c	(-99,2)	61,3 \pm 2,7 c	(-34,2)	24,9 T
PM16mL/L	9,7 \pm 0,6 d	(-66,8)	4,1 \pm 0,7 d	(-99,8)	47,1 \pm 3,4 d	(-49,5)	20,8 T
PM8mL+L2mL/L	11,4 \pm 1,0 cd	(-61,0)	3,2 \pm 1,5 d	(-99,8)	80,7 \pm 1,4 b	(-13,4)	27,1 T
L7mL/L	17,0 \pm 1,9 b	(-41,9)	108,1 \pm 89,9 b	(-93,7)	87,7 \pm 1,6 ab	(-5,9)	39,4 T
IBCB 130							
Control	34,8 \pm 1,7 a		1162,63 \pm 250,5 a		92,0 \pm 1,0 a		
PM6mL/L	12,5 \pm 0,4 c	(-64,2)	5,83 \pm 0,9 c	(-99,5)	44,8 \pm 3,2 c	(-51,3)	21,9T
PM10mL/L	9,7 \pm 0,4 d	(-72,1)	2,04 \pm 0,4 d	(-99,8)	31,5 \pm 2,7 d	(-65,8)	16,6 T
PM16mL/L	7,6 \pm 0,5 e	(-78,2)	1,83 \pm 0,6 d	(-99,8)	33,2 \pm 3,1 d	(-63,9)	13,9 T
PM8mL+L2mL/L	7,1 \pm 0,7 e	(-79,6)	1,02 \pm 1,6 d	(-99,9)	73,1 \pm 1,4 b	(-20,5)	17,6 T
L7mL/L	16,2 \pm 1,8 b	(-53,4)	12,02 \pm 3,5 b	(-99,0)	91,3 \pm 1,8 a	(-0,8)	32,7 T

¹ Control= Tratamiento control, PM6mL/L= pirimifós metil 6 mL/L, PM10mL/L= pirimifós metil 10 mL/L, PM16mL/L= pirimifós metil 16 mL/L, PM8mL+L2mL/L= pirimifós metil 8 mL/L + Lambdacialotrina 2 mL/L, L7mL/L= lambdacialotrina 7 mL/L.

² Media seguida por letras diferentes dentro de cada columna es significativamente diferente (P < 0,05).

³ Ecuación= Reducción (%): [Media de los tratamientos/Media del control) x 100]-100.

⁴ Valores del IB (Rossi-Zalaf *et al.* 2008). Tóxico=0– 41(T); Moderadamente Tóxico 42–66 (MT) y Compatible= >66 (C).

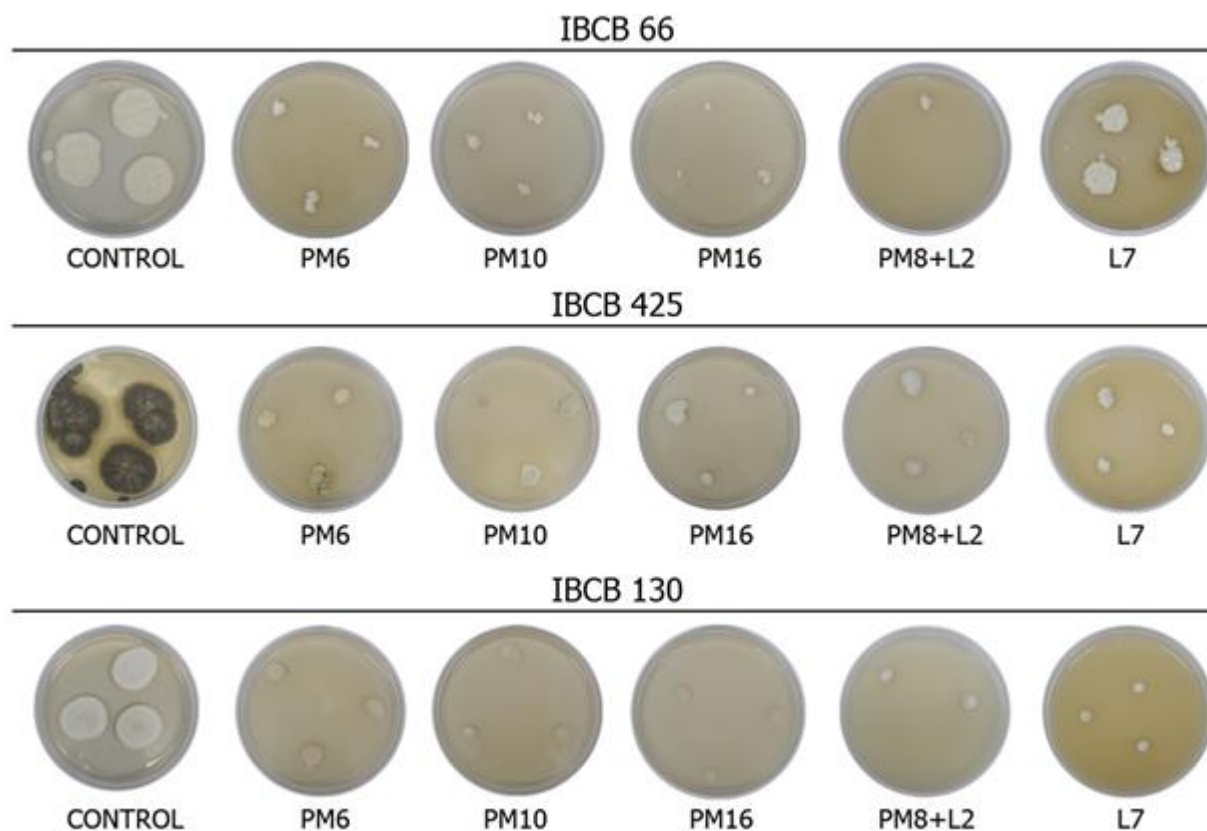


Figura 1. Crecimiento vegetativo (Diámetro de la colonia) de *B. bassiana* s.l. IBCB 66, *M. anisopliae* s.l. IBCB 425 y *P. lilacinum* s.l. IBCB 130 con diferentes tratamientos de PF: Control= Tratamiento control, PM6= pirimifós metil 6 mL/L, PM10= pirimifós metil 10 mL/L, PM16= pirimifós metil 16 mL/L, PM8+L2= pirimifós metil 8 mL/L + Lambdacialotrina 2 mL/L, L7= lambdacialotrina 7 mL/L.

1.3. Evaluación de las unidades formadoras de colonias (UFCs): Compatibilidad de HE y PF sobre granos de trigo

Los resultados obtenidos en UFCs de *B. bassiana* s.l. IBCB 66, *M. anisopliae* s.l. IBCB 425, y *P. lilacinum* s.l. IBCB 130 con diferentes tratamientos de PF evaluados a las 24, 48 y 72 h se muestran en la tabla 5. Entre los diferentes tiempos evaluados, la variación porcentual negativa en el aislamiento de *B. bassiana* s.l. fue de 2 a 50% y en *M. anisopliae* s.l. 10 a 59%, mientras que en *P. lilacinum* s.l. 0 a 25% (Tabla 5).

En el ANOVA no se observaron efectos significativos en la interacción entre aislamiento, tratamiento de PF y tiempo ($F_{20}=1,12$, $P=0,32$) ni tampoco en la interacción entre los tratamientos de PF y el tiempo ($F_{10}=0,60$, $P=0,82$). Sin embargo, se mostraron efectos significativos ($P < 0,05$) en los factores aislamiento ($F_2=364,04$, $P=0,00$), tratamientos de PF ($F_5=2,61$, $P=0,02$) y tiempo ($F_2=17,67$, $P=0,00$). Como así también, se encontró un efecto significativo en las interacciones aislamiento y tratamiento de PF ($F_4=13,80$, $P=0,00$) y, aislamiento y tiempo ($F_4=3,12$, $P=0,02$) (Tabla 6).

Si bien los efectos del factor aislamiento, y la interacción aislamiento y tratamiento de PF fueron significativos, en el análisis de los coeficientes η^2 parciales, el aporte a la variabilidad de las UFCs fue alto ($>0,14$). En cambio, si bien el efecto de la interacción entre el aislamiento y tiempo fue significativo, el aporte a la variabilidad fue bajo ($<0,6$) (Tabla 7).

Tabla 5. Unidades formadoras de colonia (media \pm ES) de *B. bassiana* s.l. IBCB 66, *M. anisopliae* s.l. IBCB 425 y *P. lilacinum* s.l. IBCB 130 con diferentes tratamientos de PF evaluados a las 24, 48 y 72 h (tiempo de persistencia en los granos de trigo).

Tratamiento ¹	Unidad Formadora de Colonia					
	24h ²	48h	72h	Variación ³ 24h-48h%	Variación 24h-72h%	Variación 48h-72h%
IBCB 66						
Control	138,9 \pm 20,7	131,1 \pm 22,3	84,0 \pm 32,6	(-5,6)	(-39,5)	(-35,9)
PM6mL/L	121,1 \pm 29,7	118,7 \pm 31,9	68,8 \pm 14,9	(-2,0)	(-43,2)	(-42,0)
PM10mL/L	147,1 \pm 33,8	73,9 \pm 21,4	121,8 \pm 32,6	(-49,8)	(-17,2)	64,8
PM16mL/L	153,0 \pm 33,4	116,8 \pm 32,3	117,4 \pm 26,4	(-23,7)	(-23,3)	0,5
PM8mL+L2mL/L	144,2 \pm 25,0	131,7 \pm 13,2	99,4 \pm 4,5	(-8,7)	(-31,1)	(-24,5)
L7mL/L	132,5 \pm 18,9	139,7 \pm 12,4	120,0 \pm 9,4	5,4	(-9,4)	(-14,1)
IBCB 425						
Control	48,5 \pm 10,1	30,1 \pm 4,5	20,9 \pm 2,0	(-38,1)	(-57,0)	(-30,4)
PM6mL/L	66,1 \pm 9,1	34,8 \pm 7,1	31,3 \pm 3,6	(-47,4)	(-52,6)	(-10,1)
PM10mL/L	48,9 \pm 7,4	54,7 \pm 6,0	22,6 \pm 2,2	11,9	(-53,8)	(-58,7)
PM16mL/L	42,1 \pm 4,1	32,4 \pm 4,6	24,2 \pm 1,8	(-23,0)	(-42,5)	(-25,3)
PM8mL+L2mL	16,4 \pm 2,2	9,8 \pm 1,1	12,4 \pm 1,8	(-40,2)	(-24,4)	26,5
L7mL/L	19,0 \pm 2,9	13,3 \pm 2,0	11,2 \pm 1,8	(-30,0)	(-41,1)	(-15,8)
IBCB 130						
Control	132,0 \pm 11,9	109,0 \pm 12,3	125,0 \pm 13,1	(-17,4)	(-5,3)	14,6
PM6mL/L	141,0 \pm 22,9	125,0 \pm 27,1	129,4 \pm 28,8	(-11,6)	(-8,2)	3,9
PM10mL/L	146,0 \pm 18,2	127,0 \pm 31,6	137,8 \pm 23,8	(-12,9)	(-5,3)	8,8
PM16mL/L/L	129,0 \pm 15,6	110,0 \pm 29,7	103,7 \pm 19,5	(-14,8)	(-19,7)	(-5,8)
PM8mL+L2mL/L	120,0 \pm 10,2	113,0 \pm 10,1	113,0 \pm 10,1	(-5,8)	(-5,8)	0,0
L7mL/L	144,0 \pm 14,3	108,0 \pm 7,7	154,0 \pm 11,1	(-25,1)	6,7	42,5

¹ Control= Tratamiento control, PM6mL/L= pirimifós metil 6 mL/L, PM10mL/L= pirimifós metil 10 mL/L, PM16mL/L= pirimifós metil 16 mL/L, PM8mL+L2mL/L= pirimifós metil 8 mL/L + Lambdacialotrina 2 mL/L, L7mL/L= lambdacialotrina 7 mL/L.

² $\times 10^3$

³ Ecuación= Variación 24h-48h%: [Media 48h /Media 24h) \times 100]-100; Variación 24h-72h%: [Media 72h /Media 24h) \times 100]-100; Variación 48h-72h%: [Media 72h /Media 48h) \times 100]-100.

Tabla 6. Análisis de la varianza para el modelo de tres factores: aislamiento, tratamiento y tiempo

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	P
Aislamiento¹	2	254,31	127,15	364,04	0,00
Tratamiento	5	4,55	0,91	2,61	0,02
Tiempo	2	12,34	6,17	17,67	0,00
Aislamiento × Tratamiento	10	48,21	4,82	13,80	0,00
Aislamiento × Tiempo	4	4,36	1,09	3,12	0,02
Tratamiento × Tiempo	10	2,09	0,21	0,60	0,82
Aislamiento × Tratamiento × Tiempo	20	7,83	0,39	1,12	0,32
Residuales	486	169,75	0,35	ND	ND ²

¹ Aislamiento: *B. bassiana* s.l. IBCB 66, *M. anisopliae* s.l. IBCB 425 y *P. lilacinum* s.l. IBCB 130. Tratamiento: Tratamiento control, pirimifós metil 6 mL/L, pirimifós metil 10 mL/L, pirimifós metil 16 mL/L, pirimifós metil 8 mL/L + Lambdacialotrina 2 mL/L, lambdacialotrina 7 mL/L. Tiempo: 24, 48 y 72 h. P < 0,05

² ND: Dato no determinado.

Tabla 7. Tamaño de los efectos de la interacción de los tres factores: aislamiento, tratamiento, tiempo.

	η^2 parciales
Aislamiento¹	0,60
Tratamiento	0,03
Tiempo	0,07
Aislamiento × Tratamiento	0,22
Aislamiento × Tiempo	0,03
Tratamiento × Tiempo	0,01
Aislamiento × Tratamiento × Tiempo	0,04

¹ Aislamiento: *B. bassiana* s.l. IBCB 66, *M. anisopliae* s.l. IBCB 425 y *P. lilacinum* s.l. IBCB 130. Tratamiento: Tratamiento control, pirimifós metil 6 mL/L, pirimifós metil 10 mL/L, pirimifós metil 16 mL/L, pirimifós metil 8 mL/L + Lambdacialotrina 2 mL/L, lambdacialotrina 7 mL/L. Tiempo: 24, 48 y 72 h.

2. Evaluación de la compatibilidad entre el aislamiento seleccionado y los productos fitosanitarios

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos en la prueba de caldo, donde se evaluó el GER y las UFCs evaluados a las 24 y 48 h, de *B. bassiana* s.l. CEP 545 con diferentes tratamientos de PF.

Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de germinación, en la prueba de caldo *in vitro*, entre los diferentes tratamientos de los PF ($F_6:122,56$, $P=<2,2e^{-16}$). Se redujo el GER con el aumento de la concentración de ambos PF. El menor porcentaje se obtuvo cuando se aplicó el tratamiento PM8mL+L2mL/L (46,4%), en cambio, el porcentaje más alto se obtuvo en el control (91,6%). La variación porcentual negativa fue de 2,9 a 17% entre los tiempos evaluados (Tabla 9).

En el ANOVA de las UFCs no se observaron efectos significativos en la interacción entre los tratamientos de PF y el tiempo ($F_6=0,76$, $P=0,60$), ni tampoco en el factor tiempo ($F_1=0,85$, $P=0,36$). Sin embargo, mostraron efectos significativos ($P < 0,05$) en el factor tratamientos de PF ($F_6=2,60$, $P=0,02$) (Tabla 9).

Tabla 8. Porcentaje de germinación (media \pm ES) y unidades formadoras de colonias (media \pm ES) evaluados a las 24 y 48 h (tiempo de persistencia en los granos de trigo) de *B. bassiana* s.l. CEP 545 con diferentes tratamientos de PF.

Tratamientos ¹	Germinación porcentaje (%)	Unidad formadora de Colonia		
		24h ³	48h	Variación ⁴ 24h-48h%
Control	91,6 \pm 0,8 a ²	1488,7 \pm 111,0	1321,3 \pm 121,9	(-11,2)
PM6mL/L	55,5 \pm 2,7 d	1390,7 \pm 127,5	1211,3 \pm 130,9	(-12,9)
PM3mL/L	63,8 \pm 1,5 bc	1382,7 \pm 91,8	1342,0 \pm 133,9	(-2,9)
PM1.8mL/L	70,0 \pm 1,2 b	1394,7 \pm 128,3	1576,7 \pm 148,9	13,0
PM8mL+L2mL/L	46,4 \pm 2,2 e	1162,7 \pm 86,0	964,7 \pm 150,5	(-17,0)
PM4mL+L1mL/L	59,4 \pm 1,7 cd	1291,3 \pm 75,8	1198,0 \pm 129,3	(-7,2)
PM2.4mL+L0.6mL/L	69,4 \pm 1,4 b	1297,3 \pm 73,2	1386,7 \pm 151,0	6,9

¹ Control= Tratamiento control, PM6mL/L= pirimifós metil 6 mL/L, PM3mL/L= pirimifós metil 3 mL/L, PM1.8mL/L= pirimifós metil 1,8 mL/L, PM8mL+L2mL/L= pirimifós metil 8 mL/L + Lambdacialotrina 2 mL/L, PM4mL+L1mL/L= pirimifós metil 4 mL/L + Lambdacialotrina 1 mL/L, PM2.4mL+L0.6mL/L= pirimifós metil 2,4 mL/L + Lambdacialotrina 0,6 mL/L.

² Letras iguales dentro de cada columna corresponden a grupos similares

³ $\times 10^3$

⁴ Ecuación= Variación 24h-48h%: [Media 48h /Media 24h] x 100]-100

Tabla 9. Análisis de la varianza para el modelo de dos factores: tratamiento y tiempo.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	P
Tratamiento ¹	6	3255231,4	542538,6	2,60	0,02
Tiempo	1	177771,9	177771,9	0,85	0,36
Tratamiento \times Tiempo	6	953484,8	158914,1	0,76	0,60
Residuales	196	40876760,0	208554,9	ND	ND ²

¹ Tratamiento: Tratamiento control, pirimifós metil 6 mL/L, pirimifós metil 3 mL/L, pirimifós metil 1,8 mL/L, pirimifós metil 8 mL/L + Lambdacialotrina 2 mL/L, pirimifós metil 4 mL/L + Lambdacialotrina 1 mL/L, pirimifós metil 2,4 mL/L + Lambdacialotrina 0,6 mL/L. Tiempo: 24 y 48 h. P < 0,05

² ND: Dato no determinado.

Discusión

La combinación de HE y PF podría ser una nueva alternativa en los programas de MIP para mejorar el control y la regulación de las poblaciones de insectos plaga en la postcosecha de cultivos de cereales (Moino y Alves 1998; Lacey *et al.*, 2015). En este estudio, observamos interacciones tanto positivas como negativas en función de los diferentes principios activos de los PF, las especies de HE y las condiciones de aplicación.

Al evaluar la combinación entre HE y PF, el GER se considera como el factor más importante debido a que los patógenos infectan a los insectos a través de la germinación de conidios por ingestión o contacto, determinando la calidad del inóculo. En ambos estudios realizados en la ULR del Instituto Biológico y el CEPAVE, los tratamientos con PF ocasionaron una reducción del GER con respecto al control. Por lo que, no se recomienda el uso de la mezcla de HE y PF en el mismo caldo. Esto concuerda con los resultados observados por Mamprim *et al.* (2014), quienes encontraron inhibición de aislamientos de *B. bassiana* cuando se combinaron con varias formulaciones de insecticidas y, por lo tanto, propusieron aplicaciones separadas de *B. bassiana* e insecticida para prevenir interacciones severas.

Las pruebas del IB realizadas con los aislamientos de la ULR del Instituto Biológico, sobre medio de cultivo, mostraron que los PF evaluados tuvieron un efecto tóxico sobre el HE y afectaron negativamente su CV, GER y ESP. Oliveira *et al.* (2018) y Pessoa *et al.* (2020) demostraron que los estudios *in vitro* exponen al máximo al microorganismo a la acción de los PF, lo que podría explicar los resultados obtenidos en el estudio realizado en ULR. Considerando los resultados obtenidos en la presente tesis y a los alcanzados por dichos autores, fue decidido no realizar la prueba de IB para el aislamiento *B. bassiana* s.l. CEP 545.

En el cálculo de compatibilidad, el CV representa el potencial desarrollo del hongo (Potrich *et al.*, 2018). En el estudio realizado en ULR del Instituto Biológico, los

PF utilizados redujeron este parámetro en los tres aislamientos evaluados. Por el contrario, Pessoa *et al.* (2020) observaron que el CV de *B. bassiana* aumentó cuando se aplicó junto con PF. Estos autores consideran que cuando los microorganismos se encuentran en presencia de compuestos tóxicos, los cuales alteran el medio de cultivo y perjudican su desarrollo, utilizan todo su esfuerzo reproductivo, resultando así en un mayor CV.

La ESP de un aislamiento es importante en el mantenimiento del ciclo patógeno-huésped, debido a que el aumento de este parámetro da como resultado una mayor dispersión y propagación en el ambiente (Potrich *et al.*, 2018). En la presente tesis, precisamente en los ensayos realizados en los aislamientos *B. bassiana* s.l. IBCB 66, *M. anisopliae* s.l. IBCB 425 y *P. lilacinum* s.l. IBCB 130, este parámetro fue reducido por los PF evaluados en comparación con las condiciones de control. En cambio, Alves *et al.* (2008) y Fregonesi *et al.* (2016) encontraron que los PF no inhiben la ESP de HE. Moino y Alves (1998) explicaron que el CV y la ESP pueden ser promovidos por un mecanismo de resistencia fisiológica de los microorganismos, los cuales pueden metabolizar los compuestos tóxicos del ingrediente activo o, utilizando las moléculas de este proceso, liberarlos en el medio de cultivo como nutrientes secundarios.

En este estudio, los tratamientos que contienen el principio activo organofosforado, particularmente el tratamiento PM16mL, tuvieron efectos tóxicos en casi todos los aislamientos evaluados en ULR, a excepción del aislamiento de *B. bassiana* s.l. IBCB 66 testado con el tratamiento con piretroide L7mL, cuyo efecto fue moderadamente compatible. Fregonesi *et al.* (2016) observaron diferencias en la respuesta a diferentes PF sobre 13 aislamientos de *B. bassiana*. Además, como señalan Oliveira *et al.* (2018), las formulaciones comerciales preparadas con el mismo principio activo por diferentes fabricantes pueden presentar diferentes efectos biológicos. Al mismo tiempo, la adición de otros productos en la preparación, por

ejemplo, emulsionantes y aditivos, puede contribuir a tener efectos biológicos variados sobre el CV y la ESP (Sosa Gómez, 2005).

El número de las UFCs de los HE evaluados en la ULR estuvieron condicionadas por los factores: aislamientos, tratamientos de PF y tiempo de persistencia de los HE. Los resultados mostraron que, la variabilidad de UFCs se debió al factor aislamiento, dado que el aislamiento *M. anisopliae* s.l. IBCB 425 presentó menor número de UFCs con respecto a *B. bassiana* s.l. IBCB 66 y *P. lilacinum* s.l. IBCB 130 que presentaron similar número. En cambio, el factor tiempo no causó la variabilidad en las UFCs. Por ello, conocer la producción de conidios en el sustrato es conveniente para el control de patógenos.

El estudio de los efectos de los PF en combinación con HE es importante para reducir las concentraciones y el número de aplicaciones de PF. Con base en los resultados obtenidos, se concluye que se recomienda la aplicación de HE y PF por separado. Sin embargo, se deben realizar más investigaciones sobre insectos no blanco para confirmar la compatibilidad de HE y PF dentro de una estrategia de MIP.

Parte de la información suministrada en este capítulo ha sido publicada en el siguiente trabajo científico:

- Musso, A., Lopez Lastra, C.C., Padin, S.B., Minardi, G.M., & Marcondes Almeida, J.E. 2023. "Effects of the combination of phytosanitary products and entomopathogenic fungi for the control of insect pests. Acta Agronómica". 71(2). <https://doi.org/10.15446/acag.v71n2.97313>

A microscopic image of a beetle, likely a pest, covered in a white, fuzzy growth of Beauveria bassiana fungus. The beetle is positioned horizontally in the center of the frame. A scale bar in the upper right corner indicates a length of 500 micrometers. The background is a light, neutral color.

500 μm

**Capítulo IV: Patogenicidad y virulencia de
Beauveria bassiana combinado con
productos fitosanitarios sobre un rango de
hospedadores**

Introducción

Las pérdidas en la postcosecha de muchos de los productos almacenados son originadas por diferentes especies de insectos que causan daños cualitativos y cuantitativos en los granos, a través de la pérdida de la calidad de los granos, o por rechazo en los molinos o las plantas de procesamiento (Wakil *et al.*, 2010).

Rhyzopertha dominica y *Sitophilus oryzae* son insectos de infección primaria, es decir, infestan granos sanos, mientras que *Oryzaephilus surinamensis* y *Tribolium castaneum* son colonizadores secundarios, es decir, infestan principalmente granos dañados, ya sea mecánicamente o por infección primaria. La capacidad destructiva de los insectos plaga radica en su alta reproducción, su distribución geográfica y su amplia variedad de cultivos hospederos (FAO, 1983).

A partir de los estándares comerciales en relación con la comercialización de granos libres de insectos y su control hasta su eliminación total, conduce en muchos casos a realizar un uso incorrecto y excesivo de los PF. Se busca que la utilización de estos sea más racional, con la selección de los momentos más apropiados para su aplicación (dosis, tiempos de carencia, métodos de aplicación). Además, de complementarlos con otras medidas de control, de modo de reducir al mínimo sus efectos negativos (Abadía y Bartosik, 2013).

Una alternativa es incluir el uso de métodos de control biológico en los programas de MIP. Entre ellos, se encuentran los HE. Especialmente, las especies *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, que se han evaluado contra la mayoría de las principales plagas de granos almacenados (Athanassiou *et al.*, 2008, Wakil *et al.*, 2010). En la actualidad, no existe evidencia contundente de que el enfoque de MIP pueda prescindir totalmente del uso de PF (Abadía y Bartosik, 2013).

Un inconveniente del uso de los HE es el tiempo que se requiere para acción microbiana sobre el insecto objeto, que suele ser más lento cuando es tratado con patógenos fúngicos con respecto a los tratados con PF (Lomer *et al.*, 2001). Sin

embargo, los daños sobre los productos de interés económico disminuyen, debido a que los insectos infestados tienden a comer menos que los sanos, modificando su supervivencia y su potencial reproductivo (Pelizza *et al.*, 2015).

Para la utilización de HE, como ingrediente activo de los productos biológicos, y su integración en los programas de MIP es necesaria previamente determinar la compatibilidad de los aislamientos. Estas evaluaciones deben ser realizadas para cada aislamiento en forma individual, ya que surgen diferencias aun entre varios aislamientos del mismo género (Cantone y Vandenberg, 1998).

Las aplicaciones combinadas han sido una propuesta como estrategia para mejorar la eficiencia del control de plagas, lo cual permitiría la reducción en la cantidad aplicada de PF, en consecuencia, la minimización de la contaminación ambiental y procurando la salud humana (Oliveira *et al.*, 2018). Una combinación de concentración subletal de PF y HE puede actuar como un factor de estrés adicional, comprometer el sistema inmunológico y la consiguiente alteración en la fisiología y el comportamiento de los insectos, lo que conduce al aumento de la eficiencia del patógeno fúngico (Boucias, 1998; Forlani, 2014).

El interés en estudiar las interacciones de PF con otros compuestos sobre diferentes insectos blancos se debe al posible efecto aditivo, sinérgico o antagonista que permitirían reducir la aplicación de los PF sin perder eficacia en las estrategias de control de plagas. Consecuentemente, la contaminación, además de minimizar el riesgo de plagas resistentes a los principios activos y reducir considerablemente los costos de producción, especialmente en un contexto de MIP en el que las poblaciones de insectos son atacadas antes de que se vuelvan económicamente dañinas (Alexander *et al.*, 2008).

El objetivo del presente capítulo fue estudiar, en condiciones de laboratorio, la eficiencia de *B. bassiana* s.l. CEP 545 combinado con PF sobre un rango de hospedadores: *R. dominica*, *S. oryzae*, *O. surinamensis* y *T. castaneum*.

Materiales y métodos

A partir de los resultados obtenidos en los Capítulos II y III, se procedió a realizar los bioensayos de patogenicidad y virulencia sobre un rango de hospedadores de insectos plaga.

1. Origen de las colonias

Los insectos plaga evaluados fueron: *R. dominica*, *S. oryzae*, *O. surinamensis* y *T. castaneum*. Todas las especies fueron criadas en el Insectario, ubicado en el Laboratorio de la Cátedra de Terapéutica Vegetal de la FCAyF-UNLP, en condiciones controladas (26°C, 60%HR y en oscuridad). La metodología de cría fue la misma utilizada en el **Capítulo II – Materiales y métodos: Sección 1**. Se le suministró la dieta correspondiente según la especie: *R. dominica*: granos de cebada perlada; *O. surinamensis*: avena arrollada; *S. oryzae*: granos de trigo entero; *T. castaneum*: harina de trigo + 5% de leche descremada en polvo + 5% de germen de trigo + 5% de levadura de cerveza. Todos los individuos utilizados en los experimentos fueron adultos de sexo mixto de tres semanas de edad.

2. Origen del hongo entomopatógeno

Se utilizó el aislamiento de *B. bassiana* s.l. CEP 545 seleccionado en los bioensayos previos del Capítulo II. Los HE utilizados en la ULR de Control Biológico del CAPSA del Instituto Biológico (Capítulo III, **Sección 1.1.**) no fueron evaluados en el presente Capítulo, debido a que estas pruebas fueron realizadas para la puesta a punto de la evaluación de la compatibilidad.

2.1. Productos fitosanitarios

Los PF utilizados en este estudio fueron los mismos que en el Capítulo III- **Sección 1.2.** (Tabla 2). A partir de los resultados obtenidos en el Capítulo III, los tratamientos de PF evaluados fueron: Pirimifos metil 6 mL/L (PM6mL/L), pirimifos metil 3 mL/L (PM3mL/L), Pirimifos metil 1,8 mL/L (PM1.8mL/L), Pirimifos metil 8 mL/L + Lambdacialotrina 2 mL/L (PM8mL+L2mL/L), Pirimifos metil 4 mL/L + Lambdacialotrina 1 mL/L (PM4mL+L1mL/L) y Pirimifos metil 2,4 mL/L + Lambdacialotrina 0,6 mL/L (PM2.4mL+L0.6mL/L). Las cantidades (mL/L) se refieren al producto comercial.

2.1.1. Bioensayos de patogenicidad y virulencia de *B. bassiana* s.l. combinado con PF en un rango de hospedadores

Para la realización de los bioensayos se utilizaron un rango de hospedadores de *R. dominica*, *S. oryzae*, *O. surinamensis* y *T. castaneum* obtenidos de la cría ya descrita. Previo al bioensayo, los insectos adultos se mantuvieron bajo inanición durante 24 h. Se colocaron 5 individuos de cada especie por separado dentro de una caja de Petri (9 cm de diámetro). Los insectos fueron pulverizados con 1 mL de *B. bassiana* s.l. CEP 545 ($9,5 \times 10^9$ conidio/mL), 1 mL de los tratamientos de PF (**Sección 2.1.**), y la combinación de 1 mL del hongo y 1 mL de los tratamientos de PF. En el control, los insectos fueron tratados sólo con 1 mL de 0,01% (v/v) Tween 80 (polisorbato de sodio) en agua destilada estéril. La pulverización se realizó dentro de los mismos recipientes utilizando un aerógrafo (FENGDA, BD-180, China) junto con el alimento (granos de trigo). Luego, se incubó a 25 ± 2 °C, 60%HR y un fotoperiodo de 12:12 h. Se registró el número de insectos muertos cada 24 h hasta los 20 días del inicio de la aplicación. Los insectos muertos tratados con el HE se retiraron diariamente y se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio 0,5% v / v durante 1 minuto. Para confirmar la muerte por HE, los cadáveres se colocaron en una cámara húmeda y se incubaron a 25 ± 2 °C durante siete días. Se observó la

esporulación externa para cada cadáver bajo un microscopio binocular estereoscópico (Zeiss Stemi DV4, 30x) (Figura 1). Se utilizaron cinco réplicas para cada tratamiento y el experimento se repitió tres veces en diferentes momentos.

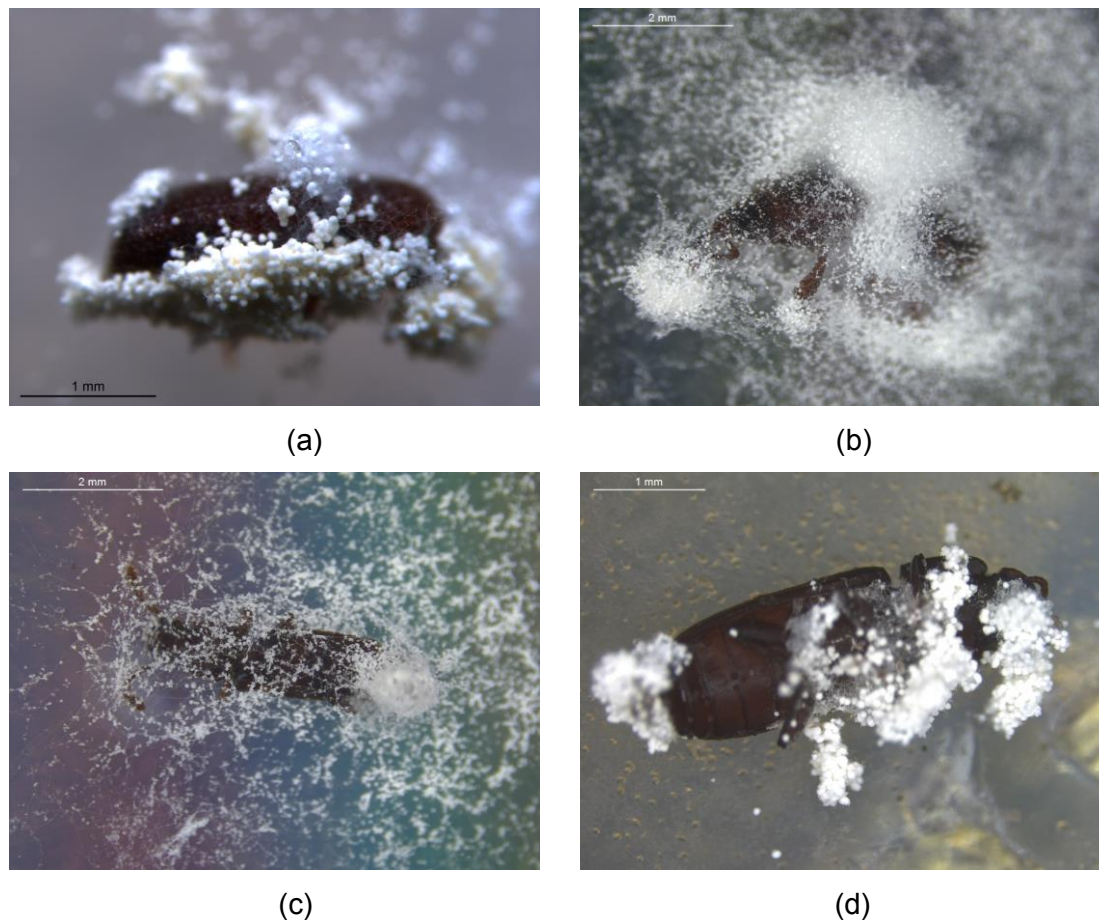


Figura 1. Adultos de *R. dominica* (a), *S. oryzae* (b), *O. surinamensis* (c) y *T. castaneum* (d) infectados por *B. bassiana* s.l. CEP 545.

2.1.2. Variables registradas y análisis de datos

Las diferencias estadísticas entre los porcentajes de mortalidad de los diferentes tratamientos de PF y los distintos rangos de hospedadores de insectos plaga se analizaron mediante una prueba de Chi cuadrado. Cuando la mortalidad fue del 50% o superior, el TSM se calculó con el método de distribución de supervivencia de Kaplan-Meier (K-M), y las diferencias estadísticas se analizaron mediante una prueba de rango logarítmico. En el caso de que se encontraran diferencias

significativas, se realizaron comparaciones post-hoc de a pares de tratamientos de PF ajustando el nivel de significación según el método Sidak (Lyman Ott y Longnecker, 2001).

La determinación de las interacciones aditivas, sinérgicas o antagónicas se basó en una prueba binomial que implica la comparación de los porcentajes esperados y observados de mortalidad, como fue descrito por Nishimatsu y Jackson (1998). La mortalidad esperada de un tratamiento establecido de PF y el HE se basó en la fórmula $M_E = M_0 + (1-M_0) (P_1) + (1-M_0) (1-P_1) (P_2)$. Donde M_E es la mortalidad esperada en combinación de los dos agentes de control, M_0 es la mortalidad natural (control), P_1 es la mortalidad después del tratamiento con los PF solos y P_2 es la mortalidad después del tratamiento con el HE sólo. Se aplicó la prueba de X^2 a los resultados observados y esperados: $X^2 = (V_O - V_E)^2 / V_E + (M_O - M_E)^2 / M_E$ con V_O el número de insectos vivos observados, V_E el número de insectos vivos esperados, M_O el número de insectos muertos observados, y M_E el número de insectos muertos esperados se utilizó para probar la hipótesis de independencia. Las interacciones aditivas se indicaron si $X^2 < 3,84$. Antagonismo si $X^2 > 3,84$ y $M_C < M_E$, donde M_C es la mortalidad observada de la combinación de los PF y el HE, y M_E es la mortalidad esperada de la combinación. Se indicó sinergismo si $X^2 > 3,84$ y $M_C > M_E$.

Los análisis se realizaron utilizando el software R versión 4.0.3 (R Core Team, 2018).

Resultados

1. Bioensayos de patogenicidad y virulencia de *B. bassiana* s.l. combinado con PF en un rango de hospedadores

En la tabla 1 se observa los resultados obtenidos en el porcentaje de mortalidad de *R. dominica*, *S. oryzae*, *O. surinamensis* y *T. castaneum* post

tratamiento. En las cuatro especies de insectos plaga evaluadas en el control sobrevivieron todos los insectos tratados. En la especie de insecto *R. dominica*, el porcentaje de mortalidad varió entre 23% para el tratamiento PM1.8mL/L y 80,3% para PM8mL+L2mL/L. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de PF ($X^2_{13}=819,2$; $P=0$). En cuanto a la especie de insecto *S. oryzae*, el porcentaje de mortalidad varió entre 38% cuando fue aplicado el HE sólo y 100% con la aplicación del PF sólo y combinado con el HE, encontrándose diferencias significativas respecto al control ($X^2_5=350,6$; $P=0$). El porcentaje de mortalidad de *O. surinamensis* varió entre 33.3% cuando se aplicó *B. bassiana* s.l. y 100% con la aplicación del tratamiento PM2.4mL+L0.6mL/L. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos PM1.8mL/L y *B. bassiana* s.l. + PM1.8mL/L, y los tratamientos PM2.4mL+L0.6mL/L y *B. bassiana* s.l. + PM2.4mL+L0.6mL/L ($X^2_5=227,6$; $P=0$). Por último, el porcentaje de mortalidad de *T. castaneum* varió entre 24% para *B. bassiana* s.l. y 89,3% para el tratamiento PM2.4mL+L0.6mL/L. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($X^2_5=206,1$, $P=0$). Éstas estuvieron dadas entre los tratamientos combinados entre HE y PF, y sólo el HE.

En cuanto a la susceptibilidad entre las diferentes especies de insectos plaga evaluados, se observó que el porcentaje de mortalidad no superó el 50% al aplicarse el aislamiento sólo de *B. bassiana* (Tabla 1). La especie más susceptible a *B. bassiana* s.l. CEP 545 fue *R. dominica* con respecto al resto de insectos plaga ($X^2_3=15,4$; $P=0,00$). En cambio, cuando se le aplicó a *R. dominica* los tratamientos PM1.8mL/L y PM2.4mL+L0.6mL/L se observó menor susceptibilidad y presentó diferencias significativas con respecto al resto de los insectos plaga que fueron más susceptible ($X^2_3=197,5$; $P=1,48e^{-42}$; $X^2_3=139,5$; $P=4,79e^{-30}$, respectivamente). Asimismo, ocurrió similar situación, cuando fue aplicado la combinación del HE y los tratamientos de los PF, observándose diferencias significativas entre especies ($X^2_3=87,8$; $P=6,50e^{-19}$; $X^2_3=73$; $P=9,78e^{-16}$, respectivamente) (Tabla 1).

En las aplicaciones combinadas que ocasionaron una mortalidad menor al 50% el TSM no pudo ser determinado (Tabla 1). Asimismo, en las especies *S. oryzae*, *O. surinamensis* y *T. castaneum* el TSM fue de un día, observándose una alta mortalidad en las primeras 24 h post tratamiento. Se encontraron diferencias significativas de supervivencia entre los tratamientos con respecto al control (*S. oryzae*: $X^2_5=460,7$; $P=0$; *O. surinamensis*: $X^2_5=301,7$; $P=0$; *T. castaneum*: $X^2_5=200,8$; $P=0$). Sin embargo, en la especie *R. dominica*, el TSM varió de 3 a 12 días. Se encontraron diferencias significativas de supervivencia entre los tratamientos con respecto al control ($X^2_{13}=931,8$; $P=0$).

2. Determinación de las interacciones aditivas, sinérgicas o antagónicas

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en las interacciones de *R. dominica*, *S. oryzae*, *O. surinamensis* y *T. castaneum*. Las interacciones entre los agentes de control de plagas consistieron principalmente en efectos antagónicos. Todas las combinaciones del HE y PF sobre *R. dominica* y *T. castaneum* resultaron antagonistas. Mientras que las interacciones entre *B. bassiana* s.l. + PM2.4mL+L0.6mL/L sobre *S. oryzae* resultaron aditivas. Se observó efectos aditivos cuando se trató con *B. bassiana* s.l. + PM1.8mL/L a *O. surinamensis*, pero se observó sinergismo cuando se trató con *B. bassiana* s.l. + PM2.4mL+L0.6mL/L.

Tabla 1. Mortalidad (%) (media \pm ES) y tiempo de supervivencia mediana (TSM) (Intervalo de confianza: IC₉₅) de *R. dominica*, *S. oryzae*, *O. surinamensis* y *T. castaneum* con diferentes tratamientos.

Tratamiento ¹	<i>R. dominica</i>		<i>S. oryzae</i>		<i>O. surinamensis</i>		<i>T. castaneum</i>	
	Mortalidad (%) \pm ES	TSM (días) IC ₉₅	Mortalidad (%) \pm ES	TSM (días) IC ₉₅	Mortalidad (%) \pm ES	TSM (días) IC ₉₅	Mortalidad (%) \pm ES	TSM (días) IC ₉₅
Control	0 \pm 0,0 a ²	ND ⁴ a	0 \pm 0,0 a	ND a	0 \pm 0,0 a	ND a	0 \pm 0,0 a	ND a
<i>B. bassiana</i> s.l. CEP 545	47,0 \pm 2,9 c B ³	ND b	38,7 \pm 5,6 b AB	ND b	33,3 \pm 5,4 b AB	ND b	24,0 \pm 4,9 b A	ND b
PM6mL/L	65,3 \pm 2,7 d	7 (5-12) ef	NE ⁵	NE	NE	NE	NE	NE
PM3mL/L	40,7 \pm 2,8 c	ND c	NE	NE	NE	NE	NE	NE
PM1.8mL/L	23,0 \pm 2,4 b A	ND b	100,0 \pm 0,0 c C	0 (0-0) c	66,7 \pm 5,4 c B	1 (1-4) c	80,0 \pm 4,6 cd C	1 (0-1) c
PM8mL+L2mL/L	80,3 \pm 2,3 f	3 (2-4) c	NE	NE	NE	NE	NE	NE
PM4mL+L1mL/L	68,3 \pm 2,7 de	5,5 (5-7) efg	NE	NE	NE	NE	NE	NE
PM2.4mL+L0.6mL/L	47,3 \pm 2,9 c A	ND d	97,3 \pm 1,9 c B	0 (0-0) c	100,0 \pm 0,0 d C	0 (0-0) e	89,3 \pm 3,6 d BC	0 (0-1) c

<i>B. bassiana</i> s.l. CEP 545+ PM6mL/L	75,3 ± 2,5 ef	6 (5-7) gh	NE	NE	NE	NE	NE	
<i>B. bassiana</i> s.l. CEP 545+ PM3mL/L	46,3 ± 2,9 c	ND c	NE	NE	NE	NE	NE	
<i>B. bassiana</i> s.l. CEP 545+ PM1.8mL/L	44,7 ± 2,9 c A	ND c	100,0 ± 0,0 c C	0 (0-0) c	69,3 ± 5,3 c B	1 (0-5) c	73,3 ± 5,1 c C	1 (0-2) c
<i>B. bassiana</i> s.l. CEP 545+ PM8mL+L2mL/L	78,0 ± 2,4 f	4,5 (3-5) h	NE	NE	NE	NE	NE	
<i>B. bassiana</i> s.l. CEP 545+ PM4mL+L1mL/L	74,0 ± 2,5 ef	6 (5-7) fg	NE	NE	NE	NE	NE	
<i>B. bassiana</i> s.l. CEP 545+ PM2.4mL+L0.6mL/L	60,3 ± 2,8 d A	12 (8-18) ef	100,0 ± 0,0 c C	0 (0-0) c	94,7 ± 2,6 d B	0 (0-0) d	80,0 ± 4,6 cd B	1 (0-3) c

¹ Control = Tratamiento control, HE= *B. bassiana* s.l. CEP 545, PM6mL/L= pirimifos metil 6 mL/L, PM3mL/L= pirimifos metil 3 mL/L, PM1.8mL/L= pirimifos metil 1,8 mL/L, PM8mL+L2mL/L= pirimifos metil 8 mL/L + lambdacialotrina 2 mL/L, PM4mL+L1mL/L= pirimifos metil 4 mL/L + lambdacialotrina 1 mL/L, PM2.4mL+L0.6mL/L= pirimifos metil 2,4 mL/L + lambdacialotrina 0,6 mL/L.

² Letras minúsculas iguales dentro de cada columna corresponden a grupos similares.

³ Letras mayúsculas iguales dentro de cada fila corresponden a grupos similares.

⁴ ND: Dato no determinado.

⁵ NE: Dato no evaluado.

Tabla 2. Interacciones aditivas, sinérgicas o antagonicas de *R. dominica*, *S. oryzae*, *O. surinamensis* y *T. castaneum* con diferentes tratamientos.

Insecto	Tratamiento ¹	X ²	Interacción
<i>R. dominica</i>	<i>B. bassiana</i> s.l. + PM6mL/L	329,0	Antagonista
	<i>B. bassiana</i> s.l. + PM3mL/L	123,1	Antagonista
	<i>B. bassiana</i> s.l. + PM1.8mL/L	18,7	Antagonista
	<i>B. bassiana</i> s.l. + PM8mL+L2mL/L	180,9	Antagonista
	<i>B. bassiana</i> s.l. + PM4mL+L1mL/L	140,7	Antagonista
	<i>B. bassiana</i> s.l. + PM2.4mL+L0.6mL/L	80,8	Antagonista
<i>S. oryzae</i>	<i>B. bassiana</i> s.l. + PM1.8mL/L	NN ²	
	<i>B. bassiana</i> s.l. + PM2.4mL+L0.6mL/L	1,3	Aditivo
<i>O. surinamensis</i>	<i>B. bassiana</i> s.l. + PM1.8mL/L	3,1	Aditivo
	<i>B. bassiana</i> s.l. + PM2.4mL+L0.6mL/L	inf	Sinergia
<i>T. castaneum</i>	<i>B. bassiana</i> s.l. + PM1.8mL/L	7,7	Antagonista
	<i>B. bassiana</i> s.l. + PM2.4mL+L0.6mL/L	14,2	Antagonista

¹ HE= *B. bassiana* s.l. CEP 545, PM6mL/L= pirimifos metil 6 mL/L, PM3mL/L= pirimifos metil 3 mL/L, PM1.8mL/L= pirimifos metil 1,8 mL/L, PM8mL+L2mL/L= pirimifos metil 8 mL/L + lambdacialotrina 2 mL/L, PM4mL+L1mL/L= pirimifos metil 4 mL/L + lambdacialotrina 1 mL/L, PM2.4mL+L0.6mL/L= pirimifos metil 2,4 mL/L + lambdacialotrina 0,6 mL/L.

² NN: no hay datos disponibles en el rango de respuesta.

Discusión

Los diferentes resultados publicados entre distintos autores del impacto de los HE sobre los insectos plaga pueden ser explicados por el nivel de susceptibilidad de los insectos blancos (Rice y Cogburn, 1999; Athanassiou *et al.*, 2008; Barra *et al.*, 2013). La especie más susceptible a *B. bassiana* s.l. CEP 545 fue *R. dominica* con respecto a *S. oryzae*, *O. surinamensis* y *T. castaneum*. Asimismo, Moino *et al.* (1998), observaron que *S. oryzae* y *S. zeamais* fueron menos susceptibles a los aislamientos de *B. bassiana* que *R. dominica*, que presentó 100% de mortalidad. Adane *et al.* (1996) demostraron que el aislamiento *B. bassiana* I90-520 en la dosis más baja (10⁴

conidios/mL) ocasionó alrededor del 88% de mortalidad contra *S. zeamais* en 8 días. En cambio, Uçar *et al.* (2020) evaluaron entre cuatro aislamientos de *B. bassiana* (1×10^8 conidios/mL) y sólo el aislamiento GN22-1 resultó ser el más eficaz para controlar *T. castaneum*, ocasionando el 83,5% de mortalidad a los 23 días post tratamiento. Esto podría atribuirse a las diferencias de composición de la cutícula del insecto (Wakil *et al.*, 2021).

Las respuestas del HE en presencia del mismo producto químico pueden variar dependiendo de la concentración a aplicar. En los ensayos de laboratorio, en muchas combinaciones, se observó que la mortalidad de los insectos blancos en presencia de los PF estudiados, con respecto al control, fue cercana al total. Del mismo modo, a medida que aumentó la concentración de los PF se obtuvo un incremento en el porcentaje de mortalidad. Por otra parte, las aplicaciones combinadas de *B. bassiana* con las concentraciones subletales de PF sobre *S. oryzae*, *O. surinamensis* y *T. castaneum* dieron como resultado niveles de mortalidad significativamente en comparación con las aplicaciones únicas de *B. bassiana* s.l. CEP 545. Las concentraciones subletales de los PF pueden actuar como factores estresantes fisiológicos y/o modificadores del comportamiento, predisponiendo así a los insectos a enfermedades (Boucias *et al.*, 1996; Inglis *et al.*, 2001). Por último, de acuerdo con el estudio de Pelizza *et al.* (2015) se coincide que las evaluaciones *in vitro* tienen la virtud de exponer el patógeno fúngico a la máxima acción de los PF, si bien esto no siempre se observa en condiciones de campo.

Otro de los factores que puede explicar los distintos resultados es el método de contacto entre el hongo y el PF empleado (Alboneti *et al.*, 2020). La técnica utilizada en este capítulo, en el cual los insectos fueron pulverizados con los distintos tratamientos, sería la más adecuada debido a que simula la aplicación en el campo.

Las formulaciones de organofosforados (inhibidores de acetilcolinesterasa) y piretroides (neurotóxicos) se utilizan ampliamente para el control de los principales insectos plaga en granos almacenados. Los resultados de los estudios demuestran

que ambas formulaciones en las combinaciones estudiadas aumentan el porcentaje de mortalidad: En particular, el tratamiento *B. bassiana* + PM2.4mL+L0.6mL/L, el cual combina el HE con los principios activos pirimifós metil y lambdacialotrina en concentraciones subletales, presentó mayor toxicidad en comparación al tratamiento que combina el HE con el principio activo pirimifós metil. En cambio, Cazorla y Morales - Moreno (2010) observaron que los organofosforados son menos agresivos que los piretroides a las concentraciones recomendadas a campo, los cuales mostraron un mayor efecto fungistático sobre el aislamiento de *B. bassiana*.

Se consideró la clasificación de los insecticidas de acuerdo con la determinación de las interacciones propuesta por Nishimatsu y Jackson (1998), para una posible aplicación en los programas de MIP. En este estudio, los diferentes tratamientos de PF evaluados combinados con el aislamiento de *B. bassiana* s.l. CEP 545 para el control de adultos de *R. dominica*, *S. oryzae*, *O. surinamensis* y *T. castaneum* mostraron interacciones variables, observándose principalmente antagonismo. Sin embargo, en dos combinaciones se produjeron respuestas aditivas: *B. bassiana* s.l. + PM8mL+L2mL/L y *B. bassiana* s.l. + PM6mL/L, para el control de *S. oryzae* y *O. surinamensis*, respectivamente. Por otro lado, en una única combinación de HE y PF (*B. bassiana* s.l. + PM2.4mL+L0.6mL/L) se observó sinergismo para el control de *O. surinamensis*, la cual podría ser candidata a bioensayos futuros, reduciendo sustancialmente el costo del control. Aplicaciones combinadas pueden hacer que el insecto huésped sea más susceptible al comprometer su salud o prolongar las etapas de desarrollo (Lacey *et al.*, 2015).

Como conclusión, se recomienda la aplicación combinada del HE de *B. bassiana* s.l. con el tratamiento de PF PM2.4mL+L0.6mL/L para el control de insectos plagas de granos almacenados. Asimismo, para el uso en condiciones de campo se sugiere la evaluación previa de la interacción.



**Capítulo V: Conclusiones generales y
Perspectivas futuras**

Conclusiones generales

Al evaluar diferentes aislamientos de HE se demostró que *B. bassiana* presenta alta tasa de mortalidad, disminuyendo la tasa de supervivencia de *R. dominica*. El aislamiento *B. bassiana* s.l. CEP 545 presentó mayor eficacia contra individuos adultos de *R. dominica*. En cuanto, al porcentaje de mortalidad, aumentó a medida que se incrementó la concentración. La CL₅₀ se estimó en $9,5 \times 10^9$ conidios/mL.

Al determinar la compatibilidad de HE nativos de Brasil combinados con PF, según el IB, ninguno de los tratamientos evaluados fue compatible con los tres aislamientos, excepto el tratamiento L7 de lambdacialotrina, que resultó moderadamente tóxico sobre *B. bassiana*. En ambos estudios realizados en la ULR del Instituto Biológico y el CEPAVE, los tratamientos con PF mostraron una reducción del GER con respecto al control. Esto permitió concluir que los HE y los PF deben aplicarse por separado, es decir, no en el mismo caldo.

Al evaluar la virulencia de *B. bassiana* s.l. CEP 545 con PF en concentraciones subletales reveló que esta combinación tiene elevado potencial para causar una mortalidad considerable sobre un rango de hospedadores *R. dominica*, *S. oryzae*, *O. surinamensis* y *T. castaneum*. La combinación más efectiva para el control de *R. dominica* estuvo dada por el tratamiento *B. bassiana* + PM2.4mL+L0.6mL/L, el cual combina el HE con pirimifós metil y lambdacialotrina en concentraciones subletales. Según los resultados obtenidos, este estudio sugiere que las aplicaciones combinadas de HE y PF sería una alternativa agroecológica para el control de insectos plaga en granos almacenados, incluidos en los programas de MIP.

Perspectivas futuras

Los resultados obtenidos en la evaluación de la virulencia de distintos aislamientos de los HE para el control de individuos adultos de *R. dominica* es una base en la aplicación programas de MIP de granos almacenados.

Se sugieren futuros estudios en laboratorio con diferentes variables a estudiar, incluyendo metodologías de aplicación, como así también el agregado de factores externos como la temperatura, niveles de humedad relativa y UV.

Es importante sumar estudios de especificidad de los HE y PF seleccionados, con el fin de evaluar el efecto sobre organismos benéficos presentes en el agroecosistema de granos almacenados.

Se propone la investigación de la producción en escala de *B. bassiana*, con el objetivo de obtener una formulación fúngica estable; con el objeto de introducir a las pruebas de campo.



Bibliografía

- Abadia, M.B., & Bartosik, R.E. 2013. Manual de Buenas Prácticas en Poscosecha de Granos: hacia el agregado de valor en origen de la producción primaria. Ediciones INTA.
- Abadia, M.B., Urcola, H.A., Ferrari, M.C., & Bartosik, R.E. 2020. Radiografía del sistema de acopio de granos en Argentina: ¿estamos preparados para acopiar más granos y preservar su calidad? EEA Balcarce, INTA.
- Abdel-Raheem, M.A., Ismail, I.A., Abdel Rahman, R.S., Farag, N.A., & Abdel Rhman, I.E. 2015. Entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Bals.) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) As biological control agents on some stored product insects. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 3(6), 316-320.
- Adane, K., Moore D., & Archer. S.A. 1996. Preliminary studies on the use of *Beauveria bassiana* to control *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in the laboratory. *Journal of Stored Products Research*. 32:105–113
- Aguilera Sammaritano, J.A. 2016. Control microbiano de *Bemisia tabaci* (mosca blanca) mediante el uso de hongos entomopatógenos (Tesis Doctoral). Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Akmal, M., Freed, S., Malik, M.N., & Bilal, M. 2017. A laboratory assessment for the potential of entomopathogenic fungi to control *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 5(5): 40-45.
- Alboneti, A.L., Ceconello, D.M., Ringenberg, R., Dos Santos, C.V., Bonini, A.K., Alves, L.F.A., & Alves, V.S. 2020. Efeito de produtos fitossanitários utilizados na cultura da mandioca sobre aspectos biológicos de fungos entomopatogênicos. *Research, Society and Development*, 9(9), e450997248-e450997248.
- Alves, S. 1998. Fungos entomopatogênicos. In B. Alves (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. 2nd ed. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brazil: pp. 289-381.
- Alves, S., & Lecuona, R.E. 1996. Microorganismos Patógenos empleados en el control Microbiano de Insectos Plagas.

- Alves, S.B., & Lecuona R.E. 1998. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano = Applied epizootiology to microbial control. p. 97–157. In: Alves, S.B., ed. Controle microbiano de insetos = Microbial control of insects. Fealq, Piracicaba, SP, Brazil.
- Alves, S.B., Lopes, R.B., Vieira S.A., & Tamai, M.A. 2008. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In Controle microbiano de Pragas na América Latina—Avanços e Desafios, 1st edn, ed by Alves SB and Lopes RB, FEALQ, Piracicaba, 69-110.
- Alves, S.B., Moino, A.Jr., & Almeida, J.E.M. 1998. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In Controle microbiano de insetos, 2nd edn, ed by Alves SB, FEALQ, Piracicaba, 217-238.
- Anderson, T.E., & Roberts, D.W. 1983. Compatibility of *Beauveria bassiana* isolates with insecticide formulations used in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) control. J Econ Entomol 76(6): 1437-1441. <https://doi.org/10.1093/jee/76.6.1437>.
- Arnaud, L., Lan, H.T.T., Brostaux, Y., & Haubruge, E. 2005. Efficacy of diatomaceous earth formulations admixed with grain against populations of *Tribolium castaneum*. J Stored Prod Res 41(2): 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2003.09.004>.
- Arregui, M.C., & Puricelli C. 2008. Mecanismo de acción de plaguicidas. Dow Agrosciences. Acquatint (ed.): 21-74 pp.
- Arthur, F.H. 1996. Grain protectants: Current estatus and prospects for the future. Journal of Stored Products Research. 32(4), 293–302.
- Arthur, F.H. 2004. Evaluation of methoprene alone and in combination with diatomaceous earth to control *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) on stored wheat. Journal of Stored Products Research. 40(5), 485-498.
- Athanassiou C.G., Kavallieratos N.G., Chintzoglou G.J., Peteinatos G.G., Boukouvala M.C., Petrou S.S., & Panoussakis E.C. 2008. Efecto de la temperatura y el producto sobre la eficacia insecticida del polvo de spinosad contra *Sitophilus*

- oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) y *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrychidae). Journal of Economic Entomology. 101 (3): 976-981.
- Barra, P., Rosso, L., Nesci, A., & Etcheverry, M. 2013. Isolation and identification of entomopathogenic fungi and their evaluation against *Tribolium confusum*, *Sitophilus zeamais*, and *Rhyzopertha dominica* in stored maize. Journal of Pest Science. 86 (2): 217-226. <https://doi.org/10.1007/s10340-012-0460-z>.
 - Bartosik, R. 2012. Eficiencia de poscosecha. Control de insectos en granos almacenados. Gacetilla de divulgación. Febrero de 2012. PRECOP.
 - Bartosik, R. 2013. La Poscosecha en Argentina: contexto Actual. Gacetilla de prensa. <http://inta.gob.ar/documentos/la-poscosecha-en-argentina-contexto-actual>. Acceso setiembre 2013.
 - Batista Filho, A., Almeida, J.E., & Lamas. C. 2001. Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. Neotrop Entomol 30(3): 437-447. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2001000300017>.
 - Birch, L.C. 1945a. The mortality of the immature stages of *Calandra oryzae* L. (small strain) and *Rhyzopertha dominica* Fab. in wheat of different moisture contents. Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science. 23, 141e145.
 - Birch, L.C. 1945b. The influence of temperature on the development of the different stages of *Calandra oryzae* L. and *Rhyzopertha dominica* Fab. (Coleoptera). Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science. 23, 29e35.
 - Birch, L.C. 1953. Experimental background to the study of the distribution and abundance of insects-I: the influence of temperature, moisture and food on the innate capacity for increase of three grain-beetles. Ecology. 34, 698e711.
 - Boucias, D.G., Stokes, C., Storey, G., & Pendland, J.C. 1996. The effect of imidacloprid on the termite *Reticulitermes flavipes* and its interaction with the mycopathogen *Beauveria bassiana*. Pflanzenschutz-Nachr Bayer 49:103–144
 - Boucias, D.G., & J.C. Pendland. 1998. Entomopathogenic fungi: fungi imperfecti. In Principles of insect pathology. 321-364. Springer, Boston, MA.

- Breese, M.H. 1960. The infestibility of stored paddy by *Sitophilus sasakii* (Tak.) and *Rhyzopertha dominica* (F.). Bulletin of Entomological Research. 51, 599e630.
- Carpaneto, B. 2010. Caracterización y manejo integrado de plagas en granos almacenados (Phylum: Arthropoda). Trabajo de monografía para optar por el grado de Especialista en Producción Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Cantone, F.A., & Vandenberg, J.D. 1998. Intraspecific diversity in *Paecilomyces fumosoroseus*. Mycological Research. 102(2), 209-215.
- Casini, C. 2006. Trigo: en la poscosecha se pierden casi 150 millones de dólares. Gacetilla de presa. <http://www.todoagro.com.ar/noticias/nota.asp?nid=2180> acceso setiembre 2009.
- Casini, C., & Santajuliana M. s/f. Control de plagas en granos almacenados. INTA EEA Manfredi. Recuperado de <http://www.cosechaypostcosecha.org/data/articulos/postcosecha/ControlPlagasGranos Almacenados. asp>.
- Cazorla D., & Morales P. 2010. Compatibilidad de 13 aislamientos de *Beauveria bassiana* patógenos para *Rhodnius prolixus* (Triatominae) con insecticidas químicos. Bol Mal Salud Amb 50(2): 261-270.
- Chittenden, F.H. 1911. The lesser grain borer and the larger grain borer. Bulletin of United State Bureau of Entomology. 96, 29e47.
- Collins, P.J. 2006. Resistance to chemical treatments in insect pests of stored grain and its management. In Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored Product Protection (Vol. 15).
- Cox, P.D., & Collins L.E. 2002. Factors affecting the behaviour of beetle pests in stored grain, with particular reference to the development of lures, Journal of Stored Products Research. 38(2), pp. 95-115.
- Dal Bello, G., Padín S., López Lastra C.C., & M. Fabrizio. 2001. Laboratory evaluation of chemical-biological control of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored grains. Journal of Stored Products Research. 37(1), 77-84.

- D'Alessandro, C.P., Jones L.R., Humber R.A., López Lastra C.C., & Sosa-Gomez D.R. 2014. Characterization and phylogeny of *Isaria* spp. strains (Ascomycota: Hypocreales) using ITS 1-5.8 S-ITS 2 and elongation factor 1-alpha sequences. *Journal of basic microbiology*. 54(S1), S21-S31.
- Doane, R.W. 1919. Weevils in Australian wheat in California. *Journal Economic Entomology*. 12, 308e312.
- Doberski, J.W., & Tribe, H.T. 1980. Isolation of entomogenous fungi from elm bark and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Transactions of the British Mycological Society*, 74(1), 95-100. doi:10.1016/S0007-1536(80)80013-1
- Edde, P.A. 2012. A review of the biology and control of *Rhyzopertha dominica* (F.) the lesser grain borer. *Journal of Stored Products Research*. 48, 1-18.
- Eilenberg, J., Hajek, A., & Lomer, C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46(4), 387-400. doi: 10.1023/A:1014193329979
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 1983. Almacenamiento de granos a nivel rural. Serie Tecnología poscosecha Núm. 1. Santiago, Chile: FAO Ed. <http://www.fao.org/3/x5027s/x5027S0h.htm#Introducci%C3%B3n>
- Fisher, W.S. 1950. A Revision of the North America Species of Beetles Belonging to the Family Bostrichidae. In: *Miscellaneous Publication*, vol. 698. USDA, Washington, DC.
- Forlani, L. 2014. El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*: su interacción con insectos vectores de la enfermedad de Chagas y con el insecticida Deltametrina (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Fregonesi, A.F., Mochi, D.A., & Monteiro, A.C. 2016. Compatibilidade de isolados de *Beauveria bassiana* a inseticidas, herbicidas e maturadores em condições de laboratório. *Arq Inst Biol* 83. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000242014>.

- Fresa, D.J. 1971. El hongo *Entomophthora grylli* en tucuras. Rev. Invest. Agrop. Serie V. Patol. Veg. 8: 83-88.
- Fresa, D.J. 1979. Hongos entomopatógenos observados en larvas de lepidópteros perjudiciales para cultivos de la República Argentina. IDIA 373: 149- 155
- Fusé, C.B., Villaverde M.L., Padín S.B., Del Giusto M.A., & Juárez M.P. 2013. Evaluación de la actividad insecticida de tierras de diatomeas de yacimientos argentinos. Gerencia de Comunicación e Imagen Institucional, DNA SICC, INTA.
- Fuxa, J.R., & Tanada, Y. (Eds.). 1987. Epizootiología de enfermedades de insectos. John Wiley & Sons.
- Goettel, M.S., & Inglis, G.D. 1997. Fungi: Hyphomycetes. En Manual of Techniques in Insect Pathology. Lacey, L. A. (Ed.), capítulo V-3 (pp. 213-250), Academic Press, New York. doi: 10.1016/B978-012432555-5/50013-0.
- Guedes, Nariko Carvalho, R., Alan Dover B., & Kambhampati S. 1996. Resistance to chlorpyrifos-methyl, pirimiphos-methyl, and malathion in Brazilian and US populations of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). Journal of Economic Entomology. 89(1), 27-32.
- Gutierrez, A.C., Tornesello Galván, J., Manfrino, R.G., Hipperdinger, M., Falvo, M., D'Alessandro, C., & López Lastra, C.C. 2017. Organización y conservación de la colección de hongos patógenos y simbioses de insectos y otros artrópodos del CEPAVE (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina. Revista Argentina de Microbiología, 49(2), 183-188. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.09.007> .
- Hesketh, H., Roy H.E., Eilenberg J., Pell J.K., & R.S. Hails. 2010. Challenges in modelling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects. BioControl. 55(1), 55-73.
- Hodges, R.J., Buzby J.C., & Bennett B. 2011. Postharvest losses and waste in developed and less developed countries: opportunities to improve resource use. The Journal of Agricultural Science. 149(S1), 37-45.

- 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. doi: 10.1128/AEM.71.9.5260-5266.2005
- Howe, R.W. 1950. The development of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) under constant temperature. *Entomologist's Monthly Magazine*. 86, 1e5.
- Humber, R.A. 2012. Identification of entomopathogenic fungi. Richard A. Humber USDA-ARS Biological Integrated Pest Management Research Unit, Robert W. Holley Center for Agriculture and Health, 538 Tower Road, Ithaca, NY 14853-2901, USA
- Inglis, G.D., Goettel M.S., Butt T.M., & Strasser H. 2001. Use of Hyphomycetes fungi for managing insect pests. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (eds.) *Fungi as Biological Agents. Progress, Problems and Potential*. CAB Publishing, Wallingford, UK. pp. 23-69.
- Inglis, P.W., Tigano, M.S., & Valadares-Inglis, M.C. 1999. Transformation of the entomopathogenic fungi, *Paecilomyces fumosoroseus* and *Paecilomyces lilacinus* (deuteromycotina: hyphomycetes) to benomyl resistance. *Genetics and molecular biology*, 22, 119-123.
- Juárez, M. P. & Calderón Fernández, G. 2007. Cuticular hydrocarbons of triatomines. *Comp. Biochem. and Physiol. Molecular and Integrative Physiology*. 147: 711-130.
- Kucerová, Z., & Stejskal V. 2008. Differences in egg morphology of the stored grain pests *Rhyzopertha dominica* and *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Stored Products Research*. 44, 103e105.
- Lacey, L. A. (Ed.). 2012. *Manual of techniques in invertebrate pathology*. Academic Press.
- Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., & Goettel, M.S. 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *J Invertebr Pathol* 132: 1-41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>.

- Lane B.S., Humphreys, A.M., Thompson, K., & Trinci, A.P.J. 1988. ATP Content of stored spores of *Paecilomyces farinosus* and the use of ATP as criterion of spore viability. Transactions of the British Mycological Society, 90(1), 109–111. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(88\)80186-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(88)80186-4) .
- Lecuona, R.E. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga.
- Lecuona, R.E. 1999. Control microbiano con hongos entomopatógenos en la Argentina. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina. 58(1-2): 301-306.
- Leles, R.N., López Lastra, C.C., García, J.J., Fernandes, É.K.K., & Luz, C. 2013. A simple method for the detection of *Leptolegnia chapmanii* from infected *Aedes aegypti* larvae. Canadian Journal of Microbiology, 59(6), 425-429. doi: 10.1139/cjm-2012-0703.
- Lesne, P. 1896. Revision des coléoptères de la famille des Bostrychides. Extrait des Annales Societec Entomologique de France. 65, 332e333.
- Lomer, C.J., Bateman, R.P., Johnson, D.L., Langewald, J., & Thomas M. 2001. Biological control of locust and grasshoppers. Anual Rev, Entomol. 44: 667–702.
- López Lastra, C.C. 1988. Nuevas especies de insectos hospedadores para el hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (Deuteromycotina: Hyphomycetes) en Argentina y consideraciones sobre su patogenia. Revista de la Facultad de Agronomía, UNLP. Tomo LXIV (entregas 1 y 2).
- López Lastra, C.C. 1989. Primera cita de *Cordyceps sobolifera* (Ascomycotina: Pyrenomycetes) patógeno de insectos en la República Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 26 (1-2): 59-60.
- López Lastra, C.C. 1990. Primer registro de *Aphanocladium album* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) como patógeno de insectos en la República Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 26 (3-4): 259-260.

- López Lastra, C.C., & A.C. Scorsetti. 2006. Hongos patógenos de insectos en Argentina (Zygomycetes: Entomophthorales). *Revista de biología tropical*. 54 (2), 311-315.
- López Lastra, C.C., & García, J.J. 2021. *Patología de insectos*. Libros de Cátedra.
- López Lastra, C.C., & Lecuona R.E. 2019. (eds.); 1a ed. Castelar, Buenos Aires. Ediciones INTA, CABA. 263 pp. ISBN 978-987-521-975-5
- López Lastra, C.C., Manfrino, R.G., Rodríguez, M.B., Gutierrez, A.C., Ordoqui, E., & Navone, G.T. 2020. Catálogo de la colección de cultivos de especies de hongos patógenos y simbioses de insectos y otros artrópodos de la Argentina. *Gayana. Botánica*, 77(1), 23-37.
- Lord, J.C. 2005. Low humidity, moderate temperature, and desiccant dust favor efficacy of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bruchidae). *Biological Control*. 34(2):180-186.
- Loureiro, E.S., Moino, A. Jr., Arnosti, A., & Souza, G.C. 2002. Efeito de Produtos fitossanitários Químicos Utilizados em Alface Crisântemo Sobre Fungos Entomopatogênicos. *Neotrop Entomol* 31(2): 263-269. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2002000200014>.
- Luangsa-ard J, Houbraken J., Doorn T., Hong S.B., Borman A.M., Hywel-Jones N.L., & Samson R. 2011. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiol Lett* 321:141–149.
- Lyman Ott, R. & Longenecker, M. 2001. 5th ed. *An introduction to statistical methods and data analysis*. Ed. Pacific Grove, CA: Duxbury, 2001.
- Magan, N. 2001. Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents. In: ed. Butt T. M., Jackson C., Magan N. (eds.) *Fungi as Biocontrol Agents* Wallingford: CAB International.

- Magnusson, E., & Cranfield J.A.L. 2005. Consumer demand for pesticide free food products in Canada: A probit analysis. *Canadian Journal of Agricultural Economics/Revue canadienne d'agroeconomie*. 53(1), 67-81.
- Mahdneshin, Z., Safaralizadah, M.H., & Ghosta, Y. 2009. Study on the efficacy of Iranian Isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) sorokin against *Rhyzopertha dominica* F. (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Biological Sciences*, 9(2): 170-174.
- Mamprim, A.P., Angeli Alves, L.F., da Silva Pinto, F.G., Formentini, M.A., Castilho Martins, C., & Barbosa Pares, R. 2014. Efecto de productos fitosanitarios sobre parámetros biológicos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae). *Rev Protección Veg* 29(2): 128-136. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v29n2/rpv08214.pdf>.
- Marchionatto, J.B. 1934. Algunos hongos entomógenos comunes en la República Argentina y las posibilidades de su aplicación agrícola. *Rev. Fac. Agr. y Vet. Univ. Buenos Aires*. 7: 571- 584.
- Marchionatto, J.B. 1942. Nota sobre la muscardina verde *Metarhizium anisopliae* (Metschn) Sorok. *Rev.Chil. Hist. Nat.* 1942- 1943: 12-14.
- Maxwell, S., Delaney, H., Kelley, K. 2018. *Designing Experiments and Analyzing Data* (Thrid Edition). Routledge, New York.
- Moino JR., A., Alves, S.B., & Pereira, R.M. 1998. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin isolates for control of stored-grain pests. *Journal of Applied Entomology*. 122 (1-5): 301-305. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1998.tb01501.x>.
- Moino, A. Jr., & Alves, S.B. 1998. Efeito de Imidacloprid e Fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metharhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagem). *An Soc Entomol Bras* 27: 611-619. <https://doi.org/10.1590/S0301-80591998000400014>.

- Monro, H.A., Upitis E., & Bond E.J. 1972. Resistance of a laboratory strain of *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) to phosphine. *Journal of Stored Products Research*. 8: 199-207.
- Nayak, M.K., & Daglish, G.J. 2018. Importance of Stored Product Insects. In: Athanassiou and Arthur (eds) *Recent advances in stored product protection*. Springer-Verlag, GmbH, Germany pp 1-17.
- Neves, P., Hirose, E., Tchujo, P., & Moino, A. 2001. Compatibility of Entomopathogenic Fungi with Neonicotinoid Insecticides. *Biol Cont*. 30 (2): 263-268. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2001000200009>.
- Nishimatsu T., & Jackson J.J. 1998. Interaction of insecticides, entomopathogenic nematodes, and larvae of the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J Econ Entomol.*; 91:410---8.
- Nguyen, T.T., Collins, P.J., & Ebert, P.R. 2015. Inheritance and characterization of strong resistance to phosphine in *Sitophilus oryzae* (L.). *PLoS one* 10: e0124335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124335>.
- Novo R., Cavallo A., Cragolini C., Nobile R., Bracamonte E., Conles M., Ruosi G., & Viglianco A. 2011. "Protección Vegetal". 4º edición. Editorial: SIMA. 492 pp.
- Oliveira, R.P., Pessoa, L.G.A., & de Souza Loureiro, E. 2018. Compatibilidade de inseticidas utilizados no controle da mosca branca em soja com *Beauveria bassiana*. *Rev Agric Neotrop* 5(4): 88-93. <https://doi.org/10.32404/rean.v5i4.2416>.
- Padín, S., Dal Bello G., & Fabrizio M. 2002. Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and bean treated with *Beauveria bassiana*. *Journal of Stored Products Research*, 38: 69-74.
- Padín, S.B., & Passalacqua S.A. 2018. *Protección Vegetal. Series: Libro de Cátedra*.

- Padín, S.B., Dal Bello G., & Vasicek A. 1995. Potencial bioinsecticida de hongos entomopatógenos de plagas en granos almacenados. Revista de la Facultad de Agronomía de la UBA, 15: 1-7.
- Padín, S.B., Dal Bello G.M., & Vasicek A.L. 1997. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* for Adults of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) in Stored Grains. Entomophaga. 42: 569-574.
- Pedrini, N., Juárez, M.P., & Crespo, R. 2007. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. Comp. Biochem. and Physiol. Toxicology & Pharmacology. 146, 124-137.
- Pelizza, S.A., Scorsetti, A.C., Fogel, M.N., Pacheco-Marino, S.G., Stenglein, S.A., Cabello, M.N., & Lange, C.E. 2015. Compatibility between entomopathogenic fungi and biorational insecticides in toxicity against *Ronderosia bergi* under laboratory conditions. BioControl. 60(1), 81-91.
- Pessoa, L.G.A., Souza, T.M.N., & de Souza Loureiro, E. 2020. Compatibilidade de inseticidas utilizados no manejo de pragas em eucalipto com *Beauveria bassiana* (Cordycipitaceae). Res, Soc Dev 9(8). <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5148>.
- Pimentel, M.A.G., Lrd'a F., Guedes R.N.C., Sousa A.H., & Tótola M.R. 2009. Phosphine resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Stored Products Research. 45(1), 71-74.
- Pina, J.I. 2012. Clasificación Toxicológica y Etiquetado de Productos Fitosanitarios. Criterios Regulatorios Locales e Internacionales. Primera ed. Buenos Aires: ILSI Argentina. Vol III. 40 p. 100. Pitt JI., Hocking AD. (1997) Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic and Professional, London.
- Pinto, A.P.F. 2016. Patogenicidade de fungos entomopatogênicos e compatibilidade com inseticidas para o manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama, (Hemiptera: Liviidae) (Tesis doctoral). Universidade Estadual Paulista (Unesp).
- Potrich, M., da Silva, R.T., Maia, F., Lozano, E.R., Rossi, R.M., Colombo, F.C., Tedesco, F.G., & Gouvea, A.D. 2018. Effect of entomopathogens on africanized

- Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Rev Bras Entomol 62(1): 23-28.
<https://doi.org/10.1016/j.rbe.2017.12.002>.
- Potter, C. 1935. The biology and distribution of *Rhyzopertha dominica* (FAB.). Transactions of the Royal Entomological Society of London 83, 449e482
 - Quintela, E.D., & Mc Coy, C.W. 1997. Pathogenicity enhancement of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to first instars of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) with sublethal doses of imidacloprid. Environ Entomol 26(5): 1173-1182. <https://doi.org/10.1093/ee/26.5.1173>.
 - Quintela, E.D., & Mc Coy, C.W. 1998. Synergistic effect of imidacloprid and two entomopathogenic fungi on the behavior and survival of larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in soil. Journal of Economic Entomology. 91: 110-122.
 - R Core Team. 2018. R: a language and environment for statistical computing.. <https://www.r-project.org/>
 - R Core Team. 2023. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>
 - Rees, D.P. 2004. Insectos de productos almacenados. Publicación CSIRO.
 - Rehner, S.A., Minnis, A.M., Sung, G.H., Luangsa-ard, J.J., Devotto, L., & Humber, R. A. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. Mycologia, 103(5), 1055-1073.
 - 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.
 - Rehner, S.A., & Kepler, R.M. 2017. Species limits, phylogeography and reproductive mode in the *Metarhizium anisopliae* complex. Journal of invertebrate pathology, 148, 60-66.

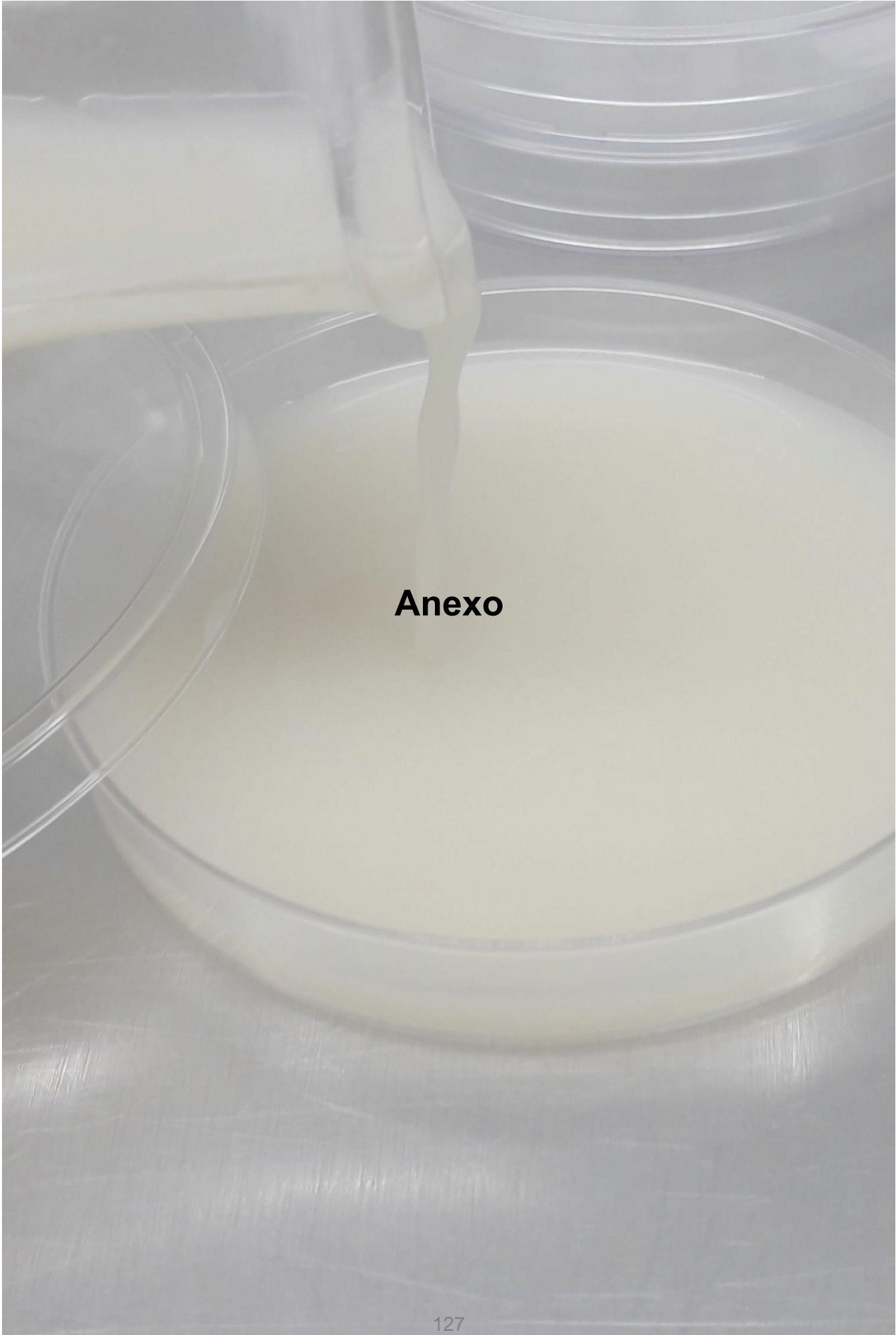
- Reichmuth, Ch., Schöller, M., Ulrichs, Ch. 2007. Stored Product Pests in Grain. Morphology – Biology – Damage – Control. AgroConcept Verlagsgesellschaft, Bonn, 170 pp.
- Rice, W.C., & Cogburn, R.R. 1999. Activity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) against three coleopteran pests of stored grain. *Journal of Economic Entomology*. 92(3): 691-694. <https://doi.org/10.1093/jee/92.3.691> .
- Rossi-Zalaf, L.S., Alves S.B., Lopes R.B., Silveira Neto S., & Tanzini M.R. 2008. Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doenças. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Eds.) Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. FEALQ, Piracicaba, p. 270-302.
- Roy, H.E., Steinkraus D.C., Eilenberg J., Hajek A.E., & Pell J.K. 2006. Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 331-357.
- Rozman, V., Kalinovic I., & Z. Korunic. 2007. Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*. 43: 349–355.
- Sartori, M.R., Pacheco I.A., & Vilar R.M.G. 1991. Resistance to phosphine in stored grain insect in Brazil. In: Fleurat-Lessart F., Ducom P. (eds.) Proceedings of the 5th International Working Conference on Stored-products Protection. Bordeaux, France, 9-14 September 1990, pp. 1041- 1049.
- Savi, M.K.; Mangamana, E.T.; Deguenon, J.M.; Hounmenou, C.G., & Kakaï, R.G. 2017. Determination of lethal concentrations using an R software function integrating the Abbott correction. *Journal of Agricultural Science and Technology*. A7: 25-30. Available in: DOI:10.17265/2161-6256/2017.01.004.
- Schapovaloff, M.E. 2013. Diversidad y patogenicidad de especies de hongos entomopatógenos en insectos plaga de la yerba mate *Ilex paraguariensis* en la provincia de Misiones (Doctoral disertación, Universidad Nacional de La Plata).

- Schumacher, V., & Poehling H.M. 2012. In vitro effect of pesticides on the germination, vegetative growth, and conidial production of two strains of *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Biology* 116, 121e132.
- Schwardt, H.H. 1933. Life history of the lesser grain borer. *Journal of the Kansas Entomological Society* 2, 61e66.
- Scorsetti, A.C. 2007. Estudios relativos a los hongos patógenos de insectos plaga en cultivos hortícolas como potenciales agentes de control biológico (Doctoral disertación, Universidad Nacional de La Plata).
- Sosa-Gómez, D.R. 1999. Estado actual del control biológico de plagas agrícolas con hongos entomopatógenos. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*. 58 (1-2): 307-311.
- Sosa Gómez, D.R. 2005. Seletividade de agroquímicos para fungos entomopatogênicos. *Embrapa Soja Outras Publicações Científicas* 2005. https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPSO-2009-09/28931/1/seletiv_fung.pdf [accessed 19 May 2021].
- Sosa-Gómez, D.R., & Moscardi F. 1991. Microbial control and insect pathology in Argentina. *Ciencia e cultura*. 43(5): 375-379.
- Spegazzini, C. 1880. *Sporotrichum globuliferum*. *Fungi Argentini* N° 164 *Ann. Soc. Cient. Arg.* 10: 278- 285.
- Spegazzini, C. 1913. *Mycetes Argentinenses*. *Anales Mus. Hist. Nat. Buenos Aires* 20: 167- 186.
- Stadler, T., Subramanjam B., & Ferrero A.A. 2003. Monitoring for insecticide resistance in major stored product pests in Argentina: a review. *Agriscientia*. 20, 99-110.
- Stefanazzi, N., Gutiérrez M.M., Stadler T., Bonini N.A., & Ferrero A.A. 2006. Actividad biológica del aceite esencial de *Tagetes terniflora* Kunth (Asteraceae) en *Tribolium castaneum* Herbst (Insecta, Coleoptera, Tenebrionidae).
- Stevens, R. 1974. Stains, Reagents, Media. En Stevens, R. (Ed.), *Mycology*

- Guidebook, (p. 651). University of Washington Press, Seattle, USA. ISBN 0-295-95313-6.
- Strada, J. 2014. Evaluación del nivel de residuos de plaguicidas en granos de cereales y oleaginosas aplicados en el campo y en almacenamiento en la región central de Argentina.
 - Strasser H., Vey, A., & Butt, T.M. 2000. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolite of *Metarhizium*, *Tolyocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Science and Technology*, 10(6), 717-735. <https://doi.org/10.1080/09583150020011690>.
 - Tamai M., Alves, S., Lopes, R., Faion, M., & Padulla, L. 2002. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Arq Inst Biol* 69: 89-96.
 - Tanada, Y., & Kaya H. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press, San Diego, California, USA. 666 pp.
 - Tanya, S., & Doberski J. 1984. An investigation of the entomogenous fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as a potential biological control agent for *Oryzaephilus surinamensis* (L.). *J Stored Prod Res.* 20:17–23
 - Toledo, A.V., Scorsetti A.C., Dikgolz V.E., & López Lastra C.C. 2004. *Paecilomyces fumosoroseus* y *Nomuraea rileyi* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), hongos patógenos de insectos plaga de la agricultura en la Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica.* 39 (1-2): 21-26.
 - Uçar, S., Atay, T., & Yanar, Y. 2020. Insecticidal activities of four native entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* Bals.(Vuill) isolates against *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797)(Coleoptera: Tenebrionidae) adults under laboratory conditions. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(sp1), 67-69.

- Vardeman, E.A., Arthur, F.H., Nechols, J.R., & Campbell, J.F. 2007. Efficacy of surface applications with diatomaceous earth to control *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) in stored wheat. *Journal of Stored Products Research*. 43(4): 335-341. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2006.08.003>.
- Vassilakos, T.N., Athanassiou C.G., Kavallieratos N.G., & Vayias B.J. 2006. Influence of temperature on the insecticidal effect of *Beauveria bassiana* in combination with diatomaceous earth against *Rhyzopertha dominica* and *Sitophilus oryzae* on stored wheat. *Biological Control*. 38(2):270-281.
- Vega, F.E., Meyling N.V., Luagnsa-ard J.J., & Blackwell M. 2012. Fungal entomopathogens. In *Insect Pathology*. Second Edition. Vega FE, Kaya HK. Academic Press.
- 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.
- Vilchez R.M., & O.R.R Miller. 2006. Calidad fitosanitaria y presencia de aflatoxinas en granos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), en almacén y campo, 2005. Trabajo de diploma. Universidad Nacional Agraria. Facultad de Agronomía. Managua, Nicaragua. 96 pp.
- Wakil W., Muhammad A., Ghazanfar M. U., & Tahira R. 2010. Susceptibility of stored-product insects to enhanced diatomaceous earth. *Journal of Stored Products Research*. 46(4):248-249.
- Wakil, W., & Ghazanfar, M.U. 2010. Entomopathogenic fungus as a biological control agent against *Rhyzopertha dominica* F. (Coleoptera: Bostrychidae) on stored wheat. *Archives of phytopathology and Plant Protection*. 43(12): 1236-1242. <https://doi.org/10.1080/03235400802404718>.
- Wakil, W., Schmitt, T., & Kavallieratos, N.G. 2021. Persistence and efficacy of enhanced diatomaceous earth, imidacloprid and *Beauveria bassiana* against three coleopteran and one psocid stored-grain insects. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 23459–23472.

-
- Wang S., Tang J., Johnson J.A., Mitcham E., Hansen J.D., Hallman G., Drake S.R., & Wang Y. 2003. Dielectric Properties of Fruits and Insect Pests as related to Radio Frequency and Microwave Treatments. *Biosystems Engineering*. 85 (2): 201-212.
 - White, N.D.G., & J.G Leesch. 1996. Chemical control. u: Subramanyam B. and Hagstrum DW [ur.] *Integrated management of insects in stored products*.
 - Winterbottom, D.C. 1922. Weevil in wheat and storage of grain in bags.
 - World Health Organization (WHO). 2009. *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification*; IPCS-IOMC: 81pp.
 - Zimmermann, G. 1998. Suggestions for a standardized method for reisolation of entomopathogenic fungi from soil using the bait method. *IOBC WPRS BULLETIN*, 21, 289-289.



Anexo

1. Medios de cultivo

Papa Dextrosa Agar (PDA) o Agar Papa Glucosa (APG)

Papa Glucosado Agar (Marca comercial: Laboratorios Britania S.A.-CABA Argentina). Uso: 39 g de polvo en 1000 mL agua destilada.

Sabouraud Dextrosa Agar (SDAY)

Tabla 1. Sabouraud Dextrosa Agar (SDAY) (Goettel e Inglis, 1997)

	SDAY	*SDYA ¼
Peptona	10 g	2.5 g
Dextrosa	20 g	4 g
Extracto de levadura	10 g	2.5 g
Agar	20 g	10 g
Agua destilada	1000 mL	1000 mL

- Se suplementó en los casos indicados con: Cloranfenicol 0,5 g.

*Se utilizó una variante de este medio con los componentes nutricionales reducidos al 25% de su cantidad original.

Medio selectivo

Tabla 2. Medio selectivo para aislar hongos entomopatógenos a partir de suelo (Doberski y Tribe, 1980)

Dextrosa	40 g
Peptona	10 g
Agar	15 g
Cloranfenicol*	0.5 g
Cristal violeta	0.01 g
Agua destilada	1000 mL
*Dodine (acetato de N-dodecilguanidinio)	0.25 g

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

Medio agar-agua

Tabla 3. Agar-agua (Cámaras húmedas) (Leles *et al.*, 2013)

Agar	20 g
Agua destilada	1000

2. Antibióticos

Cloranfenicol

Uso: 250mg/50mL agua destilada estéril. Fue esterilizado por filtrado a través de filtros (30 mm, MCE membrana, 0,22µm. SYRINGE-DRIVEN FILTERS). Usar 1 mL de antibiótico por cada 100 mL de medio de cultivo.

Pentabiótico®

Reforzado Veterinario 6.000.000 UI Inyectable. Marca Comercial: Zoetis

3. Colorantes

Azul de algodón

Tabla 4. Azul de algodón-Lactofenol de Ammann (Stevens, 1974)

Fenol (cristales)	20 g
Ácido láctico	20 g (16mL)
Glicerol	40 g (31 mL)
Azul de algodón	0.05-1 g
Agua destilada	20 (20mL)

4. Dietas para la cría de los insectos plaga

Tabla 5. Composición de la dieta utilizada para la cría de los insectos plaga

Especie insectil	Medio de cría
<i>Rhyzopertha dominica</i>	Cebada perlada
<i>Tribolium castaneum</i>	Harina de trigo 85% Levadura de cerveza en polvo 5% Leche descremada en polvo 5% Germen de trigo 5%
<i>Sitophilus oryzae</i>	Trigo natural
<i>Oryzaephilus surinamensis</i>	Avena arrollada