



UNCUYO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

TESIS DE DOCTORADO

Utilización de hongos entomopatógenos nativos de Argentina para el control biológico en vid, bajo condiciones controladas, de *Naupactus xanthographus* (Coleoptera: Curculionidae), *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) y *Brevipalpus* spp. (Acari: Tenuipalpidae)”.

DOCTORADO EN AGRONOMÍA

Tesista: MSc. Ing. Agr. Rodrigo Javier López Plantey

Directora: Dra. Ing. Agr. Gabriela Susana Lucero
Codirectora: Dra. Ing. Agr. Laura Monteiro Torres

Mendoza - 2019



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO



CITAB

Centre for the Research and Technology of
Agro-Environment and Biological Sciences

utad

UNIVERSIDADE
DE TRÁS-OS-MONTES
E ALTO DOURO

Si para alcanzar lo alcanzado,
debí perder primero lo perdido.

Si para conseguir lo conseguido,
tuve que soportar lo soportado.

Si para estar ahora premiado,
fue necesario haber sido herido.

Tengo por bien sufrido lo sufrido,
tengo por bien pasado lo pasado.

Porque después de todo he comprobado,
que no se goza bien de lo gozado, sino después de haberlo padecido.

Porque después de todo he comprendido,
que lo que el árbol tiene de florido, vive gracias a lo que tiene sepultado.

Modificación del soneto de Francisco L. Bernárdez
Cielo de tierra (1937)

“A mis padres...Ricardo y Olga”

RESUMEN

En los viñedos de Argentina han aparecido nuevas plagas, muchas de ellas consideradas “cuarentenarias”, que afectan a la producción en términos económicos, cualitativos y cuantitativos. Como la lucha contra dichas plagas es principalmente de base química, las investigaciones últimamente se han enfocado hacia el desarrollo de métodos alternativos seguros y capaces de sustituir a los insecticidas de síntesis. Por ello, la utilización de hongos entomopatógenos, dentro de un Manejo Integrado de Plagas (MIP) representa una táctica factible de utilizar. Estos microorganismos representan, entre otras propiedades, una fuerte especificidad entre patógeno-hospedante, la casi nula presencia de residuos tóxicos, su persistencia el tiempo y el bajo coste respecto a los productos de síntesis química. Bajo la hipótesis que existen en los viñedos del oeste argentino hongos entomopatógenos capaces de ser utilizados en un plan de MIP mediante control biológico de *Naupactus xanthographus*, *Lobesia botrana* y *Brevipalpus* spp., la presente Tesis posee como objetivo general evaluar, en condiciones controladas, la acción de hongos entomopatógenos nativos del oeste argentino en el control biológico de las plagas de la vid *L. botrana*, *N. xanthographus* y *Brevipalpus* spp. Para ello, se verificó la presencia de hongos entomopatógenos nativos mediante la búsqueda de insectos-plaga infectados *in vivo* y el método de insecto-trampa sobre muestras de suelos de viñedos en las provincias de Salta, Catamarca, La Rioja, San Juan, Mendoza, Neuquén y Río Negro. Los hongos encontrados se aislaron en medios específicos para determinar sus características morfológicas y se identificaron en base a técnicas moleculares. Se identificaron tres especies fúngicas *Beauveria bassiana*, *Metarhizium robertsii* y *Paecilomyces lilacinus*. Se evaluaron los rangos térmicos de crecimiento para las cepas aisladas y su compatibilidad con 4 de los principales fungicidas de uso en la viticultura argentina (Mancozeb, Oxicloruro de Cobre, Azufre y Quinoxifen). Se estudió, bajo condiciones controladas, la acción patogénica de las cepas nativas aisladas y un producto comercial nacional sobre larvas L4 y L5 de *L. botrana*, adultos de *N. xanthographus* y juveniles/adultos de *Brevipalpus* spp. Asimismo, se realizaron, en condiciones controladas, bioensayos de entomopatogenicidad sobre distintos estados de los individuos benéficos *Apis mellifera* y *Harmonia axydiris*. Los resultados obtenidos permitieron aceptar la hipótesis planteada y abrir la posibilidad a la incorporación de estos microorganismos dentro de un plan de Manejo Integrado de Plagas de la vid en Argentina.

ABSTRACT

New pests have appeared in the vineyards of Argentina, many of them considered "quarantine", affecting production in economic, qualitative and quantitative terms. As the fight against these pests is mainly chemically based, research has recently focused on the development of safe alternative methods capable of substituting synthetic insecticides. Therefore, the use of entomopathogenic fungi within an Integrated Pest Management (IPM) represents a feasible tool to use. These microorganisms have, among other properties, a strong specificity between pathogen-host, the almost null presence of toxic residues, their persistence, time and low cost with respect to chemical synthesis products. Under the hypothesis that there are entomopathogenic fungi capable of being used in an IPM plan by biological control of *Naupactus xanthographus*, *Lobesia botrana* and *Brevipalpus* spp. in the vineyards of western Argentina, the present thesis has as a general objective to evaluate, under controlled conditions, the action of entomopathogenic fungi native to the Argentine west in the biological control of the plagues of the vine *L. botrana*, *N. xanthographus* and *Brevipalpus* spp. The presence of native entomopathogenic fungi was verified by searching for in vivo infected insect pests and the insect trap method on soil samples from vineyards in the provinces of Salta, Catamarca, La Rioja, San Juan, Mendoza, Neuquén and Río Negro. The fungi found were isolated in specific media to determine their morphological characteristics and were identified based on molecular techniques. Three fungal species were identified: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium robertsii* and *Paecilomyces lilacinus*. The thermal growth ranges for the isolated strains were evaluated and their compatibility with 4 of the main fungicides used in Argentine viticulture (Mancozeb, Copper Oxychloride, Sulphur and Quinoxifen). It was studied, under controlled conditions, the pathogenic action of native strains isolated a national commercial product on larvae L4 and L5 of *L. botrana*, adults of *N. xanthographus* and juveniles/adults of *Brevipalpus* spp. Also, bioassays of entomopathogenicity on different states of the beneficial individuals *Apis mellifera* and *Harmonia axydiris* were carried out under controlled conditions. The results obtained allowed to accept the hypothesis and to open the possibility to the incorporation of these microorganisms within an Integrated Pest Management plan of the grapevine in Argentina.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, debo agradecer a mi Directora, la Dra. Gabriela Lucero por la confianza, el apoyo, el acompañamiento cotidiano y el cariño brindado en estos años de trabajo, estudios y metas. Sin su ayuda, no hubiera podido encarar esta ardua labor.

A mi Codirectora, la Dra. Laura Monteiro Torres y mi Codirector de beca, el Dr. Gustavo Flores, por creer en el proyecto y brindarme el apoyo necesario.

Al CONICET por otorgarme la beca doctoral que me permitió dedicarme de lleno a esta pasión por el estudio y la investigación, y al IBAM por acobijarme en su instituto.

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNCuyo, por seguir siendo mi *alma mater* en todos mis desafíos académicos. Soy un hijo de la educación pública, y un orgulloso egresado de esta Universidad.

Al Dr. Pablo Pizzuolo, por tantos días compartidos, con sus consejos, observaciones y alientos para continuar y formarme.

A la Ing. Miriam Holgado, por abrirme los brazos en su cátedra, y brindarme su apoyo desde el inicio. ¡Por quien fuera la gestora de esta aventura!

A mis colegas, de las Cátedras de Zoología y Fitopatología de la FCA-UNCuyo, por acompañarme siempre y permitirme muchas veces, tener el tiempo para dedicarme al doctorado.

A mis pasantes y queridos “umpa-lumpas”, Ing. Antonella Balloni, Ing. Josefina Zuin Segura, Sr. Andrés Riquelme por aguantar tardes de laboratorios y ensayos interminables.

A la Dra. Daciana Papura, el Dr. Denis Thiéry y la Dra. Juliette Poidatz, por darme la oportunidad de formarme en Francia, siendo uno más en los laboratorios del INRA.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia, a la cual amo; por estar siempre a mi lado, sin dejar de sostenerme en los momentos difíciles y de acompañarme en los buenos. Porque es gracias a mi padre y a mi madre, a mis abuelos y a mis hermanas a quienes debo lo que soy hoy en día, dado que es por ellos que poseo esta moral, este amor por las ciencias, la aventura y esta ambición por la excelencia académica.

Francamente... gracias a todos!!!

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE	IV
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABLAS	X
PROLOGO	1
POSICIONAMIENTO EPISTEMOLÓGICO	1
INTRODUCCIÓN	3
<i>La viticultura argentina</i>	3
Plagas presentes en la viticultura argentina	5
Paradigma sanitario de la última década	6
<i>Lobesia botrana</i> (Denis & Schiffermüller)	8
<i>Naupactus xanthographus</i> (Germar)	12
<i>Brevipalpus</i> spp.	18
<i>Uso de bioplaguicidas para el control biológico de plagas de la vid</i>	22
Los hongos entomopatógenos	23
<i>Objetivo general</i>	35
Objetivos específicos	35
<i>Hipótesis</i>	36
<i>Principio metodológico general</i>	36
<i>Bibliografía</i>	37
<i>Páginas WEB</i>	44
CAPÍTULO I	46
ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN ZONAS VITÍCOLAS DEL OESTE ARGENTINO: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN	46
1.1 <i>Resumen</i>	46
1.2 <i>Introducción</i>	47
1.3 <i>Materiales y Métodos</i>	49
1.3.1 Aislamiento de hongos entomopatógenos	49
1.3.2 Identificación de cepas aisladas	54
1.4 <i>Resultados</i>	65
1.4.1 Aislamiento de hongos entomopatógenos	65
1.4.2 Identificación de las especies y de sus cepas aisladas	67
1.5 <i>Discusión</i>	76
1.6 <i>Bibliografía</i>	80
<i>Anexos Capítulo I</i>	85
CAPÍTULO II	97
CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENAS NATIVAS: RANGOS TÉRMICOS Y COMPORTAMIENTO FRENTE A FUNGICIDAS DE SÍNTESIS	97
<i>Resumen</i>	97
2.1 <i>Introducción</i>	98
2.2 <i>Materiales y Métodos</i>	100
2.3 <i>Resultados</i>	103
2.4 <i>Discusión</i>	124
2.5 <i>Bibliografía</i>	128

CAPÍTULO III.....	130
EVALUACIÓN, BAJO CONDICIONES CONTROLADAS, DE LA PATOGENICIDAD DE LAS ESPECIES DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS AISLADOS SOBRE LAS PLAGAS <i>LOBESIA BOTRANA</i> , <i>NAUPACTUS XANTHOGRAPHUS</i> Y <i>BREVIPALPUS</i> SPP.....	130
<i>Resumen</i>	130
3.1 <i>Introducción</i>	131
3.2 <i>Materiales y Métodos</i>	133
3.2.1 Estudio de la patogenicidad de cepas nativas sobre individuos juveniles de <i>L. botrana</i>	133
3.3 <i>Resultados</i>	138
3.3.1 Estudio de la patogenicidad de cepas nativas sobre individuos juveniles de <i>L. botrana</i>	138
3.4 <i>Discusión</i>	143
3.5 <i>Bibliografía</i>	145
CAPÍTULO IV.....	147
EVALUACIÓN, <i>IN VITRO</i> , DE LA PATOGENICIDAD DE LAS CEPAS NATIVAS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE ORGANISMOS BENÉFICOS: <i>APIS MELLIFERA</i> Y <i>HARMONIA AXYDIRIS</i> ..	147
<i>Resumen</i>	147
5.1 <i>Introducción</i>	148
5.2 <i>Materiales y Métodos</i>	151
5.2.1 Estudio de la patogenicidad de cepas aisladas sobre individuos adultos de <i>Apis mellifera</i>	151
5.2.2 Estudio de la patogenicidad de cepas aisladas sobre individuos adultos de <i>H. axydiris</i>	154
5.3 <i>Resultados</i>	156
5.3.1 Estudio de la patogenicidad de cepas aisladas sobre individuos adultos de <i>Apis mellifera</i>	156
5.3.2 Estudio de la patogenicidad de cepas aisladas sobre individuos adultos de la familia Coccinellidae.....	159
5.4 <i>Discusión</i>	160
5.5 <i>Bibliografía</i>	164
5.6 <i>Anexos</i>	167
CONCLUSIONES FINALES.....	182

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de distribución de las regiones vitivinícolas del Oeste argentino. Fuente: Wines of Argentina (2017).....	4
Figura 2: Huevos de <i>L. botrana</i> recién ovipuestos.....	8
Figura 3: Larva L3 de <i>L. botrana</i> sobre una inflorescencia de <i>V. vinífera</i> cultivar Malbec, Mendoza, Argentina.....	9
Figura 4: Pupas de <i>L. botrana</i> en racimos de uva cultivar Malbec, Mendoza, Argentina.....	10
Figura 5: Trampa tipo Delta para la captura de machos adultos de <i>L. botrana</i> . Fuente: ServoVendi (2018)	11
Figura 6: Ejemplar adulto de <i>N. xanthographus</i> . Escala: 1 mm. Ilustración: Roig, S. (Aragón et al., 1994).....	12
Figura 7: Adulto de <i>N. xanthographus</i> recién emergido, la flecha amarilla indica la presencia de ganchos mandibulares. Mendoza, Argentina.....	13
Figura 8: Esquema del ciclo de vida de <i>N. xanthographus</i> . Ilustración: C. Tobar (Ripa y Luppichini, 2010).....	14
Figura 9: Larvas <i>N. xanthographus</i> en distintos estadios. Fuente: Ripa y Luppichini (2010)	14
Figura 10: Esquema de la presencia de los distintos estados de <i>N. xanthographus</i> en función de la fenología de la vid. Fuente: C. Tobar (Ripa y Luppichini, 2010).....	15
Figura 11: Esquema de zonas de monitoreo en función del estado metafórico de <i>N. xanthographus</i> . Fuente: Ripa y Luppichini (2010)	17
Figura 12: Adulto hembra de <i>Brevipalpus</i> sp. oviponiendo en hojas de vid cultivar Malbec, Mendoza, Argentina.....	18
Figura 13: Ciclo de vida de <i>Brevipalpus</i> spp. Ilustración: C. Tobar (Ripa y Luppichini, 2010).....	19
Figura 14: Esquema de la presencia de las distintas generaciones de <i>Brevipalpus</i> spp. en función de la fenología de la vid. Fuente: C. Tobar (Ripa y Luppichini, 2010)	20
Figura 15: Esquema de monitoreo de <i>Brevipalpus</i> spp. en función a los distintos periodos del ciclo vegetativo. Fuente Ripa y Luppichini (2010).	21
Figura 16: Montaje y observación microscópica del género <i>Beauveria</i> . (a) Condensaciones globosas típicas de conidios. (b-d) Conidióforos con bases en forma de botella y esterigmas denticulares con conidios dispuestos en zigzag. Fuente: Humber (2012), p. 172. Las imágenes cuentan con permiso explícito del autor para su uso en la presente Tesis.....	29
Figura 17: Montaje y observación microscópica del género <i>Metarhizium</i> . (a) Masas de conidios agrupadas en largas cadenas paralelas que conforman columnas prismáticas. (b) Cadenas de conidios donde se puede observar la disposición de las cadenas unidas por sus laterales. (c) Conidióforos ramificados muy próximos unos de otros sobre una superficie fértil plana (himenio). (d) Ápices truncos donde las fiálides van conformando progresivamente los conidios. Fuente: Humber (2012), p. 179. Las imágenes cuentan con permiso explícito del autor para su uso en la presente Tesis.....	32
Figura 18: Montaje y observación microscópica del género <i>Isaria</i> (antes <i>Paecilomyces</i>). (a) Sinema. (b-e) Conidióforos (fiálides) con base ensanchada y cuello extendido. Fuente: Humber (2012), p. 177. Las imágenes cuentan con permiso explícito del autor para su uso en la presente Tesis.	34
Figura 19: Esquema del procedimiento efectuado para la identificación de cepas de hongos entomopatógenos aislados	54

Figura 20: Aspectos macroscópicos y microscópicos de las cepas correspondientes al primer grupo. (A) detalle de la colonia; (B) detalle del conidióforo (1000X); aumento digital detalle disposición zigzag de los conidios sobre el conidióforo con base en botella.....	67
Figura 21: Aspectos macroscópicos y microscópicos de las cepas correspondientes al segundo grupo. (A) detalle de la colonia; (B) detalle de la masa de conidios dispuestos en cadena (100X).....	68
Figura 22: Aspectos macroscópicos y microscópicos de las cepas correspondientes al tercer grupo. (A) detalle de la colonia; (B) detalle de los conidióforos con fiálides extendidas (100X).....	69
Figura 23: Larvas de <i>L. botrana</i> utilizadas en la técnica de insecto trampa para el aislamiento de hongos entomopatógenos a partir de muestras de suelos. (A) Primer grupo <i>Beauveria</i> ; (B) Segundo grupo <i>Metarhizium</i> ; (C) Tercer grupo <i>Paecilomyces</i>	69
Figura 24: Ejemplo de una fotografía con el resultado de electroforesis sobre gel de agarosa con una muestra del ADN total de algunas de las cepas aisladas. (A) PsoilAR4.1(2); (B) MsoilAR4.3; (C) MsoilAR2.5(2); (D) BinsAR1; (E) BinsAR2; (F) Testigo.....	70
Figura 25: Ejemplo de una fotografía con el resultado de electroforesis sobre gel de agarosa de la reacción PCR para (A) EF-1 α para <i>Beauveria</i> ; (B) EF-1 α para <i>Metarhizium</i> . 1. 1Kb, 2. 100bp, 3. ACA, 4. RINCO, 5. BinsAR1, 6. CCH, 7. BinsAR2, 8. BsoilAR4.1(2), 9 a 11. Cepas francesas, 12. MsoilAR2.5(2), 13. MsoilAR2.3(1), 14. PsoilAR24.3, 15. MsoilAR18.5(3), 16. MsoilAR2.3(2), 17. MsoilAR18.5(2), 18. MsoilAR2.3(4), 19. MsoilAR4.3, 20. MsoilAR14.3, 21. MsoilAR15.1, 22. Cepa francesa, 23. Psoil2.3(4) y 24. Blanco. Las cepas francesas presentes en esta imagen no forman parte de la presente Tesis.....	72
Figura 26: Bootstrap obtenido del análisis de Maximum Likelihood para las cepas aisladas del género <i>Beauveria</i> . Los valores en las ramificaciones corresponden a Maximum Likelihood y Maximum Parsimony (en negrita) (≥ 60). La cepa marcada con asterisco indica origen de muestra de suelo.....	73
Figura 27: Bootstrap obtenido del análisis de Maximum Likelihood para las cepas aisladas del género <i>Metarhizium</i> . Los valores en las ramificaciones corresponden a Maximum Likelihood y Maximum Parsimony (en negrita) (≥ 60).....	74
Figura 28: Bootstrap obtenido del análisis de Neighbor-Joining por la técnica Maximum Composite Likelihood con ramificaciones mayores al 70% para las cepas aisladas del género <i>Paecilomyces</i>	75
Figura 29: Ejemplo de áreas de crecimiento (cm ²) a diferentes temperaturas de la cepa BinsAR-1. (A) 4°C; (B) 17°C; (C) 21°C; (D) 24°C; (E) 35°C.....	103
Figura 30: Curvas de crecimiento de las cepas de <i>Beauveria</i> respecto a la media del género (primera parte): (A) ACA; (B) BinsAR1; (C) BinsAR2; (D) BsoilAR4.1(2). La línea continua indica el valor medio para todas las cepas aisladas del género <i>Beauveria</i>	104
Figura 31: Ejemplo de áreas de crecimiento (cm ²) a diferentes temperaturas de la cepa PsoilAR24.3. (A) 4°C; (B) 17°C; (C) 21°C; (D) 24°C; (E) 35°C.....	105
Figura 32: Curvas de crecimiento de las cepas de <i>Paecilomyces</i> respecto a la media del género: (A) PsoilAR4.1(2); (B) PsoilAR2.3(4); (C) PsoilAR24.3. La línea continua indica el valor medio para todas las cepas aisladas del género <i>Paecilomyces</i>	105
Figura 33: Ejemplo de áreas de crecimiento (cm ²) a diferentes temperaturas de la cepa MsoilAR-4.3. (A) 4°C; (B) 17°C; (C) 21°C; (D) 24°C; (E) 35°C.....	107
Figura 34: Curvas de crecimiento de las cepas de <i>Metarhizium</i> respecto a la media del género (Primera parte): (A) MsoilAR2.3(1); (B) MsoilAR2.3(2); (C) MsoilAR2.3(4); (D) MsoilAR2.5(2). La línea continua indica el valor medio para todas las cepas aisladas del género <i>Metarhizium</i>	107

Figura 35: Curvas de crecimiento de las cepas de <i>Metarhizium</i> respecto a la media del género (segunda parte): (A) MsoilAR4.3; (B) MsoilAR10; (C) MsoilAR15.1; (D) MsoilAR15.1; (E) MsoilAR15.3; (F) MsoilAR15.7; (G) MsoilAR16.1; (H) MsoilAR16.3; (I) MsoilAR16.7; (J) MsoilAR16.8 La línea continua indica el valor medio para todas las cepas aisladas del género <i>Metarhizium</i>	108
Figura 36: Curvas de crecimiento de las cepas de <i>Metarhizium</i> respecto a la media del género (tercera parte): (A) MsoilAR16.9; (B) MsoilAR16.10; (C) MsoilAR17.2; (D) MsoilAR17.4; (E) MsoilAR17.5; (F) MsoilAR17.7; (G) MsoilAR17.8; (H) MsoilAR18.5(2); (I) MsoilAR18.5(3). La línea continua indica el valor medio para todas las cepas aisladas del género <i>Metarhizium</i>	109
Figura 37: Ejemplo de áreas de crecimiento (cm ²) en los diferentes tratamientos para la cepa BsoilAR-4.1(2). (A) Testigo; (B) Azufre; (C) Quinoxifen; (D) Oxiclورو de Cobre; (E) Mancozeb.	113
Figura 38: Gráficos de correlación entre el efecto de inhibición (%) y el tiempo (días) para cada tratamiento: Azufre (azul), Quinoxifen (gris), Oxiclورو de cobre (naranja), Mancozeb (amarillo). (A) ACA; (B) BinsAR2; (C) CCH y (D) BsoilAR4.1(2). Los valores de %I representan los valores estimados mediante el MLM ejecutado, valores negativos indican posibles efectos sinérgicos.	113
Figura 39: Gráficos de correlación entre el efecto de inhibición (%) y el tiempo (días) para cada tratamiento: Azufre (azul), Quinoxifen (gris), Oxiclورو de cobre (naranja), Mancozeb (amarillo). (A) PsoilAR2.3(4); (B) PsoilAR4.1(2) y (C) PsoilAR24.3. Los valores de %I representan los valores estimados mediante el MLM ejecutado, valores negativos indican posibles efectos sinérgicos.....	114
Figura 40: Ejemplo de áreas de crecimiento (cm ²) en los diferentes tratamientos para la cepa MsoilAR-4.3. (A) Testigo; (B) Azufre; (C) Quinoxifen; (D) Oxiclورو de Cobre; (E) Mancozeb.	117
Figura 41: Gráficos de correlación entre el efecto de inhibición (%) y el tiempo (días) para cada tratamiento: Azufre (celeste), Quinoxifen (azúl), Oxiclورو de cobre (verde), Mancozeb (marrón). (A) MsoilAR2.3(1), (B) MsoilAR2.3(2), (C) MsoilAR2.3(4), (D) MsoilAR2.5(2), (E) MsoilAR4.3, (F) MsoilAR10, (G) MsoilAR14.3, (H) MsoilAR15.1, (I) MsoilAR15.7 y (J) MsoilAR16.1. Los valores de %I representan los valores estimados mediante el MLM ejecutado, valores negativos indican posibles efectos sinérgicos.....	118
Figura 42: Gráficos de correlación entre el efecto de inhibición (%) y el tiempo (días) para cada tratamiento: Azufre (celeste), Quinoxifen (azúl), Oxiclورو de cobre (verde), Mancozeb (marrón). (A) MsoilAR16.3, (B) MsoilAR16.7, (C) MsoilAR16.8, (D) MsoilAR16.9, (E) MsoilAR16.10, (F) MsoilAR17.2, (G) MsoilAR17.4, (H) MsoilAR17.5, (I) MsoilAR17.7 y (J) MsoilAR17.9. Los valores de %I representan los valores estimados mediante el MLM ejecutado, valores negativos indican posibles efectos sinérgicos.	119
Figura 43: Gráficos de correlación entre el efecto de inhibición (%) y el tiempo (días) para cada tratamiento: Azufre (celeste), Quinoxifen (azúl), Oxiclورو de cobre (verde), Mancozeb (marrón). (A) MsoilAR18.5(2), (B) MsoilAR18.5(3). Los valores de %I representan los valores estimados mediante el MLM ejecutado, valores negativos indican posibles efectos sinérgicos.	120
Figura 44: Dendograma de los efectos de CEPA y TRATAMIENTO mediante el MLM y el Test DGC ($\alpha=0,05$). Ramificaciones superiores a la línea transversal indican diferencias significativas entre los clusters.	121
Figura 45: Dendograma de los efectos de GENERO mediante el MLM y el Test DGC ($\alpha=0,05$). Ramificaciones superiores a la línea transversal indican diferencias significativas entre los géneros evaluados.	122
Figura 46: Dendograma de los efectos de TRATAMIENTO mediante el MLM y el Test DGC ($\alpha=0,05$). La ausencia de una línea transversal indica la presencia de diferencia significativa entre e intra cluster.	123

Figura 47: ejemplos de larvas de <i>L. botrana</i> infectadas con cepas de <i>Beauveria</i> (A) ACA, (B) BsoilAR4.1(2).....	139
Figura 48: ejemplos de individuos adultos de <i>N. xanthographus</i> infectados con cepas de <i>Metarhizium robertsii</i> . (A) MsoilAR-10; (B) MsoilAR-15.3.....	141
Figura 49: ejemplos de individuos adultos de <i>N. xanthographus</i> infectados con cepas de <i>Paecilomyces lilacinus</i> . (A) PsoilAR-4.1(2); (B) PsoilAR-24.3.	141
Figura 50: Representación de los diferentes métodos de infección de adultos de <i>V. velutina</i> donde: 1. Infección por aspersión directa; 2. Infección por contacto; 3. Infección por ingesta y 4. Infección por transferencia (F) alimento; (W) agua. Fuente: Poidatz et al. (2018).	153
Figura 51: ejemplo de la evolución post mortem de la afección del hongo <i>M. robertsii</i> cepa MsoilAR-2.5(2) sobre un individuo adulto de <i>A. mellifera</i> . (A) 72 h, (B) 120 h, y (C) 168 h.	157
Figura 52: ejemplo de adultos de <i>A. mellifera</i> infectados por el hongo <i>Paecilomyces lilacinus</i> (A) cepa PsoilAR-24.3 (B) cepa PsoilAR-4.1(2).	157

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Datos y coordenadas de las zonas de muestro relevadas	50
Tabla 2: Relevamiento de las principales características agronómicas de las zonas muestreadas	51
Tabla 3: Condiciones de termociclado para la amplificación de la región ADN ribosomal	56
Tabla 4: Condiciones de termociclado para la amplificación de la región intergénica Bloc	57
Tabla 5: Condiciones de termociclado para la amplificación de la región RPB1b con Touchdown	58
Tabla 6: Condiciones de termociclado para la amplificación de la región RPB2a con Touchdown	59
Tabla 7: Condiciones de termociclado para la amplificación de la región (EF-1 α) con Touchdown	60
Tabla 8: Lista de especies del género <i>Beauveria</i> utilizadas para el estudio filogenético de las cepas aisladas.	62
Tabla 9: Lista de especies del género <i>Metarhizium</i> utilizadas para el estudio filogenético de las cepas aisladas.	63
Tabla 10: Lista de especies utilizadas para el estudio filogenético de las cepas aisladas del género <i>Paecilomyces</i>	64
Tabla 11: Resultados de aislamientos de cepas a partir de muestras de suelos vitícolas.....	66
Tabla 12: Resultados de aislamientos de cepas a partir de artrópodos	67
Tabla 13: clasificación del número de cepas aisladas de muestras de suelos vitícolas en función a los grupos morfológicos identificados.....	70
Tabla 14: Clasificación de la acción de los fungicidas según el %I obtenido a los 10 días de incubación	102
Tabla 15: Valores de media de crecimiento (cm ²) en el décimo día de incubación y resultados Test LSD Fisher ($\alpha = 0,05$) para cada una de las cepas evaluadas del género <i>Beauveria</i>	103
Tabla 16: Valores de media de crecimiento (cm ²) en el décimo día de incubación y resultados Test LSD Fisher ($\alpha = 0,05$) para cada una de las cepas evaluadas del género <i>Paecilomyces</i>	105
Tabla 17: Valores de media de crecimiento (cm ²) en el décimo día de incubación y resultados Test LSD Fisher ($\alpha = 0,05$) para cada una de las cepas evaluadas del género <i>Metarhizium</i> . Primera parte	106
Tabla 18: Valores de media de crecimiento (cm ²) en el décimo día de incubación y resultados Test LSD Fisher ($\alpha = 0,05$) para cada una de las cepas evaluadas del género <i>Metarhizium</i> . Segunda parte	106
Tabla 19: Valores de media de crecimiento (cm ²) en el décimo día de incubación y resultados Test LSD Fisher ($\alpha = 0,05$) para cada una de las cepas evaluadas del género <i>Metarhizium</i> . Tercera parte.	107
Tabla 20: Resultados obtenidos del Test LSD Fisher ($\alpha=0,05$) para los distintos Tratamientos ($p < 0,0001$) para el género <i>Beauveria</i> en función a la media del tamaño de la colonia (cm ²).....	110
Tabla 21: Resultados obtenidos del Test LSD Fisher ($\alpha=0,05$) para los distintos Tratamientos ($p <0,0001$) para el género <i>Paecilomyces</i> en función a la media del tamaño de la colonia (cm ²).....	110
Tabla 22: Resultados obtenidos del Test LSD Fisher ($\alpha=0,05$) para los distintos Tratamientos ($p <0,0001$) para el género <i>Metarhizium</i> en función a la media del tamaño de la colonia (cm ²).....	110

Tabla 23: Resultados obtenidos del Test LSD Fisher ($\alpha=0,05$) para el Tratamiento a 4°C ($p < 0,0268$) para para todos los géneros en función a la media del tamaño de la colonia (cm ²)	111
Tabla 24: Resultados obtenidos del Test LSD Fisher ($\alpha=0,05$) para el Tratamiento a 17°C ($p < 0,0001$) para para todos los géneros en función a la media del tamaño de la colonia (cm ²)	111
Tabla 25: Resultados obtenidos del Test LSD Fisher ($\alpha=0,05$) para el Tratamiento a 21°C ($p < 0,0001$) para para todos los géneros en función a la media del tamaño de la colonia (cm ²)	111
Tabla 26: Resultados obtenidos del Test LSD Fisher ($\alpha=0,05$) para el Tratamiento a 24°C ($p < 0,0001$) para para todos los géneros en función a la media del tamaño de la colonia (cm ²)	111
Tabla 27: Resultados obtenidos del Test LSD Fisher ($\alpha=0,05$) para el Tratamiento a 35°C ($p < 0,0001$) para para todos los géneros en función a la media del tamaño de la colonia (cm ²)	111
Tabla 28: Valores de media de porcentaje de inhibición (%I) a los 10 días de incubación y resultados Test DGC ($\alpha = 0,05$) para cada una de las cepas evaluadas del género <i>Beauveria</i>	112
Tabla 29: Clasificación de la acción de los fungicidas según el %I obtenido a los 10 días de incubación para cada una de las cepas evaluadas del género <i>Beauveria</i>	112
Tabla 30: Valores de media de porcentaje de inhibición (%I) a los 10 días de incubación y resultados Test DGC ($\alpha = 0,05$) para cada una de las cepas evaluadas del género <i>Paecilomyces</i>	114
Tabla 31: Clasificación de la acción de los fungicidas según el %I obtenido a los 10 días de incubación para cada una de las cepas evaluadas del género <i>Paecilomyces</i>	114
Tabla 32: Valores de media de porcentaje de inhibición (%I) a los 10 días de incubación y resultados Test DGC ($\alpha = 0,05$) para cada una de las cepas evaluadas del género <i>Metarhizium</i> . Primera parte.....	115
Tabla 33: Clasificación de la acción de los fungicidas según el %I obtenido a los 10 días de incubación para cada una de las cepas evaluadas del género <i>Metarhizium</i> . Primera parte	115
Tabla 34: Valores de media de porcentaje de inhibición (%I) a los 10 días de incubación y resultados Test DGC ($\alpha = 0,05$) para cada una de las cepas evaluadas del género <i>Metarhizium</i> . Segunda parte.....	116
Tabla 35: Clasificación de la acción de los fungicidas según el %I obtenido a los 10 días de incubación para cada una de las cepas evaluadas del género <i>Metarhizium</i> . Segunda parte.....	116
Tabla 36: Valores de media de porcentaje de inhibición (%I) a los 10 días de incubación y resultados Test DGC ($\alpha = 0,05$) para cada una de las cepas evaluadas del género <i>Metarhizium</i> . Tercera parte.....	117
Tabla 37: Clasificación de la acción de los fungicidas según el %I obtenido a los 10 días de incubación para cada una de las cepas evaluadas del género <i>Metarhizium</i> . Tercera parte.....	117
Tabla 38: Listado de cepas nativas utilizadas en el estudio de patogenicidad sobre individuos juveniles de <i>L. botrana</i>	134
Tabla 39: Listado de cepas nativas utilizadas en el estudio de patogenicidad sobre adultos de <i>N. xanthographus</i>	135
Tabla 40: Listado de cepas nativas utilizadas en el estudio de patogenicidad sobre adultos de <i>Brevipalpus</i> spp.	137
Tabla 41: Valores de media de IM sobre <i>L. botrana</i> clasificados por cepa.....	138
Tabla 42: Valores de media de IM por aspersion sobre <i>N. xanthographus</i> clasificados por cepa.....	139
Tabla 43: Valores de media de IM por contacto sobre <i>N. xanthographus</i> clasificados por cepa ($p = 0,0311$).....	140

Tabla 44 : Análisis ANOVA con Test de Fisher ($\alpha=0,05$) para los tratamientos “Aspersión” y “Contacto” ($p=0,0409$) sobre <i>N. xanthographus</i>	140
Tabla 45 : Valores de media de IM sobre <i>Brevipalpus</i> spp. clasificados por cepa .	142
Tabla 46 : Listado y nomenclatura de cepas de hongos entomopatógenos nativos evaluados sobre adultos de <i>A. mellifera</i>	151
Tabla 47 : Listado y nomenclatura de cepas de hongos entomopatógenos nativos evaluados sobre adultos de <i>H. axydiris</i>	154
Tabla 48 : Valores de media de IM sobre <i>A. mellifera</i> clasificados por cepa y tratamiento.....	156
Tabla 49 : Análisis ANOVA de las cepas para el tratamiento “Aspersión” ($p = 0,0004$) sobre <i>A. mellifera</i>	158
Tabla 50 : Análisis ANOVA de las cepas para el tratamiento “Contacto” ($p = 0,0026$) sobre <i>A. mellifera</i>	158
Tabla 51 : Valores de media de IM sobre <i>H. axydiris</i> clasificados por cepa	159

Posicionamiento Epistemológico

A partir de la detección en 2010 de la plaga cuarentenaria *Lobesia botrana* (Denis & Schiff.) (Lepidoptera: Tortricidae), en viñedos del departamento de Maipú (Mendoza, Argentina), se crea el Programa Nacional de Prevención y Erradicación de "*Lobesia botrana*", estableciéndose la necesidad de recurrir a tratamientos fitosanitarios no contemplados hasta el momento en el manejo cultural del viñedo argentino. La incorporación de productos de síntesis con acción insecticida presenta el inconveniente, amén del económico, de desequilibrar al agroecosistema vitícola favoreciendo la aparición de plagas inducidas y perjudicando a los enemigos naturales ya presentes. Debido a que algunos plaguicidas no son fácilmente biodegradables y tienden a persistir durante muchos años en el ambiente, como así también persisten en los racimos de uva; la tendencia actual se basa en la búsqueda de métodos alternativos para el control de plagas de incidencia económica.

La importancia de este planteo histórico es consecuente a la secuencia de hechos precisos: "introducción-detección-alarma-control", propios de un organismo hasta entonces ausente en el agroecosistema, y que fundamentan la búsqueda de acciones técnico-científicas capaces de proporcionar posibles alternativas a la resolución del o los problemas.

En este punto pareciera imposible desvincular a cada uno de los actores que comprenden el universo socio-político-económico de la viticultura argentina, pues sin ir más lejos el ingreso del insecto-plaga al país es consecuencia directa de faltas humanas en la protección de las barreras fitosanitarias nacionales, y como país federal que es la Argentina, provinciales. Esa realidad en múltiples planos compuesta por las acciones y consecuencias de cada ente partícipe, obliga de cierta manera a encarar el proyecto de tesis desde los supuestos ontológicos de la complejidad. Siendo el caso, tales son las relaciones intrínsecas entre los actores del medio vitícola, que la mayoría de las acciones técnicas que se llevan adelante son el resultado de decisiones conjuntas, aunque respondiendo siempre a una estratificación jerárquica entre los organismos nacionales como el SENASA y el INTA, entes provinciales (ISCAMEN, FUNBAPA, entre otros), universidades nacionales y los productores de uva de vinificar y de mesa como intérpretes primarios de la cadena productiva. Aquí, la posición tomada en la ejecución del

proyecto de tesis impone la necesidad de transparencia en los métodos elegidos y las conclusiones a realizar con el solo fin de garantizar la objetividad, al ser uno mismo un sujeto inmerso en la realidad planteada.

Asimismo, y en todo momento, nos encontramos dentro de un estudio que comprende una ciencia fáctica, desde donde se pretende objetivar la “relación entomopatógeno-plaga” a partir de experiencias empíricas y argumentos que permitan contrastar de cierto modo los resultados parciales con la intención de falsear la hipótesis planteada.

Pareciera contradictorio posicionarse desde una dimensión epistemológica crítica cuando se habla de falsación de la hipótesis propia de una epistemología neopositivista más precisamente dentro del racionalismo crítico de Karl Popper. Pero es substancial entender que la importancia del porqué de la temática en estudio radica en un caso fortuito como es la aparición de una plaga cuarentenaria, consecuencia directa de acciones o de las no acciones antropológicas, pero siempre sabiendo que su existencia no es previsible en una estructura temporal si se mantiene una diligencia normal, en otros términos una contingencia aguda (Bugallo 2011). Queda claro entonces, la imposibilidad de establecer la ahistoricidad de la investigación, cuando ésta es el resultado de una realidad nunca tan actual como lo es hoy en día. Simplísimamente, sin la plaga no habría estudio.

Al mismo tiempo y como se estableció antes, nos encontramos frente a una problemática que si bien es nueva en el plano en estudio, la Argentina, ya está presente desde hace años en otros lugares, a citar a modo de ejemplo Austria donde fue descrita como plaga en el año 1800. Esto permite poder construir hipótesis a partir de experiencias ya adquiridas en otros lares y porque no de alternativas propias de los viñedos argentinos, pero con base en resultados externos.

Plantear al método hipotético-deductivo pareciera ser el mejor camino a tomar, pero no hay que olvidar la amplitud que poseen por esencia propia las ciencias biológicas. Ese panorama muestra que existen tantos métodos posibles como problemas hay por resolver, es decir, una concepción desde el pluralismo metodológico donde la hipótesis planteada será aceptada como posible siempre y cuando esta sea capaz de falsearse; dicho de otra manera, la alternativa planteada será la adecuada hasta que estudios posteriores demuestren lo contrario. Esta corrección del método de Klimovsky por aquel del racionalismo crítico de Popper conlleva a que la presente Tesis se postre al falsacionismo.

La viticultura argentina

Desde la introducción de la vid a mediados del siglo XVI (Revista de Enología, 2018) al territorio argentino, su cultivo ha ido cobrando importancia debido al auge de la cultura del vino, hasta ser hoy en día uno de los 10 principales países productores de vid (OIV, 2017). Ejemplo preciso de esta absorción cultural, por parte de los argentinos, es la Ley 26.870 del año 2014 que declara al vino como bebida nacional.

El modelo vitivinícola argentino empleado, responde a una adaptación de las diferentes culturas presentes en el territorio, donde las grandes migraciones europeas de principios y mediados del siglo XX tuvieron una gran influencia. Cada región vitícola del país posee particularidades típicas, con mejoras en los sistemas de conducción en función a las características climáticas e histórico-culturales. Sin embargo, en la década de los noventa, las mejoras tecnológicas que se incorporaron a lo largo del territorio fueron mayormente propias de la cultura productiva de la región de Burdeos (Francia) y los avances técnicos fueron fundamentalmente australianos y norteamericanos. El cambio en el sistema de riego parcelario es un ejemplo claro de esta readaptación productiva, donde se dejó atrás la práctica de irrigación gravitacional por inundación, para dar lugar al riego presurizado conocido como “gota a gota” o “por goteo”. En muchos de los casos, las nuevas tecnologías importadas respondieron más a una demanda de mercado que a una necesidad puntual por parte de la filial productiva. Asimismo, la apertura del mercado nacional a la exportación reestructuró al pensar productivo a fin de satisfacer nuevos consumidores diferentes al “paladar” nacional que hasta fines de la década de los 70 era el reinante, mejorando la calidad en pro de los rendimientos.

Muchas de las nuevas técnicas empleadas, tuvieron un impacto directo tanto sobre las plantas de vid como en los artrópodos plagas.

A las modificaciones que se realizaron en la manera de producir vid y vino, se suma el cambio climático global que está teniendo un impacto directo en los viñedos argentinos (Aruani, 2011; Deis *et al.*, 2015), ubicados principalmente en el oeste argentino (Figura 1). Las mayores temperaturas nocturnas, desfasaje fenológico con precocidad en brotación, entre otras, son efectos que actualmente se están observando (Deis *et al.*, 2015). En este contexto de alteraciones fisiológicas,

no se puede dejar de mencionar que el cambio climático no solo posee un impacto directo e indirecto sobre la fisiología de las plantas (Sentis, 2012), sino que también sobre los artrópodos, cual seres vivos, en que se ven influenciados. A modo de ejemplo, el aumento de la temperatura afecta directamente la velocidad de desarrollo de los artrópodos, acortando el tiempo de pasaje de un estado al otro en el ciclo de vida, aumentando el número de generaciones por ciclo reproductivo y el área de distribución poblacional (Ayres y Lombardero, 2000; Candau, 2008).



Figura 1: Mapa de distribución de las regiones vitivinícolas del Oeste argentino. Fuente: Wines of Argentina (2017).

Todo este análisis de la vitivinicultura regional replantea cual es el porvenir fitosanitario de la producción puesto que, por años, los viñedos argentinos se caracterizaron por poseer una baja presión fitosanitaria, donde las intervenciones en el calendario de tratamientos correspondían a periodos precisos con perturbaciones climáticas. Años lluviosos y húmedos, presentan problemas con enfermedades criptogámicas y años secos presencia de ácaros afectando el follaje.

Plagas presentes en la viticultura argentina

Según lo reportado por Cucchi y Becerra (2009), en los viñedos de Argentina se encuentran diferentes individuos plagas de las Clase Insecta y Arachnida, entre otros.

Dentro de los ejemplares de la Clase Arachnida, las plagas reportadas pertenecen a ácaros y eriófidos relacionados a la vid. Las especies de ácaros citadas son la “arañuela roja de la vid” *Brevipalpus obovatus* Donnadieu; la “falsa arañuela roja” *Oligonychus* spp.; respecto a los eriófidos se mencionan a la “eriosis de la vid” *Eriophyes vitis* Pgst.

En cuanto a la Clase Insecta, el número de individuos que afectan a la vid de alguna manera es mucho más diverso y rico. Varios son los Ordenes que poseen ejemplares con acción sobre las plantas de vid, citándose aquí algunos de los más conocidos:

- Coleoptera
 - o “mulita de la vid” *Naupactus xanthographus* (Germar)
 - o “taladrillo de la vid o de los sarmientos” *Micrapate bruchi* Lesne
 - o *Colaspis caligula* n.sp.
- Hymenoptera
 - o “hormiga podadora o negra común” *Acromyrmex lundii* (Guèrin)
- Lepidoptera
 - o “polilla europea de la vid” *Lobesia botrana* Schiff et Denis
 - o “bicho del cesto o canasto” *Oiketicus moyanoi* Mallea
 - o “esfíngido de la vid” *Eumorpha analis* (Rothschild et Jordan, 1903)
- Diptera
 - o “mosca del Mediterráneo o mosca de la fruta” *Ceratitis capitata* Wiedeman
 - o “mosca sudamericana de los frutos” *Anastrepha fraterculus* (Wiedeman)
- Hemiptera
 - o “chinche hedionda” *Edessa meditabunda* (F.)

- “chicharra de la vid o de los frutales” *Chonosia cinnabarina* (Berg, 1879)
- “filoxera de la vid” *Dactylosphaera vitifoliae* Shimer
- “cochinilla harinosa de la vid” *Planococcus ficus* Signoret (= *Coccus vitis*, *Pseudococcus vitis*)
- “cochinilla café de la vid” *Parthenolecanium persicae* (Fabricius, 1776), *Parthenolecanium corni* (Bouché)
- “perla de la vid” *Margarodes vitium* Giard
- “pulgón de la vid” *Aphis illinoisensis* Shimer
- Thysanoptera
 - “trips de la vid” *Drepanothrips reuteri* Uzel, 1895
 - “trips del ajo y la cebolla” *Thrips tabaco* Lind.
 - “trips occidental de las flores” *Frankliniella occidentalis* (Pergande, 1885)
 - otros “trips” *Frankliniella australis* (Morgan); *F. gemina* Bagnall y *F. schultzei* (Trybom)
- Orthoptera
 - *Scaphura elegans* (Serville, 1838)

Otras plagas citadas para la vid son los nemátodos, entre las cuales se puede encontrar para los viñedos de la Argentina: “nematodo de la vid” *Xiphinema* spp.; “nematodo de las lesiones radicales” *Pratylenchus* spp., y el “nematodo del nudo de la raíz” *Meloidogyne* spp.

Paradigma sanitario de la última década

Si se comparaba la viticultura empleada en la Argentina con aquellas realizadas en otros países, pocas eran las intervenciones necesarias para el mantenimiento sanitario. Sin embargo, en el año 2010 ocurre un quiebre en ese “equilibrio” productivo a partir de la detección de la “polilla europea de la vid”, considerada una de las plagas más importantes en la vitivinicultura mundial a partir de su adaptación a la vid en los inicios del siglo XX (Thiéry y Moreau, 2005; Gilligan *et al.*, 2011).

Esta plaga recientemente ingresada a la República Argentina fue rápidamente declarada plaga cuarentenaria por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) mediante la Resolución N°122/2010 y creado el Programa Nacional de Prevención y Erradicación de *Lobesia botrana* mediante la Resolución N°729/2010.

Casi todas las medidas profilácticas y terapéuticas que comenzaron a realizarse desde que se detectó la plaga en los viñedos de Maipú (Mendoza, Argentina), implicaron la incorporación de nuevos productos fitosanitarios que otrora no existían en el vademécum argentino. La Ley Nacional 27.227 junto con la Resolución 729/2010 del SENSA, establecen la obligatoriedad en la realización de los tratamientos fitosanitarios en aquellas zonas consideradas cuarentenarias, haciendo entrega de los fitofármacos en los casos comprendidos por las normativas.

La realización de tratamientos en un agroecosistema donde previamente no se hacían, implicó una alteración en el equilibrio ecológico. Holgado *et al.* (2014), comenzaron a identificar casos de nuevas y antiguas plagas que hasta ese tiempo no eran un problema, pero que resultaron ser un reflejo de la alteración del equilibrio establecido. La introducción de *L. botrana* a los viñedos, no sólo implicó una readaptación fitosanitaria total desde el punto de vista de las plagas, sino que debido a sus asociaciones con fitopatógenos, se comenzaron a registrar mayores casos de enfermedades.

Los productores vitivinícolas regionales debieron reestructurar sus estrategias de manejo a las leyes vigentes y plantearse *de facto* que la viticultura por ellos conocida no sería igual. El cambio climático, las nuevas prácticas culturales y la introducción e inducción de plagas en los viñedos, plantea un paradigma crucial en la continuidad productiva. Por ello, el estudio de alternativas viables y factibles resulta vital.

Lobesia botrana (Denis & Schiffermüller)

Phyllum: Arthropoda

Subphyllum: Mandibulata

Clase: Insecta

Orden: Lepidoptera

Familia: Tortricidae

La “polilla europea de la vid” es un lepidóptero generalista cuyo imago posee una envergadura alar próxima a los 12 mm. En los individuos adultos, Gilligan *et al.* (2011) describen al patrón de coloración alar como: alas de color ocre terroso, interfascia color gris plomo; pliegue costal crema bien definido; fascia marrón a marrón oscuro; fascia sub-basal bien definida con escamas negras; fascia media bien definida con una mancha triangular de escamas negras; mancha subterminal color marrón, fascia apical con mancha puntiforme color negra y bordes cremas. Si bien esta especie no presenta dimorfismo sexual, los mismos autores citan que las alas de los machos poseen una línea periférica color marrón blancuzca.

Lobesia botrana es una especie holometábola con reproducción sexual y multiplicación ovípara. Los huevos son lenticulares de aproximadamente 0,65-0,90 mm de largo y 0,45-0,75 mm de ancho (Figura 2). Los mismos son colocados individualmente o en grupos de a dos en forma aislada sobre los distintos órganos aéreos de la planta de vid. Recién ovipuestos, su coloración es de un amarillo pálido translúcido que con el tiempo y contacto con el ambiente se vuelven grisáceos.



Figura 2: Huevos de *L. botrana* recién ovipuestos.

La eclosión de las larvas es termodependiente, teniendo como mínimo biológico los 10°C (Gilligan *et al.*, 2011; Dagatti y Becerra, 2015). Si las condiciones son propicias, a los 5-10 días de ovipuestos, eclosionan larvas neonatas tipo polípodas subtipo eruciformes de color amarillento, de 1 mm de largo y un tagma cefálico bien distintivo color marrón oscuro. La “polilla europea de la vid” posee cinco estadios larvales (denominados L1, L2, L3, L4 y L5), donde el último estadio posee un tamaño de 10 a 15 mm de largo. La coloración de las larvas va del verde amarillento en los primeros tiempos hasta el marrón pálido para las larvas más maduras (Figura 3).



Figura 3: Larva L3 de *L. botrana* sobre una inflorescencia de *V. vinífera* cultivar Malbec, Mendoza, Argentina.

La pupa es de tipo obtecta o crisálida (Figura 4). Los machos poseen un tamaño de pupa inferior al de las hembras, el cual ronda los 7 mm de largo. En un principio las pupas son de coloración marrón verdosa que con el transcurso del tiempo se torna marrón castaño oscuro (Gilligan *et al.*, 2011).



Figura 4: Puparios de *L. botrana* en racimos de uva cultivar Malbec, Mendoza, Argentina.

El ciclo de vida de *L. botrana* comprende 4 generaciones anuales, donde las dos últimas se encuentran solapadas. Esta especie posee un pasaje invernal como pupa dentro de un capullo de seda que el último estadio larval construye (Gilligan *et al.*, 2011). El estudio realizado por Dagatti y Becerra (2015) permite comprender el desarrollo de las generaciones de la polilla de la vid en Mendoza. Las autoras establecen que el primer vuelo ocurre cuando se cumplen 204 ± 11 grados días (GD), la segunda generación se presenta a los 728 ± 41 GD y la tercer-cuarta generación a los 1329 ± 151 GD.

Si bien en un principio, los técnicos mencionaban que *L. botrana* se comportaba como una especie monófaga en la región, hoy se sabe que esta especie posee un comportamiento generalista teniendo varios hospederos alternativos (Stavridis y Savopoulou-Soultani, 1998; Thiéry y Moreau, 2005; Moreau *et al.*, 2007; Gilligan *et al.*, 2011) como el arándano (*Vaccinium corymbosum* L.), el olivo (*Olea europea* L.), el ciruelo (*Prunus* sp.), entre otros.

Los daños ocasionados por esta especie pueden ser directos e indirectos. Dentro de los daños directos, la primera generación se alimenta de botones florales disminuyendo relativamente el potencial de rendimiento en kilos. Las generaciones siguientes afectan directamente a los frutos al perforar las bayas. Sin embargo, el mayor daño económico es de carácter indirecto por la acción de hongos saprófitos y fitopatógenos como *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Botrytis cinerea* (de Bary) Whetzel 1945, entre otros (Mondy *et al.*, 1998, 2000; Cozzi *et al.* 2006, 2013). Tassin

et al. (2012) observaron como las hembras de *L. botrana* se veían atraídas por plantas afectadas por *B. cinerea* a partir de señales químicas volátiles. Asimismo, Mondy *et al.* (1998); Mondy y Corio-Costet (2000, 2004) plantearon la existencia de un mutualismo entre el hongo y el lepidóptero, quien al alimentarse de bayas infectadas veía incrementada su fecundidad junto con una reducción del tiempo de diapausa de 4-6 días y una disminución de la tasa de mortalidad de las larvas en un 20-67%. El grado de relación entre el insecto y el hongo es tal, que la misma larva lleva consigo conidios de *B. cinerea* adheridos a sus cetos, lo cual incrementa la incidencia de la “podredumbre gris” en los viñedos con pérdidas que pueden rondar el 70%.

Cozzi *et al.* (2006, 2013) hacen una estricta relación entre la presencia de *L. botrana* y la presencia de la micotoxina Ocratoxina A, producida por los hongos *Penicillium verrucosum* Dierckx 1901 y *Aspergillus* sección *Nigri*. Esta micotoxina es considerada como carcinógena, nefrotóxica, teratógena, inmunotóxica y algunas veces neurotóxica. Las heridas ocasionadas por la “polilla europea de la vid” son puerta de entrada para estos patógenos en las bayas donde producen la micotoxina y luego los vinos elaborados con estas uvas presentan estas toxinas, cuya presencia es indeseada y genera descartes de partidas de exportación.

Para el manejo de esta especie, es esencial el monitoreo. Durante el periodo invernal, es posible realizar observaciones directas sobre la ritidomía en búsqueda de pupas diapausantes. Durante el periodo vegetativo, la presencia de *L. botrana* se puede realizar mediante observación directa de larvas en inflorescencias o racimos. Las acumulaciones de flores necrosadas entretejidas con hilos de seda (glomérulos) es una manera sencilla y efectiva de estimar la incidencia de la plaga en los viñedos.

Otra de las técnicas es mediante el monitoreo con trampas Delta de piso engomado y feromonas (Figura 5). Al ser una especie que presenta protandria, permite poder realizar curvas de vuelo mediante la captura de machos adultos. Estas curvas son una herramienta de gran interés para el manejo de la plaga mediante la determinación de los momentos oportunos de control (MOC).



Figura 5: Trampa tipo Delta para la captura de machos adultos de *L. botrana*. Fuente: ServoVendi (2018)

Naupactus xanthographus (Germar)

Phyllum: Arthropoda

Subphyllum: Mandibulata

Clase: Insecta

Orden: Coleoptera

Familia: Curculionidae

El “burrito de la vid y los frutales” es un coleóptero autóctono de Sudamérica que se encuentra presente tanto en Argentina como en países limítrofes. Los adultos de esta especie pueden alcanzar los 12 a 18 mm de largo (Figura 6), de coloración grisácea con dos bandas verde-amarillentas laterales sobre el pronoto y los élitros fusionados, de ahí deriva el termino latino *xanthographus*. Ripa (2008) describe a su vez a los adultos recién emergidos, como individuos de coloración rojiza con la presencia de ganchos mandibulares (Figura 7), los cuales se pierden a los 2 a 3 días de estar en contacto con la superficie (Cucchi y Becerra, 2009).

Los élitros fusionados recubren la totalidad del abdomen, siendo más ancho en el caso de las hembras. Asimismo, los élitros presentan la particularidad de poseer “hombros realzados” (Ripa, 2008) y no ser funcionales, por lo que el mecanismo de dispersión de esta especie es solamente ambulatorio.

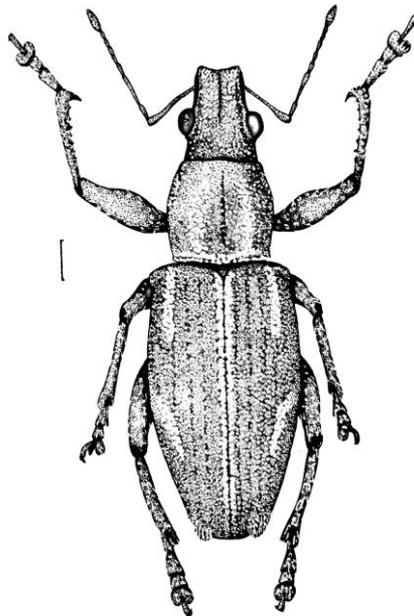


Figura 6: Ejemplar adulto de *N. xanthographus*. Escala: 1 mm. Ilustración: Roig, S. (Aragón *et al.*, 1994).



Figura 7: Adulto de *N. xanthographus* recién emergido, la flecha amarilla indica la presencia de ganchos mandibulares. Mendoza, Argentina.

Al ser individuos holometábolos (Figura 8), poseen todos los estados: huevo, larva, pupa y adulto. Los huevos son ovales, de coloración amarillo intenso, de 1 mm de largo y son colocados de forma agregada en la parte aérea de la planta, cementados por una especie de gelatina que endurece y actúa como capa protectora de los mismos.

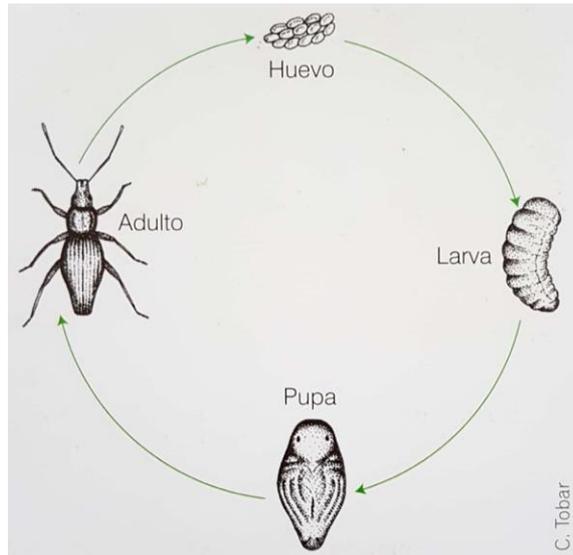


Figura 8: Esquema del ciclo de vida de *N. xanthographus*. Ilustración: C. Tobar (Ripa y Luppichini, 2010)

Las larvas son de tipo ápodas, subtipo curculioniforme (Figura 9), de coloración blanca a levemente amarillenta a excepción del tagma cefálico, el cual es de coloración castaño oscuro. El desarrollo de las larvas es subterráneo y consta de seis estadios larvales, donde el último puede alcanzar los 15 mm de longitud (Cucchi y Becerra, 2009).



Figura 9: Larvas *N. xanthographus* en distintos estadios. Fuente: Ripa y Luppichini (2010)

La pupa es de tipo exarada o libre, donde los apéndices no se encuentran fusionados al cuerpo. Esta pupa se encuentra en el suelo, dentro de una cámara pupal construida por la misma larva.

La biología de esta especie consta de dos etapas que se pueden correlacionar con la fenología de la vid (Figura 10). Una primera etapa aérea, donde los adultos se alimentan del follaje realizando comeduras irregulares del limbo. Los daños causados a nivel de follaje, salvo infestaciones considerables, no son de importancia económica para la viticultura destinada a la vinificación. Por el contrario, en el caso de uva de mesa, esta plaga es considerada cuarentenaria para la mayoría de los países importadores, por lo cual la sola presencia de excrementos es no deseada. Si bien la bibliografía menciona la presencia de daños ocasionados por los adultos sobre los brotes tiernos (Ripa, 2008), estos son considerados de poca importancia para las regiones vitícolas argentinas.

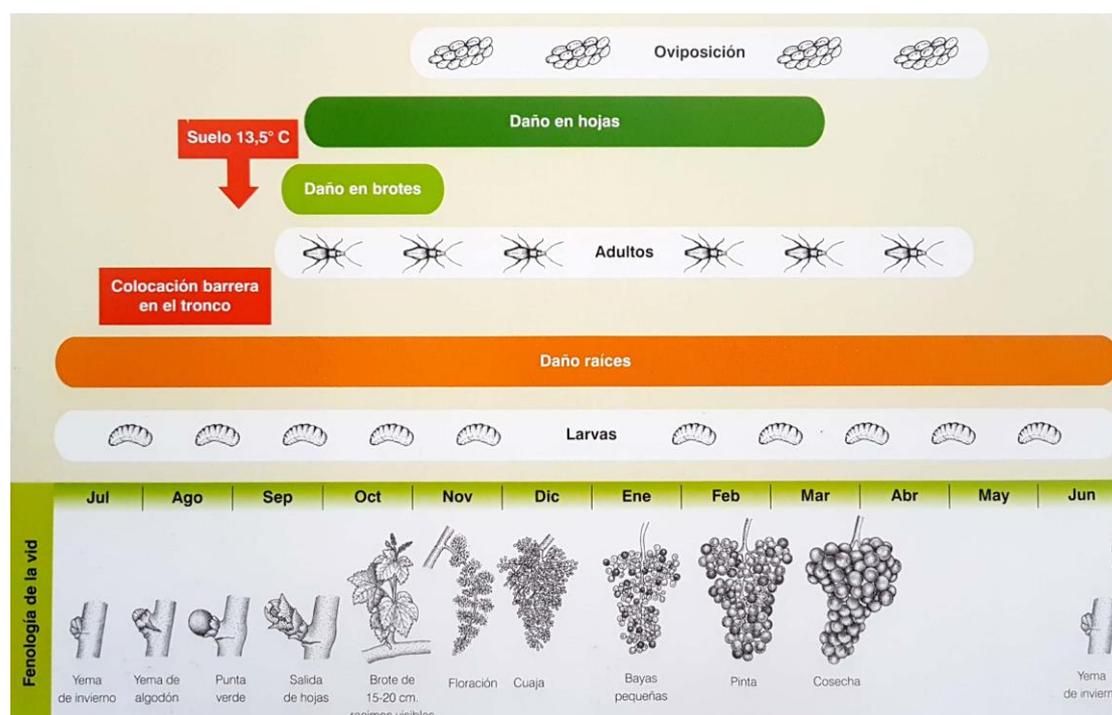


Figura 10: Esquema de la presencia de los distintos estados de *N. xanthographus* en función de la fenología de la vid. Fuente: C. Tobar (Ripa y Luppichini, 2010)

Una vez que los adultos copulan, colocan los huevos (hasta un número de 100 huevos por postura) en la parte aérea de la planta, pudiendo encontrarse protegidos por las resquebrajaduras de la corteza de la vid, o expuestos. Si las

condiciones primavera-estivales son adecuadas, las larvas eclosionan a los 35 días (Ripa, 2008), dejándose caer al suelo.

La segunda etapa, corresponde al desarrollo de la larva y de la pupa. Este período tiene lugar en el suelo a profundidades variables según el tipo de suelo y la presencia de raíces. Por ejemplo, es posible encontrar larvas a profundidades que superan el metro cuando se trata de suelos livianos y con raíces profundas.

Las larvas neonatas se alimentan de raicillas superficiales. Seguidamente, para el transcurso de los 6 estadios larvales, los individuos descienden en búsqueda de raíces medianas y gruesas. Los daños ocasionados son un inconveniente importante, sobre todo en plantaciones jóvenes. Las comeduras realizadas a nivel radicular no sólo disminuyen la superficie de absorción real y eficaz, sino que actúan como puerta de ingreso para un gran número de microorganismos fitopatógenos y saprófitos. El estado larval no sólo es considerado como el pasaje invernal de la plaga, sino que es posible encontrar larvas a lo largo de todo el año.

En el sexto estadio de larva, el individuo realiza una cámara pupal en donde poder desarrollar el pasaje de estado. Ripa (2008) establece una estrecha relación entre la emergencia de adultos y las temperaturas del suelo, comenzando cuando esta alcanza los 13,5°C.

Para el monitoreo de esta especie, es necesario considerar la ubicación de los diferentes estados metafórficos (Figura 11). Los monitoreos son por observación directa. Respecto a los niveles de daño económico, la Cátedra de Zoología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNCuyo) establece como nivel de tolerancia para el caso de ejemplares adultos: la observación de 2 o más individuos en plantaciones jóvenes, y en el caso de plantaciones con vides desarrolladas la presencia de 12 adultos.

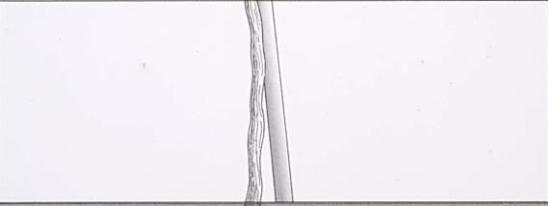
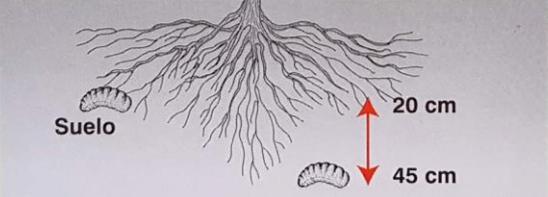
Estructura	Planta de Vid	Estado	Monitoreo
Follaje		Adultos	Mazo y lámina
Ritidimo Brazos y tronco		Huevos	Visual
Raíces		Larvas	Hoyos en suelo (calicatas)

Figura 11: Esquema de zonas de monitoreo en función del estado metafórico de *N. xanthographus*.
Fuente: Ripa y Luppichini (2010)

Brevipalpus spp.

Phyllum: Arthropoda

Subphyllum: Chelicerata

Clase: Arachnida

Subclase: Acari

Familia: Tenuipalpidae

La “falsa arañuela roja” es poco conocida para la región vitícola argentina, citándose como especies presentes a *Brevipalpus obovatus* y en algunos casos a *Brevipalpus chilensis*, siendo esta última cuarentenaria para el país. Sin embargo, el género *Brevipalpus* es reconocido por incluir las arañuelas más perjudiciales de la agricultura (Childers *et al.* 2003).

Los individuos adultos de este género se caracterizan por presentar un ligero dimorfismo sexual. Las hembras adultas pueden tener un tamaño entre 0,3 a 0,6 mm, cuerpo ovoidal (Figura 12), aplanado dorsoventralmente y en el caso de *B. obovatus* carecer en el propodosoma de retículos en la región media (Cucchi y Bercerra, 2009; Ripa y Luppichini, 2010). En el caso de los adultos machos, los individuos son de menor tamaño que las hembras, con cuerpos menos ovalados, tendiendo a triangulares al tener el abdomen más aguzado (Cucchi y Bercerra, 2009; Ripa y Luppichini, 2010).



Figura 12: Adulto hembra de *Brevipalpus* sp. oviponiendo en hojas de vid cultivar Malbec, Mendoza, Argentina.

El ciclo de vida está caracterizado por tener diferentes estados metamórficos (Figura 13). Si bien dentro del género *Brevipalpus* existen especies que presentan partenogénesis tipo telitoquia (Childers *et al.* 2003), en el caso de las especies citadas para la viticultura argentina existe también la reproducción sexual.

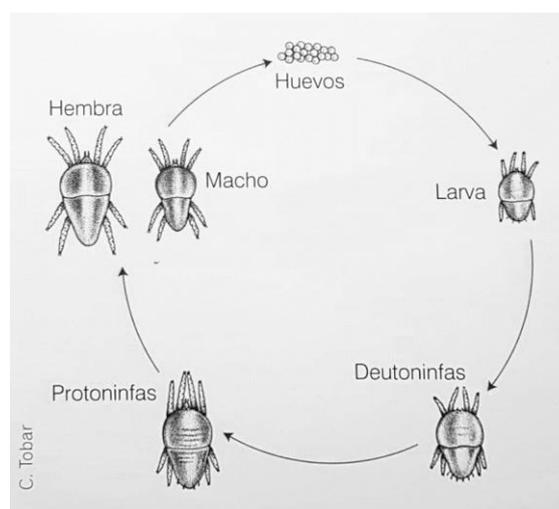


Figura 13: Ciclo de vida de *Brevipalpus* spp.
Ilustración: C. Tobar (Ripa y Luppichini, 2010)

Los huevos son ovalados de coloración roja intensa. La larva o ninfa neonata presenta la particularidad de poseer tres pares de patas lo que puede prestar a confusión a campo con los artrópodos hexápodos. Las ninfas en el caso de la familia Tenuipalpidae presentan solamente dos estadios: Deutoninfas y Protoninfas, ambas ya poseen cuatro pares de patas y varían básicamente en tamaño y coloración.

En la biología que cita este género, se menciona como pasaje invernal a las hembras adultas fecundadas, las cuales se refugian en la ritidomis y brácteas de las yemas formando colonias de varios individuos. Cuando las temperaturas comienzan a ser propicias y la vid posee el estado fenológico de yema hinchada, las hembras ovipositan hasta 20 huevos cada una. Asimismo, las posturas pueden tener lugar en brotes tiernos y en el envez de las hojas recién formadas. Presentan 5 a 6 generaciones en el año, siendo las primaverales de origen partenogenético y las otras sexuales. La Figura 14 esquematiza el desarrollo del ciclo en conjunto con la fenología de la vid.

Los daños producidos por todos los estados móviles de la arañuela se manifiestan en los órganos afectados. En hojas se observa bronceado, curvamiento de los bordes hacia abajo y, en el caso de variedades tintas, un aumento en la concentración de antocianos en pleno periodo vegetativo, dando como resultado coloraciones violáceas del limbo semejante a la coloración típica otoñal. Cuando se producen infestaciones importantes, el raquis de los racimos presentan puntuaciones necróticas y los frutos manchas amarillo-verdosas (Cucchi y Becerra, 2009).

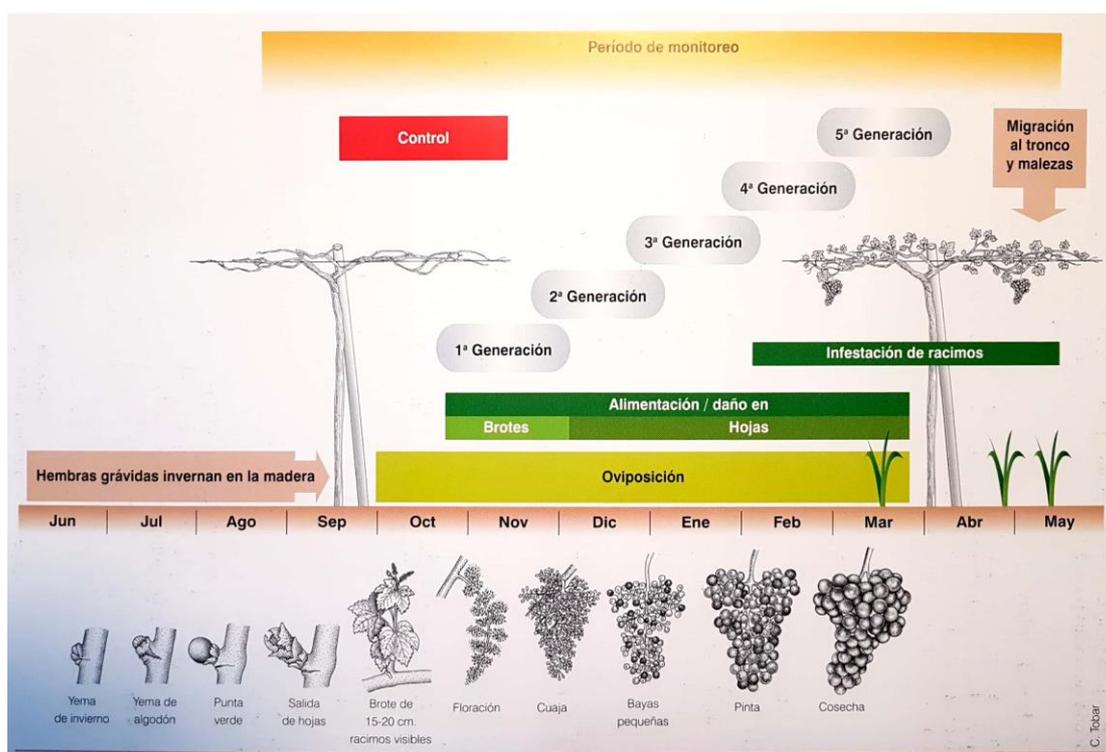


Figura 14: Esquema de la presencia de las distintas generaciones de *Brevipalpus* spp. en función de la fenología de la vid. Fuente: C. Tobar (Ripa y Luppichini, 2010)

Para el monitoreo de esta especie, es necesario considerar la ubicación de los diferentes estados del ciclo morfológico (Figura 15). Los monitoreos se realizan por observación directa. Cucchi y Becerra (2009) recomiendan en invierno muestrear sarmientos para verificar la presencia de colonias de hembras fecundadas invernantes. En primavera, los mismos autores mencionan que el muestreo cotidiano de hojas y ocasionalmente brotes es una medida profiláctica a tener en cuenta. Para nuestro país, en el caso de la vid, no se citan niveles de daño económico sino la presencia y/o ausencia de individuos.

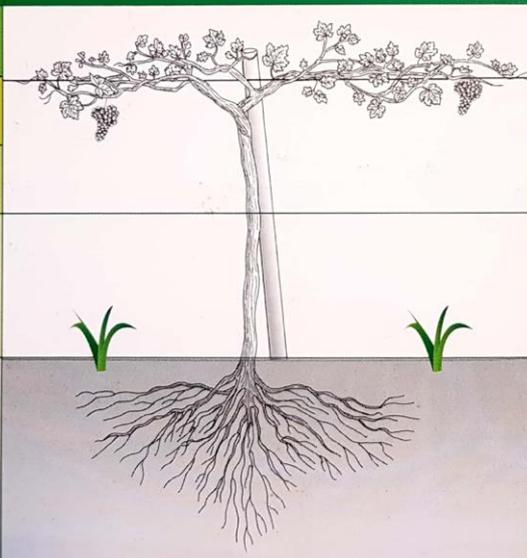
Estructura	Planta de Vid	Monitoreo	Época
Brotos		Abrir el brote	Brotación (sep-nov)
Hojas		Examinar el envés	Desde brotes (oct-abr)
Racimos		Examinar raquis y bayas	Desde cuaja a cosecha
Tronco, brazos y cargadores (madera)		Levantar ritidomo y examinar	Invierno y prebrotación
Malezas		Examinar hojas y tallos	Todo el año

Figura 15: Esquema de monitoreo de *Brevipalpus* spp. en función a los distintos periodos del ciclo vegetativo. Fuente Ripa y Luppichini (2010).

Manejo Integrado de Plagas (MIP)

El manejo de las plagas agrícolas (MIP), mal llamado control, implica la utilización de diferentes métodos que permitan mantener los niveles poblacionales por debajo de los rangos de daño económico. Desde la revolución verde en los años '50 el método elegido por excelencia ha sido el uso de productos químicos, cuyos residuos producen problemas a la salud del ser humano y perjudican al medio ambiente ya que muchos de ellos no son fácilmente biodegradables, persistiendo durante muchos años en el ambiente. Estos motivos hacen discutible la sostenibilidad del método químico (Elmer y Michailides, 2007). Por ello, la actual tendencia de la población mundial es exigir alimentos de calidad, en los cuales no hayan sido tratados con este tipo de productos o cuyo uso sea mínimo, situación que ha llevado a disminuir el uso de estas sustancias. Por ello, las actuales investigaciones han sido enfocadas hacia el desarrollo de métodos alternativos de control de plagas, seguros y capaces de sustituir a los insecticidas de síntesis, considerados altamente tóxicos por la Organización Mundial de la Salud.

Todos estos planteos sobre la imperiosa necesidad de producir alimentos inocuos al ser humano, compatibles con el desarrollo de una agricultura sustentable y no contaminante del medio ambiente, motiva la continua búsqueda de tácticas de manejo que cumplan con los actuales estándares de calidad.

Los productos que cumplen con estos requerimientos serían los **bioplaguicidas** y que muchos de ellos entran en el **control biológico**.

Por ello, la utilización de hongos entomopatógenos (HE) en el control biológico de plagas representa una alternativa viable (Badilla, 1990; Ferron, 1991; García García *et al.*, 2008; Rai *et al.* 2014) y en el caso del agroecosistema vitícola, podría representar una valiosa herramienta.

Uso de bioplaguicidas para el control biológico de plagas de la vid

El término “control biológico de plagas” implica el manejo de poblaciones de artrópodos perjudiciales a una producción agrícola, mediante el uso de organismos vivos (enemigos naturales, hongos, bacterias, nemátodos y virus) con el fin de mantenerlos por debajo de los niveles de daño económico (Fischbein, 2012). Cuando se hace mención del uso de “bioplaguicidas” generalmente se está haciendo referencia al uso de microorganismos patógenos para el control de las plagas.

Eilenberg *et al.* (2001) intentan poner sobre la mesa de discusión la utilización de los diferentes términos que conlleva el control biológico o biocontrol, dado la interdisciplinariedad que presentan las prácticas. Los autores plantean que los “bioplaguicidas” hacen referencia exclusivamente al uso de organismos vivos para el manejo de poblaciones (incluyen a los virus a pesar de no ser considerados seres vivos), y excluyen del término al uso de metabolitos obtenidos de insectos, patógenos vegetales, extractos vegetales o antagonistas. Estos mismos autores van más allá y proponen una subunidad dentro del control biológico denominada “control microbiológico” para hacer referencia exclusivamente al empleo de microorganismos como bioplaguicidas, entre ellos los HE.

Lacey *et al.* (2015) citan que a nivel mundial existen más de 50 productos comerciales como bioplaguicidas, donde los hongos representan alrededor del 19% de las ventas en 2010. Los mismos autores remarcan que la tendencia actual de este tipo de productos en el mercado se ha visto incrementada en los últimos años, situación contraria a lo que se observa en los productos de síntesis química, los cuales ha mermado la oferta internacional. Glare (2004) reafirma la tendencia de aumento en la oferta de bioplaguicidas a base de HE, pero remarca que, si bien el número de productos aumenta, la variabilidad de especies utilizadas no es muy grande.

En la Argentina existen bioplaguicidas registrados para su uso, sobre todo en las industrias frutihortícolas. Se han desarrollado baculovirus específicos para el

control de plagas del manzano y el peral, bacterias y nematodos para el control de lepidópteros, entre otros. En cuanto a los HE, existen varios trabajos en a la búsqueda y evaluación de cepas nativas para el control de plagas, sobre todo de la región Pampeana y el NOA (Noroeste Argentino). Sosa Gómez *et al.* (2010) observaron la presencia de HE en la Argentina y Brasil, identificando 114 especies fúngicas pertenecientes a 53 géneros. La potencialidad de los HE como agentes de control microbiano fue también evaluada por muchos trabajos, a modo de ejemplo, para el control de acrididos (Rodríguez y Lecuona, 2002; Pelizza *et al.*, 2010; Schapovaloff, 2012), plagas sinantrópicas y de importancia médica (López Lastra *et al.*, 1999; Lecuona *et al.*, 2001, 2005; Marti *et al.*, 2006; López Lastra y García, 2019), control de lepidópteros (Lecuona y Díaz, 2001; Edelman y Lecuona, 2003), control de dípteros de importancia agronómica (Porrás y Lecuona, 2008), control de hemípteros de importancia agrícola (Scorsetti *et al.*, 2006, 2007; Toledo y Manfrino, 2019), entre otros. Estos estudios permiten la existencia de un enfoque hacia la búsqueda de alternativas para el control de plagas agrícolas y sinantrópicas (Marti *et al.*, 2005; Siri *et al.*, 2005).

En el caso de los viñedos del oeste argentino, son pocos los estudios sobre los entomopatógenos para el control microbiológico debido, entre otras razones, a que hasta no hace mucho las plagas vitícolas no representaban un inconveniente. Aguilera Sammaritano *et al.* (2018) evaluaron, bajo condiciones controladas, la acción de cepas de *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin sobre larvas de *Lobesia botrana* Denis & Schiff., observando que existían cepas con acción patogénica con una mortalidad del 81 al 98% de las larvas tratadas. Asimismo, si se tiene en cuenta las condiciones edafo-climáticas de la región vitícola del oeste argentino, estas difieren considerablemente de otras regiones del país. Suelos con un importante contenido salino, irrigación como aporte a las carencias hídricas, gran amplitud térmica (día-noche), alta radiación ultravioleta, entre otros factores, condicionan la presencia, distribución y especificidad de los entomopatógenos; por cual continuar con su estudio resulta de interés.

Los hongos entomopatógenos

El reino Fungi representa el mayor grupo de microorganismos eucarióticos, con una diversidad estimada entre 1,5 a 5 millones de especies (Araújo y Hughes, 2016). Asimismo, dentro de este grupo, los HE conforman el mayor porcentaje de organismos utilizados en el control microbiológico de las plagas agrícolas (Lacey *et al.*, 2015; García-García *et al.*, 2015). Estos se encuentran clasificados principalmente en las Clases Oomycetes, Chytridiomycetes, Ascomycetes y

Zygomycetes, siendo esta última división, con el orden Entomophthorales la que más especies agrupa (Goettel *et al.*, 2010). Más inusualmente, es posible encontrar algunos hongos con acción parasítica causando infección en artrópodos, pero no necesariamente la muerte de estos. Goettel *et al.* (2010) citan como ejemplos de este último grupo a las especies parásitas obligadas pertenecientes a la división Laboulbeniomycetes (ectoparásito) y dentro de los Basidiomycota a los géneros *Septobasidium* y *Urendinella*.

García-García *et al.* (2015) citan que se conocen cerca de 100 géneros y alrededor de 700 especies de HE. Sin embargo, la actual mirada hacia los HE no se encuentra exclusivamente centrada a su rol como agentes de control microbiológico, sino también en la importancia que estos organismos tienen en otros ámbitos del ecosistema como, por ejemplo, organismos endófitos, antagonistas de enfermedades, conformadores de la rizosfera y generadores de promotores de crecimiento vegetal (Landa *et al.*, 2013; Jaber, 2015; Lacey *et al.*, 2015; Barelli *et al.*, 2016; Butt *et al.*, 2016; Jaber y Ownley, 2017; Rondot y Reineke, 2018). Junto con esta mirada holística de las funciones que estos microorganismos realizan en un ecosistema, el número de géneros y especies sigue siendo incierto. El uso de técnicas moleculares en los estudios filogenéticos ha permitido poder echar luz sobre muchos géneros a los cuales no se le conocía su forma perfecta (Humber, 2012).

En los planes de control microbiológico, prácticamente todos los órdenes de la clase Insecta son susceptibles de ser afectados (Alean, 2003; Rodríguez *et al.*, 2006), pudiendo utilizarse diferentes especies de HE, pero su uso depende del medio de donde son, de la especie blanco a controlar y del ambiente donde esta última se desarrolla. Por ejemplo, aquellos HE presentes en el medio acuático se usan en el control de larvas de mosquitos, en los agroecosistemas las especies edáficas cobran mayor importancia en el control de plagas. Así, el suelo se convierte en un reservorio vivo de especies potencialmente capaces de ser utilizadas en los planes de manejo (Klingen y Haukeland, 2006; Goettel *et al.*, 2010; Lacey *et al.*, 2015).

Al uso de HE, como la mayoría de los controladores microbiológicos se le atribuyen las siguientes ventajas: fuerte especificidad entre patógeno-hospedante (sobre todo a nivel de cepa y no de especie), casi nula presencia de residuos tóxicos, persistencia en el tiempo luego de la aplicación, bajo coste (a largo plazo) respecto a los productos de síntesis química, poca acción sobre la biodiversidad de un ecosistema, alto potencial como fuente de metabolitos para la creación de productos fitosanitarios alternativos, entre otras (Franco *et al.*, 2011)

Salvo pequeñas variantes ocasionadas por la influencia del ambiente sobre la fisiología del organismo, el mecanismo de acción de los hongos en el proceso infeccioso se podría considerar como generalizado. El ciclo de vida de estos hongos conlleva, generalmente, una fase patogénica y una fase saprofitica. Una infectiva como espora (sexual o asexual) la cual al entrar en contacto con el hospedero (bajo condiciones ambientales adecuadas) desencadenando comunicaciones químicas a partir de proteínas hidrofóbicas de la espina que actúan a nivel de la cutícula cerosa del exoesqueleto (Bidochka y Small, 2005). La espora se adhiere a la cutícula y da lugar a la formación de un tubo germinativo y un apresorio, el cual penetra mediante mecanismos físicos y químicos hasta alcanzar al hemocele. La liberación de enzimas proteasas, lipasas y quitinasas son las responsables de comenzar con la degradación de los componentes de la cutícula de los artrópodos, dando lugar a una presión ejercida por la hifa que se ve favorecida para poder penetrar entre las diferentes capas y colonizar los tejidos interiores (Goettel *et al.*, 2010; Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013; García-García *et al.*, 2015; Sosa Gómez y D'Alessandro, 2019).

Dentro del insecto, el hongo comienza a multiplicarse invadiendo los tejidos musculares, cuerpos grasos y órganos presentes. En el hemocele, como los artrópodos presentan un sistema circular abierto, la mayoría de los hongos (sobre todo los pertenecientes al orden Hypocreales) pasan a formar blastosporas unicelulares con multiplicación por gemación (Araújo y Hughes, 2016).

Si las condiciones son propicias, el hongo invade todo el interior liberando al medio (hemolinfa) toxinas que producen la muerte del individuo. Cuando ocurre el deceso del artrópodo, los hongos dejan el estado de blastospora y comienzan a conformar hifas que en sentido inverso traspasaran el exoesqueleto para tomar contacto con el exterior, a esta fase se la denomina como saprofitica (Araújo y Hughes, 2016). Una vez en el exterior, el hongo conforma las estructuras de reproducción (sexual o asexual) con la liberación de una gran cantidad de esporas (o conidios en el caso de hongos mitospóricos). Cada división posee esporas de origen sexual características, pudiéndose encontrar: oosporas, zigosporas, basidiosporas, ascosporas, entre otras.

Este mecanismo de acción, por parte de los hongos, propicia una ventaja como bioplaguicida respecto a las bacterias y virus, puesto que, a diferencia de estos últimos, los hongos son capaces de infectar al hospedero directamente, mientras que los otros agentes deben ser ingeridos (Rai *et al.*, 2014).

Orden Hypocreales

Humber (2015) plantea que los avances que se han suscitado en estos últimos años respecto a la taxonomía de los HE resultaron reveladores. Gracias a los estudios filogenéticos, Humber (2015) afirma que se han reclasificado un vasto número de especies que pertenecían a los Hyphomycetes (forma imperfecta) dentro de la división Ascomycota. Estos cambios han hecho de la clase un grupo variopinto de individuos que no se encuentran uniformemente distribuidos. La división Ascomycota es el mayor grupo dentro del reino Fungi, donde gran parte de sus integrantes son hongos filamentosos que regularmente producen hifas septadas (Araújo y Hughes, 2016). La característica principal que distingue a esta División es la de formar esporas sexuales dentro de sacos denominados ascos.

Dentro de Ascomycota, los órdenes que engloban a los agentes entomopatógenos son: Pleosporales, Myriangiales, Hypocreales y Ascophaerales. El orden Hypocreales es el que presenta la más importante diversidad fúngica entomopatógena (Chaverri, 2006, Araújo y Hughes, 2016). La mayoría de los individuos entomopatógenos se encuentran agrupados en tres familias: Clavicipitaceae, Cordycipitaceae y Ophiocordycipitaceae (esta última recientemente dividida por razones filogenéticas) (Humber 2005, 2012).

El orden Hypocreales se caracteriza por presentar cuerpos de reproducción sexual esféricos solitarios, denominados peritecios (cuerpos fructíferos que poseen forma globosa más o menos cerrada, que al llegar a la madurez presentan un orificio "ostíolo" por donde se liberan las ascosporas (Agrios, 2008). Estos ascocarpos se pueden encontrar sobre o inmersos en estromas más o menos globosos de colores brillantes, aunque ocasionalmente pueden ser de colores oscuros (Kirk *et al.* 2008; Raymundo *et al.*, 2017). Los ascos son cilíndricos de paredes delgadas, que pueden presentar en su ápice un pequeño anillo o "capuchón" apical (Kirk *et al.*, 2008). La diversidad de ascosporas es importante, pudiendo ir de ascosporas hialinas a verdes.

Beauveria

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes (Anamorfo: Hyphomycetes)

Orden: Hypocreales

Familia: Cordycipitaceae

Género: *Beauveria*

El género *Beauveria* es por demás el hongo entomopatógeno conocido por excelencia. Cosmopolita, presente en los suelos y de fácil producción, lo que lo hace hoy en día uno de los géneros más utilizados comercialmente para el control microbiológico de plagas.

Rehner (2005) menciona que fue uno de los primeros HE en ser descritos, hace ya casi 200 años. Este mismo autor cita tres características del género que lo hacen ser uno de los principales agentes de control microbiológico:

1. *Su distribución cosmopolita, fácil reconocimiento y frecuente presencia en la naturaleza.*
2. *Su gran espectro de hospederos, conociéndose más de 700 especies de insectos que puede infectar, con una amplia variación en el grado de virulencia y alta especificidad a nivel de cepa (Rai et al., 2014). Características que lo hacen uno de los géneros más versátiles como candidato para el control biológico de insectos.*
3. *Beauveria es un organismo fácilmente trazable. Sencillo de aislar de cadáveres de insectos o del suelo, usando medios simples con antibióticos.*

A modo anecdótico, el género fue descrito por primera vez por Agostino Bassi (1773-1856), quien estudiaba las enfermedades que dañaban a las larvas del gusano de seda (*Bombyx mori* [Lepidoptera: Bombycidae]) y afectaban el comercio de Francia e Italia en los siglos XVIII y XIX (Glare, 2004; Rehner, 2005; Rai et al., 2014). En un principio, Bassi describe a esta enfermedad como un musgo, “*muscardina*”, que se desarrollaba sobre las larvas de forma “espontánea”, donde luego de varios años de observaciones supone que la enfermedad de las orugas provendría de un agente exterior. Ante esta hipótesis, Bassi resuelve utilizar el “polvillo blanquecino” que se presentaba sobre las larvas afectadas y aplicarlo en larvas sanas. Para sorpresa de Bassi, las larvas inoculadas presentaban la misma sintomatología (Glare, 2004). Este descubrimiento lo lleva, a este autor, a concluir que el agente causal era un germen vivo cuya “semilla” era muy pequeña,

relacionándolo a un hongo al cual clasifica como *Botrytis paradoxa*. Todas estas observaciones, permitieron a Bassi desarrollar métodos profilácticos para evitar la presencia de la enfermedad en la industria de la seda. Tiempo después Balsamo-Crivelli (1835) retoma los estudios de Bassi y renombra al hongo como *Botrytis bassiana* en honor a los trabajos realizados por Agostino Bassi. En 1912 Vuillemin finalmente describe el género y lo renombra como *Beauveria*, que al observar solamente que se comportaba como un hongo mitospórico lo clasifica dentro de la clase Hyphomycetes división Deuteromycota.

Lejos de esos días, las técnicas moleculares han podido rearmar la filogenia del género, relacionándolo con su forma perfecta o teleoforma *Cordyceps*.

Humber (2005, 2012) caracteriza al género como un hongo que forma un moho denso y blanco sobre el exoesqueleto de los artrópodos afectados. Cañedo y Ames (2004) caracterizan a las colonias como: densas, algodonosas a pulverulentas de bordes definidos, coloración blanca que con el tiempo se vuelven amarillentas a cremosas. En el envés de la caja de cultivo, la colonia es rojiza al centro y amarillenta en sus bordes. Microscopicamente (Figura 16) Humber (2005, 2012) describe a los conidióforos densamente unidos o en solitario, hialinos, con base globosa como una botella. La extensión apical (raquis) es denticulado con un conidio sésil en cada denticula, generando una imagen de conidios dispuestos en forma de zigzag (simpodioconidios).

Beauveria pertenece a la clase Sordariomycetes. Si bien es posible asignar *Beauveria* a esta clase, es sumamente complejo establecer un conjunto de caracteres exclusivos que definan a este género, por lo que algunos autores plantean que es un grupo polifilético. Sumado a ello, los clados establecidos dentro del género están justificados por caracteres que aparentemente son homoplásicos por lo que algunas especies, dependiendo de las reconstrucciones filogenéticas, pueden pertenecer a uno u otro clado (Rehner, 2005; Rehner *et al.*, 2011).

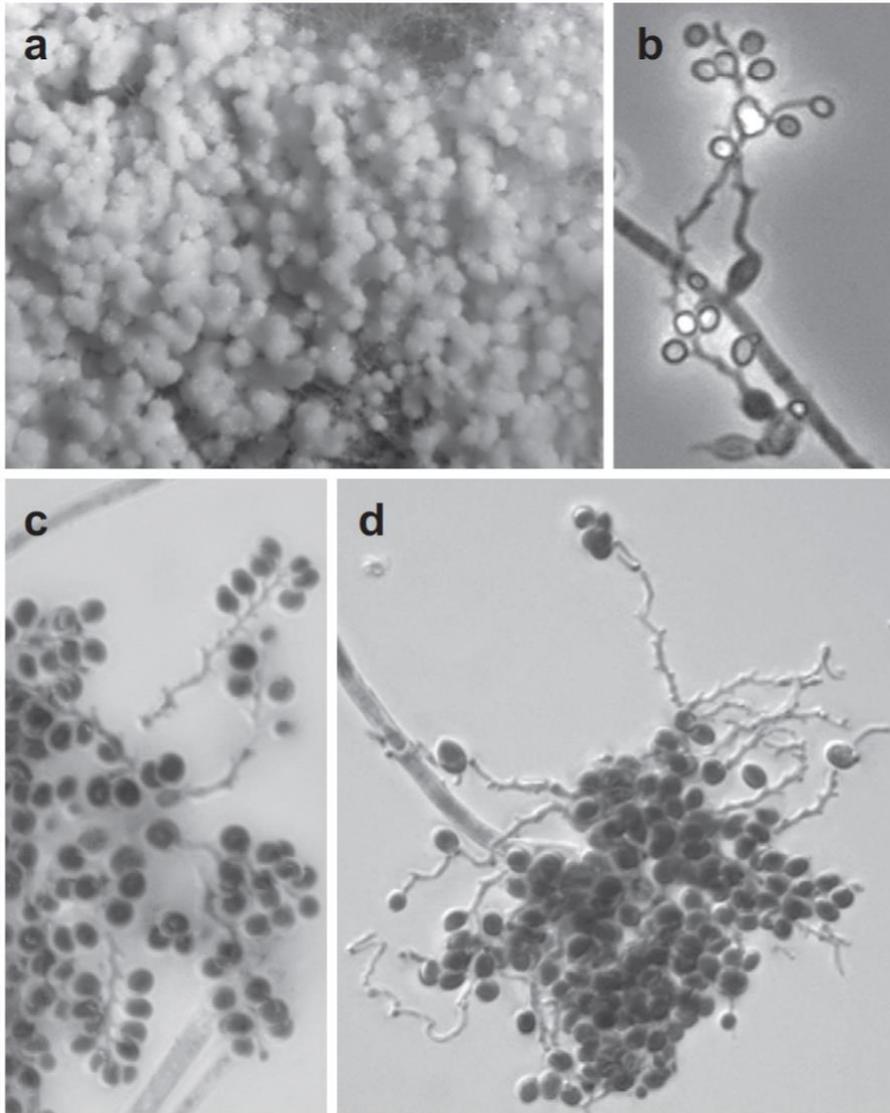


Figura 16: Montaje y observación microscópica del género *Beauveria*. (a) Condensaciones globosas típicas de conidios. (b-d) Conidióforos con bases en forma de botella y esterigmas denticulares con conidios dispuestos en zigzag. Fuente: Humber (2012), p. 172. Las imágenes cuentan con permiso explícito del autor para su uso en la presente Tesis.

Metarhizium

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes (Anamorfo: Hyphomycetes)

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Género: *Metarhizium*

Este género cosmopolita ha tenido mucho reconocimiento en los últimos años, debido a su potencial en el control microbiológico de plagas agrícolas. Bidochka y Small (2005) mencionan cómo, en un corto periodo de tiempo (2000-2003), el género despertó gran interés en la comunidad internacional con más de 150 publicaciones.

Metarhizium es uno de los primeros géneros estudiados para el control de plagas agrícolas (Kepler *et al.*, 2012), cuya clasificación taxonómica sigue aún siendo difícil.

Morfológicamente el género presenta, en medios de cultivo enriquecidos, colonias aplanadas, “*pegadas al medio*”, circulares de aspecto algodonoso, laxo con bordes blanquecinos y centro de colores que van del verde oliva, amarillento al marrón oscuro; y en el envés, del incoloro al castaño (Padilla-Melo *et al.*, 2000; Cañedo y Ames, 2004). Las variaciones de color pueden presentarse de un repique a otro, Pattermore *et al.* (2014) mencionan variaciones fenotípicas en medios artificiales aún proviniendo de colonias monospóricas, sin poder explicar bien el porqué, aunque en hipótesis se debería a la presencia de transposones que afectan la virulencia de la cepa. Bajo ciertas condiciones de cultivo, las colonias pueden presentar sinemas de color blanquecino y ápices pardo-claros (Padilla-Melo *et al.*, 2000), o zonas infértiles como signo de envejecimiento de la colonia (Wang *et al.*, 2005)

Bajo el microscopio (Figura 17), las principales características de *Metarhizium* son la presencia de conidióforos ramificados, similares a candelabros, que nacen a su vez de hifas ramificadas, generando un himenio denso. Fiálides cilíndricas truncas en forma de clavos y conidios unicelulares cilíndricos truncados, que forman cadenas muy largas unidas lateralmente conformando columnas prismáticas (Cañedo y Ames, 2004; Humber 2005, 2012).

La clasificación taxonómica del género requiere de estudios pluridimensionales, con enfoques en las características morfológicas, pero sobre

todo a partir de estudios genéticos. Bidochka *et al.* (2001); Bidochka y Small (2005) profundizan en este aspecto, correlacionando los datos obtenidos a partir de caracterizaciones morfo-fisiológicas y genéticas a fin de poder establecer un estudio filigráfico de *Metarhizium*. Los autores establecen que “*el género Metarhizium está compuesto de un número de grupos genéticos y complejos de especies crípticas*”, es decir, especies que satisfacen el concepto biológico de encontrarse aislados reproductivamente pero que, desde la morfología, es difícil distinguirlos. Esta complejidad de especies crípticas es defendida por Steinwender *et al.* (2014). Bidochka y Small (2005) sugieren que los grupos genéticos de *Metarhizium* que provienen de habitat templados poseen un amplio rango de hospederos, contrariamente a los grupos genéticos provenientes de habitat tropicales o subtropicales, donde presentan especificidad respecto a los hospederos.

En cuanto a la forma perfecta, a partir de estudios genéticos, fue posible relacionar al anamorfo *Metarhizium* con el teleomorfo del género *Metacordyceps* (Sung *et al.*, 2007; Bischoff *et al.*, 2009; Kepler *et al.*, 2012, 2014).

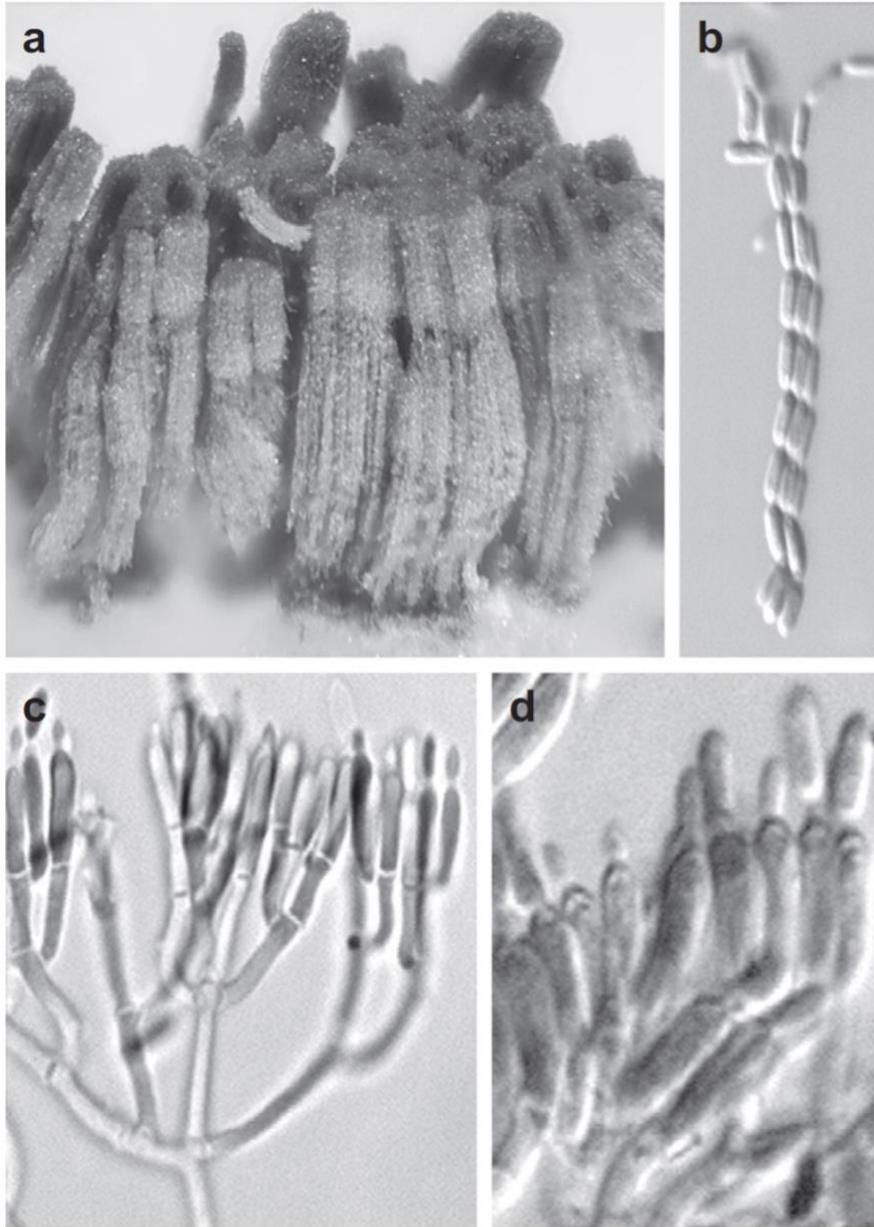


Figura 17: Montaje y observación microscópica del género *Metarhizium*. (a) Masas de conidios agrupadas en largas cadenas paralelas que conforman columnas prismáticas. (b) Cadenas de conidios donde se puede observar la disposición de las cadenas unidas por sus laterales. (c) Conidióforos ramificados muy próximos unos de otros sobre una superficie fértil plana (himenio). (d) Ápices truncos donde las fiálides van conformando progresivamente los conidios. Fuente: Humber (2012), p. 179. Las imágenes cuentan con permiso explícito del autor para su uso en la presente Tesis.

Paecilomyces (Purpureocillium)

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes (Anamorfo: Hyphomycetes)

Orden: Hypocreales

Familia: Ophicordycipitaceae

Género: *Paecilomyces (Purpureocillium)*

Este género es, dentro de los presentes en el orden Hypocreales, uno de los que más estudios filogenéticos ha recibido, puesto que se trata de una rama polifilética con reclasificaciones de especies constantemente entre los órdenes de la división Ascomycota: Eurotiales e Hypocreales (Luangsa-ard *et al.*, 2004, 2011).

Muchas de las especies que estaban incluidas en el género *Paecilomyces*, fueron reclasificadas, en el año 2005, en el género *Isaria* (Sordariomycetes: Hypocreales: Cordycipitaceae), por presentar similitudes dentro del clado y por poseer su forma teleomorfa al género *Cordyceps* (Luangsa-ard *et al.*, 2005). Otras especies aún no se han diferenciado y se sigue usando como sinonimia el género *Paecilomyces* (Humber, 2012). Trabajos recientes de Luangsa-ard *et al.* (2011) han estudiado más profundamente a la especie *Paecilomyces lilacinus*, hongo conocido por su potencial como agente de control microbiológico. En estos trabajos, los autores plantean reasignar *P. lilacinus* por sus similitudes genéticas al género *Purpureocillium lilacinum*.

Estas discusiones taxonómicas plantean la dificultad de clasificar a las especies de este género por sus características morfológicas debido a que pareciera ser un caso más de especies crípticas, como los géneros tratados anteriormente.

Desde el punto de vista macroscópico, Cañedo y Ames (2004) describen a las colonias de coloración blanquecina y achatadas, “pegadas al medio” inicialmente. Con el comienzo de la conidiogénesis, la colonia va adquiriendo una coloración rosada mate y en el envés de las cajas de crecimiento, la misma se vuelve amarillento a pardo claro.

Bajo el microscopio (Figura 18), los conidióforos pueden ser terminales o nacer en otras partes del micelio, con fiálides en grupos con forma de botella con base ensanchadas y largos cuellos. Los conidios son cilíndricos a fusiformes, unidos en forma de cadenas muy frágiles, que se rompen fácilmente al realizar los montajes.

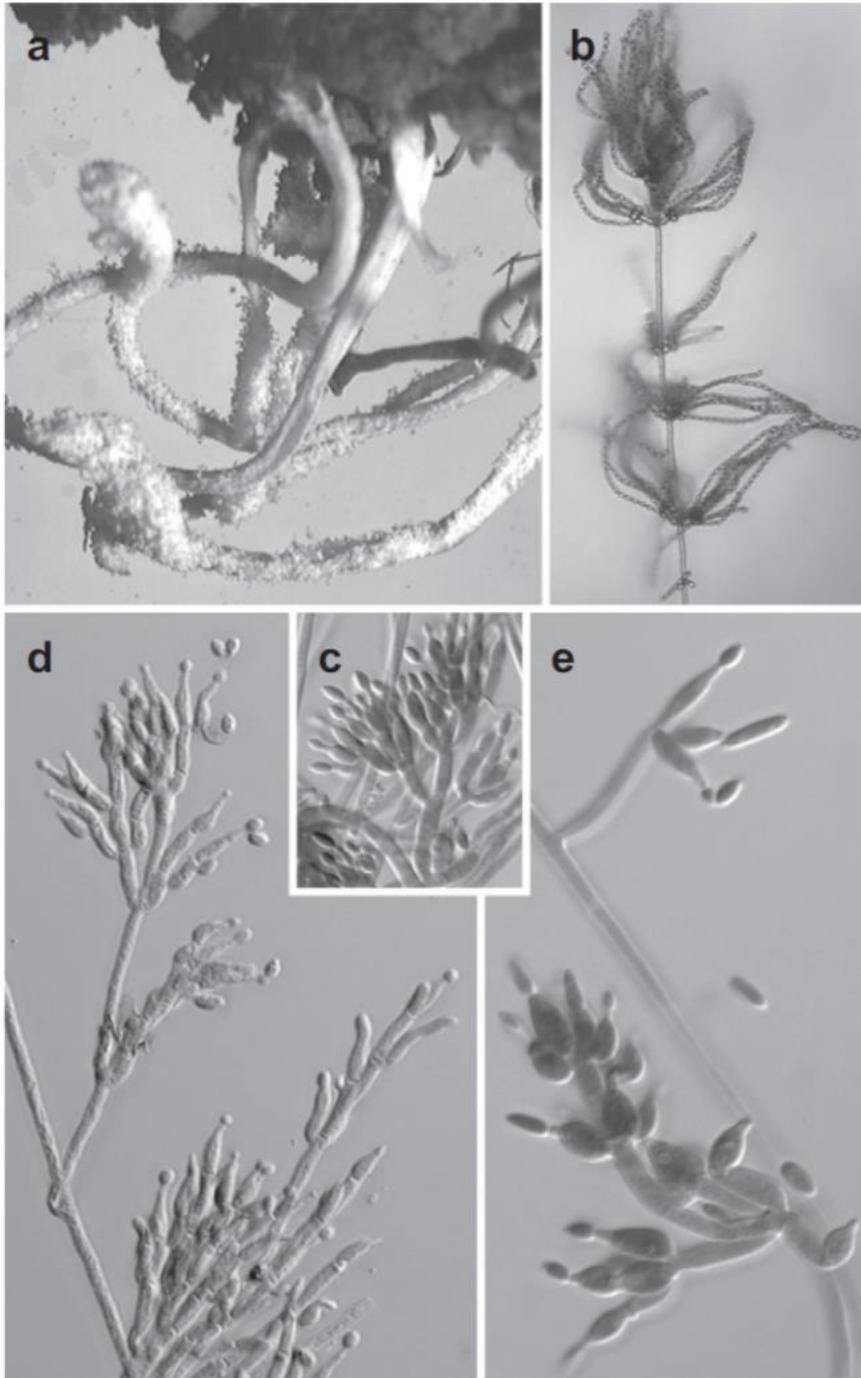


Figura 18: Montaje y observación microscópica del género *Isaria* (antes *Paecilomyces*). (a) Sinema. (b-e) Conidióforos (fiálides) con base ensanchada y cuello extendido. Fuente: Humber (2012), p. 177. Las imágenes cuentan con permiso explícito del autor para su uso en la presente Tesis.

Objetivo general

La presente Tesis tiene por objetivo **evaluar, bajo condiciones controladas, la acción de hongos entomopatógenos nativos del Oeste argentino en el control biológico de las plagas de vid: *Lobesia botrana*, *Naupactus xanthographus* y *Brevipalpus* spp.**

Objetivos específicos

A fin de alcanzar el objetivo general, la Tesis se estructuró en varios objetivos específicos establecidos por capítulos:

Capítulo I:

1. Verificar la presencia de hongos entomopatógenos nativos en los viñedos del oeste argentino mediante muestreos de suelos y/o de individuos infectados.
2. Establecer las características morfológicas y fisiológicas de las cepas de hongos entomopatógenos encontradas.
3. Caracterizar molecularmente a los hongos entomopatógenos aislados.

Capítulo II:

4. Evaluar el crecimiento de las cepas entomopatógenas aisladas a diferentes temperaturas.
5. Evaluar el efecto de los principales fungicidas utilizados en la viticultura argentina sobre los entomopatógenos identificados.

Capítulo III:

6. Evaluar la acción de diferentes cepas de los hongos entomopatógenos encontrados y un producto comercial nacional sobre distintos estadios larvales de *L. botrana*.
7. Evaluar la acción de las cepas de los hongos entomopatógenos encontrados y un producto comercial nacional sobre distintos estadios juveniles y adultos de *N. xanthographus*.
8. Evaluar la acción de las cepas de los hongos entomopatógenos encontrados y un producto comercial nacional sobre distintos estadios de *Brevipalpus* spp.

Capítulo IV:

9. Evaluar, bajo condiciones controladas, la acción del conjunto de cepas aisladas sobre distintos estados de desarrollo de individuos benéficos (*Apis mellifera* L. 1758 y *Harmonia axydiris* Pallas 1773).

Hipótesis

Los artrópodos plagas de los viñedos argentinos son susceptibles de ser parasitados por distintos microorganismos presentes en el agroecosistema. Los hongos entomopatógenos representan una herramienta alternativa al control químico. Por ello, **existen en los viñedos del Oeste argentino hongos entomopatógenos nativos, capaces de ser utilizados para el control biológico de *Lobesia botrana*, *Naupactus xanthographus* y *Brevipalpus* spp.**

Principio metodológico general

El trabajo de Tesis Doctoral presenta una investigación del tipo aplicada, cuyo alcance es descriptivo-explicativo al otorgar características específicas a los individuos estudiados, con una obtención de datos de carácter observacional-experimental y un tratamiento cuali-cuantitativo de los mismos. El alcance temporal será sincrónico ya que el tiempo, en general, no es un factor tenido en cuenta.

Bibliografía

- Aguilera Sammaritano, J.; Deymié, M.; Herrera, M.; Vazquez, F.; Cuthbertson, A.G.S.; López Lastra, C.C.; Lechner, B. 2018. The entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* for the European grapevine moth, *Lobesia botrana* Den. & Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae) and its effect to the phytopathogenic fungus, *Botrytis cinerea*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. DOI: 10.1186/s41938-018-0086-4.
- Agrios, G.N. 2008. Introducción a la Fitopatología. Editorial LIMUSA (2da. Edición), México, 838 p.
- Alean, I.R.I.N.A. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus sociales* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero (Tesis de Grado), Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas Microbiología Agrícola y Veterinaria, Colombia.
- Aragón, J.R.; Coscarón, M.C.; Díaz, N.B.; Lanteri, A.A.; Loíacono, M.; Marvaldi, A.E.; Morrone, J.J. Stock, P. 1994. Bases para el control integrado de los gorgojos de la alfalfa. Lanteri, A.A. (Eds) De La Campana, Ediciones.
- Araújo, J.P.M. y Hughes, D.P. 2016. Diversity of Entomopathogenic Fungi: Which Groups Conquered the Insect Body? *Advances in Genetics*, 94:1-39. DOI: 10.1016/bs.adgen.2016.01.001
- Aruani, C. 2011. Cambio climático y vitivinicultura en Argentina: Evaluación de la situación actual y proyecciones futuras, en base a datos empíricos y opiniones de los distintos sectores de la industria. En *Informe Final, Beca de Investigación OIV 2009*. Organización Internacional de la Viña y el Vino.
- Atkins, S.D.; Clark, I.M.; Pande, S.; Hirsch, P.R.; Kerry, B.R. 2005. The use of real-time PCR and species-specific primers for identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Ecology*, 51:257-264.
- Ayres, M.P. y Lombardero, M.J. 2000. Assessing the consequences of global change for forest disturbance from herbivores and pathogens. *The Science of Total Environment*, 262:263-286.
- Badilla, F. 1990. Utilización de hongos entomopatógenos en el control de insectos. Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA) N°24, Costa Rica.
- Barelli, L.; Moonjely, S.; Behie, S.W.; Bidochka, M.J. 2016. Fungi with multifunctional lifestyles: endophytic insect pathogenic fungi. *Plant. Mol. Biol.* DOI: 10.1007/s11103-0150413-z

- Bidochka, M.J.; Kamp, A.M.; Lavender, T.M.; Dekoning, J.; de Croos, J.N.A. 2001. Habitat Association in Two Genetic Groups of the Insect-Pathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*: Uncovering Cryptic Species? *Applied and Environmental Microbiology*, DOI: 10.1128/AEM.67.3.1335-1342.2001
- Bidochka, M.J. y Small, C.L. 2005. Phylogeography of *Metarhizium*, an Insect Pathogenic Fungus. En *Insect-Fungal Associations Ecology and Evolution*, Vega, F.E. y Blackwell, M. (Eds.), University Press, Oxford, pp.28-50.
- Bischoff, J.F.; Rehner, S.A.; Humber, R.A. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4):512-530. DOI: 10.3852/07-202
- Butt, T.M. ; Coates, C.J. ; Dubovskiy, I.M. ; Ratcliffe, N.A. 2016. Chapter nine – entomopathogenic fungi : new insights into host-patogen interactions. *Adv. Genet.* 94 :307-364.
- Candau, J.N. 2008. Impacts du changement climatique sur les insectes ravageurs dges forêts méditerranéenes. *Fôret méditerranéene t. XXXiX*, nº2, Junio 2008.
- Cañedo, V. y Ames, T. 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. *Centro Internacional de la Papa (CIP)*, Lima, Perú.
- Chaverri, P. 2006. Hypocrealean (Hypocreales, Ascomycota) Fungal Diversity in Different Stages of Tropical Forest Succession in Costa Rica. *Biotropica*, 38(4):531-543.
- Childers, C.C.; French, J.V.; Rodriguez, J.C.V: 2003. *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, *B. phoenicis* and *B. lewisi* (Acari: Tenuipalpidae): a review of their biology, feeding injury and economic importance. *Experimental and Applied Acarology*, 30:5-28.
- Cozzi, G.; Pascale, M.; Perrone, G.; Viscontim A.; Logrieco, A. 2006. Effect of *Lobesia botrana* damages on black aspergilli rot and ochratoxin A content in grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111:S88-S92.
- Cozzi, G.; Somma, S.; Haidukowski, M. ; Logrieco, A.F. 2013. Ochratoxin A Management in Vineyards by *Lobesia botrana* Biocontrol. *Toxins*, 5:49-59.
- Cucchi, N.J.A. y Becerra, V.C. 2009. Plagas Animales: ácaros, insectos y nemátodos. En: *Manual de Tratamientos Fitosanitarios para cultivos de clima templado bajo riego. Sección III: Vid – Tomo I*. Cucchi, N.J.A. y Becerra, V.C. (Eds). Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), pp. 49-148.
- Dagatti, C.V. y Becerra, V.C. 2015. Ajuste de modelo fenológico para predecir el comportamiento de *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) en un viñedo de Mendoza, Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 74 (3-4):117-122.

- Deis, L.; de Rosas, M.I.; Malovini, E.; Cavagnaro, M.; Cavagnaro, J.B. 2015. Impacto del cambio climático en Mendoza. Variación climática de los últimos 50 años. Mirada desde la fisiología de la vid. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 47(1):67-92.
- Edelstein, J.D.; Lecuona, R.E. 2003. Presencia del hongo entomopatógeno *Pandora gammae* (Weiser) Humber (Zygomycetes: Entomophthorales), en el complejo de "orugas medidoras de la soja" (Lepidoptera: Plusiinae) en Argentina. *RIA* 32(1):31-38.
- Eilenberg, J.; Hajek, A.; Lomer, C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46:387-400.
- Elmer, P.A. y Michailides, T.J. 2007. Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. En *Botrytis: Biology, pathology and control*, Springer Netherlands, pp. 243-272.
- Ferron, P.; Fargues, J.; Riba, G. 1991. Les champignons agents de lutte microbiologique contre les ravageurs. *Dost. Cell. Env.*, 5 :55-76.
- Fishbein, D. 2012. Cuadernillo nº15 Introducción a la teoría del control biológico de plagas. En *Serie Técnica: Manejo Integrado de Plagas Forestales*, Villacide J. y Corley J. (Eds). Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Franco, K.; Rodríguez, S.; Cervantes, J.; Barranco, J. 2011. Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente*. 11(22):143-160.
- García García, M.A. ; Cappello García, S.; Lesher Gordillo, J.M.; Molina Martínez, R.F. 2008. Asilamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* a partir de insectos silvestres en el estado de Tabasco. *Semana de Divulgación y Video Científico*, México, pp. 261-267.
- García-García, M.A.; Cappello García, S.; Lesher-Gordillo, J.M.; Molina-Martínez, R.F. 2015. Hongos Entomopatógenos como una alternativa en el control Biológico. *Kuxulkab´*, 15(27):25-28.
- Gilligan, T.M.; Epstein, M.E. ; Passoa, S.C. ; Powell, J.A.; Sage, O.C.; Brown, J.W. 2011. Discovery of *Lobesia botrana* ([Denis & Schiffermüller]) in California: an invasive species new to North America (Lepidoptera: Tortricidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.*, 113(1):14-30.
- Glare, T.R. 2004. Biotechnological Potential of Entomopathogenic Fungi. *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications*, 79-90.
- Goettel, M.S.; Eilenberg, J.; Glare, T. 2010. Entomopathogenic Fungi and their Role in Regulation of Insect Populations. En *Insect Control: Biological and synthetic*

- agents*, Gilbert, L.I. y Gill, S.S. (Eds), Academic Press, China, pp. 387-432.
- Holgado, M.G.; Quiroga, V.N.; López Plantey, R.J.; Rodríguez Plaza, L.; Rabinovich D.A.; Molina, M.; Mácola, G. 2014. Estudios bioecológicos y de dinámica poblacional de la artropofauna asociada al viñedo en Mendoza, Argentina. En *Book of abstracts of 37th World Congress of Vine and Wine*, Mendoza, Argentina, pp. 493-494.
- Humber, R.A. 2005. Entomopathogenic fungal identification. Disponible en USDA, <https://www.ars.usda.gov/ARSTUserFiles/80620520/apswkshoprev.pdf> (visto el 22 de Junio de 2015).
- Humber, R.A. 2012. Identification of entomopathogenic fungi. En: Lacey, L.A. (Ed.) *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, 2^{da} edición, Academic Press (Elsevier) Londres, pp. 151-186.
- Jaber, L.R. 2015. Grapevine leaf tissue colonization by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* s.l. and its effect against downy mildew. *BioControl* 60:103-112.
- Jaber, L.R. y Ownley, B.H. 2017. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pest and plant pathogens? *Biological Control* DOI: 10.1016/j.biocontrol.2017.01.013
- Kepler, R.M.; Sung, G-H.; Ban, S.; Nakagiri, A.; Chen, M-J.; Huang, B.; Li, Z.; Spatafora, J.W. 2012. New teleomorph combinations in the entomopathogenic genus *Metacordyceps*. *Mycologia*, 104(1):182-197. DOI: 10.3852/11-070
- Kepler, R.M.; Humber, R.A.; Bischoff, J.F. 2014. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia*, 106(4):811-829. DOI: 10.3852/13-319
- Kirk, P.M.; Cannon, P.F.; Minter, D.W.; Stalpers, J.A. (Eds). 2008. Dictionary of the Fungi 10th Edition, CABI International, Wallingford, Reino Unido.
- Klingen, I. y Haukeland, S. 2006. Chapter 9: The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. En: Eilenberg, J. and Hokkanen, H.M.T. (Eds.) *An Ecological and Social Approach to Biological Control*. Springer, pp. 145-211.
- Marti, G.A.; Scorsetti A.C.; Siri, A.; López Lastra, C.C. 2005. Isolation of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (Deuteromycotina: Hyphomycetes) from the Chagas disease vector, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Argentina. *Mycopathologia*, 159(3): 389-391.
- Marti, G.A.; López Lastra, C.C.; Pelizza, S.A.; García, J.J. 2006. Isolation of *Paecilomyces lilacinus* (Thim) Samson) (Ascomycota: Hypocreales) from the Chagas disease vector, *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera: Reduviidae) in an

- endemic area in Argentina. *Mycopathologia* 162:369-372.
- Mondy, N.; Charrier, B.; Fermaud, M.; Pracros, P.; Corio-Costet, M.F. 1998. Mutualism between a phytopathogenic fungus (*Botrytis cinerea*) and a vineyard pest (*Lobesia botrana*). Positive effects on insect development and oviposition behaviour. *C.R. Acad. Sci. Paris. Sciences de la vie / Life Sciences*, 321:665-671.
- Mondy, N. y Corio-Costet, M.F. 2000. The response of the grape berry moth (*Lobesia botrana*) to a dietary phytopathogenic fungus (*Botrytis cinerea*): the significance of fungus sterols. *Journal of Insect Physiology*, 46:1557-1564.
- Mondy, N. y Corio-Costet, M.F. 2004. Feeding insects with a phytopathogenic fungus influences their diapause and population dynamics. *Ecological Entomology*, 29:711-717.
- Moreau, J.; Thiéry, D.; Troussard, J.P.; Benrey, B. 2007. Grape variety affects female but also male reproductive success in wild European grapevine moths. *Ecological Entomology*, 32:747-753.
- 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. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132:1-41.
- Landa, B.B.; López-Díaz, C.; Jiménez-Fernández, D.; Montes-Borrego, M.; Muñoz-Ledesma, F.J.; Ortiz-Urquiza, A.; Quesada-Moraga, E. 2013. *In-planta* detection and monitorization of endophytic colonization by a *Beauveria bassiana* strain using a new-developed nested and quantitative PCR-based assay and confocal laser scanning microscopy. *Journal of Invertebrate Pathology*. DOI: 10.1016/j.jip.2013.06.007
- Lecuona, R.E.; Díaz, B.M. 2001. Seceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) hacia los hongos entomopatógenos *Nomuraea rileyi*, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. *RIA* 30(1):25-42.
- Lecuona, R.E.; Edelstein, J.D.; Berretta, M.; La Rossa, F.R.; Arcas, J.A. 2001. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hyphomycetes) strains as a potential agent for control of *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera: Reduviidae). *J. Medical Entomol.* 38(2):172-179.
- Lecuona, R.E.; Turica, M.; Tarocco, F.; Crespo, D.C. 2005. Microbial Control of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) with entomopathogenic fungi. *Méd. Entomology* 42(3):332-336.
- Luangsa-ard, J. Hywel-Jones, N.L.; Samson, R.A. 2004. The polyphyletic nature of *Paecilomyces sensu lato* base don 18S-generated rDNA phylogeny. *Mycologia*, 96(4):773-780.
- Luangsa-ard, J.J.; Hywel-Jones, N.L.; Manoch, L.; Samson, R.A. 2005. On the

- relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. *Mycol. Res.*, 109(5):581-589.
- Luangsa-ard, J.; Houbraken, J.; van Doorn, T.; Hong, S.B.; Borman, A.M.; Hywel-Jones, N.L.; Samson, R.A. 2011. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Letters*, 321:141-149.
- Luna Rodríguez, J.A. y Lecuona, R.E. 2002. Selección de cepas de hongos entomopatógenos nativos para el control de la Tucura *Rhammatocerus pictus* (Bruner) (Orthoptera: Acrididae). *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 31(1):67-84.
- López Lastra, C.C.; Steciow, M.M.; García, J.J. 1999. Registro más austral del hongo *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes: Saprolegniales) como patógeno de lavas de mosquitos (Diptera: Culcidae). *Rev. Iberoam. Micol.* 16:143-145.
- López Lastra, C.C. y García, J.J. 2019. Hongos patógenos de insectos vectores. En: Micopatología de artrópodos. Hongos entomopatógenos para ser usados como bioinsumos en el control microbiano de plagas. López Lastra, C.C. y Lecuona R.E. (Eds.) *INTA Ediciones*, Colección Investigación, Desarrollo e Innovación. ISBN 978-987-521-975-5. Páginas 35-45.
- Ortiz-Urquiza, A. y Keyhani, N.O. 2013. Action on the Surface: Entomopathogenic Fungi versus the Insect Cuticle. *Insects*, 4:357-374. DOI: 10.3390/insects4030357
- Padilla-Melo, G.N.; Bernal-Urbe, M.G.; Vélez-Arango, P.E.; Montoya-Restrepo, E.C. 2000. Caracterización patogénica y morfológica de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* obtenidos de diferentes ordenes insectiles. *Cenicafé*, 51(1):28-40.
- Pattermore, J.A.; Hane, J.K.; Williams, A.H.; Wilson, B.A.; Stodart, B.J.; Ash, G.J. 2014. The genome sequence of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* and comparative genomics of *Metarhizium* species. *BMC Genomics*, DOI: 10.1186/1471-2164-15-660
- Pelizza, S.A.; Cabello, M.N.; Lange, C.E. 2010. Nuevos registros de hongos entomopatógenos en acrididos (Orthoptera: Acridoidea) de la República Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 69(3-4):287-291.
- Porras, L.; Lecuona, R. 2008. Estudios de laboratorio para el control de *Ceratitis capitata* (Widmann) (Diptera: Tephritidae) (Mosca del Mediterráneo) con *Beauveria bassiana*. *Agronomía Costarricense* 32(2):119-128.
- Rai, D.; Updhyay, V.; Mehra, P.; Rana, M.; Pandey, K. 2014. Potential of entomopathogenic fungi as biopesticides. *Ind. J. Sci. Res. and Tech.*, 2(5):7-13.
- Raymundo, T.; Escudero-Leyva, E.; Soto-Agudelo, R.; García-Jiménez, J.; Romero-Bautista, L.; Valenzuela, R. 2017. Nuevos registros de Hypocreales (Sordariomycetes, Ascomycota) del bósque mesófilo de montaña de la Sierra Alta

- Hidalguense en México. *Acta Botanica Mexicana*, 120:39-57.
- Rehner, S.A. 2005. Phylogenetics of the Insect Pathogenic Genus *Beauveria*. En *Insect-Fungal Associations Ecology and Evolution*, Vega, F.E. y Blackwell, M. (Eds.), University Press, Oxford, pp. 3-27.
- Rehner, S.A.; Minnis, A.M.; Sung, G.; Luangsa-ard, J.J.; Devotto, L.; Humber, R.A. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103(5):1055-1073. DOI: 10.3852/10-302
- Ripa, R. 2008. Burritos y Capachitos. En: *Manejo de plagas en paltos y cítricos*, Ripa, R. y Larral, P. (Eds.) Colección Libros INIA – N°23, pp. 155-162.
- Ripa, R. y Luppichini, P. 2010. Insectos plaga. En: *Manejo de Plagas de la Vid*. Larral, P. (Ed). Colección Libros INIA – N°26, pp. 70-82.
- Rodríguez, M.; Gerding, M.; France, A. 2006. Efectividad de aislamientos de hongos entomopatógenos sobre larvas de polva del tomate *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae). *Agricultura Técnica* (Chile) 66(2):159-165.
- Rondot, Y. y Reineke, A. 2018. Endophytic *Beauveria bassiana* in grapevine *Vitis vinífera* (L.) reduces infestation with piercing-sucking insects. *Biological Control* DOI: 10.1016/j.biocontrol.2016.10.006
- Schapoaloff, M.E. 2012. Diversidad y patogenicidad de especies de hongos entomopatógenos en insectos plaga de yerba mate *Ilex paraguariensis* en la provincia de Misiones (Tesis Doctoral), Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, La Plata, Argentina.
- Scorsetti, A.C.; Humber, R.A.; De Gregorio, C.; López Lastra, C.C. 2007. New records of entomopathogenic fungi infecting *Bemisia tabaco* and *Trialeurodes vaporariorum*, pests of horticultural crops, in Argentina. *BioControl* DOI: 10.1007/s10526-007-9118-9.
- Scorsetti, A.C.; Humber, R.A.; García, J.J.; López Lastra, C.C. 2007. Natural occurrence of entomopathogenic fungi (Zygomycetes: Entomophthorales) of aphid (Hemiptera: Aphididae) pests of horticultural crops in Argentina. *BioControl* DOI: 10.1007/s10526-006-9045-1.
- Sentis, A. 2012. Effets des changements climatiques sur les insectes et conséquences économiques et sanitaires. *Bulletin de la Société d'Entomologie du Québec*, 19(1).
- Siri, A. ; Scorsetti, A.C.; Dikgolz, V.E.; López Lastra, C.C. 2005. Natural infections caused by the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as pathogen of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) in Argentina. *Biocontrol*, 50:937-940.
- Sosa-Gómez, D.R.; López Lastra, C.C.; Humber, R.A. 2010. An Overview of

- Arthropod-Associated Fungi from Argentina and Brazil. *Mycopathologia* 170:61-76. DOI: 10.1007/s11046-010-9288-3
- Sosa Gómez, D. y D'Alessandro, C. 2019. Hongos entomopatógenos del Phylum Ascomycota. En: Micopatología de artrópodos. Hongos entomopatógenos para ser usados como bioinsumos en el control microbiano de plagas. López Lastra, C.C. y Lecuona R.E. (Eds.) *INTA Ediciones*, Colección Investigación, Desarrollo e Innovación. ISBN 978-987-521-975-5. Páginas 47-78.
- Stavridis, D.G. y Savopoulou-Soultani, M. 1998. Larval performance on and oviposition preference for known and potential hosts by *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Eur. J. Entomol.*, 95:55-63.
- Steinwender, B.M.; Enkerli, J.; Widmer, F.; Eilenberg, J.; Thorup-Kristensen, K.; Meyling, N.V. 2014. Molecular diversity of the entomopathogenic fungal *Metarhizium* community within an agroecosystem. *Journal of Invertebrate Pathology*, 123:6-12.
- Sung, G-H.; Hywel-Jones, N.L.; Sung, S-M.; Luangsa-ard, J.J.; Shrestha, B.; Spatafora, J.W. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Microbiology*, 57:5-59. DOI: 10.3114/sim.2007.57.01
- Tasin, M., Knudsen, G.K.; Pertot, I. 2012. Smelling a diseased host: grapevine moth responses to healthy and fungus-infected grapes. *Animal Behaviour*, 83:555-562.
- Thiéry, D. y Moreau, J. 2005. Relative performance of European grapevine moth (*Lobesia botrana*) on grapes and others hosts. *Oecologia*, 143:548-557.
- Toledo, A.V. y Manfrino, R.G. 2019. Hongos patógenos de himenópteros Auchenorrhyncha y Sternorrhyncha perjudiciales para la agricultura en la Argentina. En: Micopatología de artrópodos. Hongos entomopatógenos para ser usados como bioinsumos en el control microbiano de plagas. López Lastra, C.C. y Lecuona R.E. (Eds.) *INTA Ediciones*, Colección Investigación, Desarrollo e Innovación. ISBN 978-987-521-975-5. Páginas 121-150.
- Wang, C.; Butt, T.M.; St Leger, R.J. 2005. Colony sectorization of *Metarhizium anisopliae* is a sign of ageing. *Microbiology*, 151:3223-3236. DOI: 10.1099/mic.0.28148-0

Páginas WEB

- Wines of Argentina http://www.winesofargentina.org/archivos/Arg_Wine_Zones_1.jpg (visitada el 12 de Octubre de 2017).
- ServoVendi <https://www.servovendi.com/it/trappola-di-feromoni-triangolare-delta-koppert-deltatrap.html> (visitada el 15 de Julio de 2018)

Revista de Enología http://www.acenologia.com/ciencia69_03.htm (visitada el 17 de Julio de 2018)

OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino), Balance 2017 <http://www.oiv.int/public/medias/5479/oiv-en-bilan-2017.pdf> (visitado el 10 de marzo 2018)

Estudio de la presencia de hongos entomopatógenos en zonas vitícolas del Oeste argentino: aislamiento e identificación

1.1 Resumen

La búsqueda de nuevas alternativas para el control de plagas implica la exploración de la presencia de agente de control en las regiones agrícolas pertinentes. El aislamiento de hongos entomopatógenos nativos favorece por un lado a la generación de conocimiento sobre la ocurrencia, distribución y dinámica de las comunidades fúngicas entomopatógenas, como así también ayuda a crear una reserva de potenciales agentes para el control de diferentes plagas. La identificación de las cepas aisladas requiere de observaciones macro y microscópicas junto con el empleo de claves taxonómicas específicas a los organismos en estudio. En muchos agentes de control biológico de origen fúngico, las identificaciones mediante características morfológicas solo permiten alcanzar al grado de género, sin poder diferenciar a las cepas que componen un grupo morfológico. El desarrollo de nuevas técnicas moleculares junto con los estudios filogenéticos son herramientas que permiten aumentar el grado de robustez en la identificación de cepas entomopatógenas. En el presente Capítulo se presentará el muestreo de insectos infectados *in vivo* y suelos vitícolas del Oeste argentino. Con casi 1945 km recorridos a lo largo de las 7 principales provincias vitícolas argentinas, se recolectaron muestras que luego se analizaron en laboratorio mediante la técnica de insecto trampa. Un total de 30 cepas monospóricas fueron aisladas, conformando una colección de hongos entomopatógenos. A partir de las características morfológicas se pudieron identificar tres morfo-grupos que correspondieron a los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces*. Mediante técnicas moleculares, se evaluó la performance de 6 cebadores específicos citados en la bibliografía. Tanto para el caso de los géneros *Beauveria* como *Metarhizium* la sección correspondiente al factor de elongación 1-alfa de la subunidad ribosomal resultó ser lo suficientemente robusto como para poder diferenciar a las cepas aisladas de otras cepas de referencia presentes en GenBank®. Las especies identificadas fueron *Beauveria bassiana* y *Metarhizium robertsii*. Respecto al género *Paecilomyces*, el estudio filogenético se realizó a partir de los cebadores ITS 4 y 5, el cual no fue lo suficientemente robusto como para mostrar diferencias finas intragrupo. A partir del estudio de comparación por BLAST®, la especie identificada fue *Paecilomyces lilacinus*.

1.2 Introducción

El suelo es el componente vivo más importante de todo ecosistema. Su complejidad en la interacción con todos los agentes bióticos y abióticos, hacen de este un sostén primordial para el normal funcionamiento del flujo ecológico. El agroecosistema, como tal, no escapa a esta realidad, aunque por muchos años el suelo fue visto como un mero sustrato para el cultivo. Sin embargo, los conocimientos que se han logrado sobre el comportamiento de la microflora y fauna en el suelo han permitido desmitificarlo como un componente inerte, aunque aún falta mucho por entender.

Una de las principales características que se destacan, es que el suelo cumple la función de ser el hábitat de un innumerable complejo de plantas, animales y microorganismos (Klingen y Haukeland, 2006). Dentro de estos organismos presentes, los hongos entomopatógenos (HE) edáficos son enemigos naturales de artrópodos, con un rol importante en la regulación de las poblaciones de plagas agrícolas (Jaronski 2007, Meyling, 2007, Quesada-Moraga *et al.* 2007). Algunos autores establecen que las características edáficas de la textura, estructura, tenor de materia orgánica, pH, humedad, temperatura, UV, entre otras, son factores que intervienen directamente sobre la ocurrencia de infecciones de artrópodos *in vivo* (Klingen y Haukeland, 2006; Meyling y Eilenberg, 2007; Quesada-Moraga *et al.*, 2007). En el suelo, los HE pueden sobrevivir en la rizosfera, infectando otros insectos o como esporas de resistencia por largos periodos de tiempo. Mismo, los insectos no susceptibles tienen una acción como dispersante, como es el caso de los Colémbolos, quienes transportan consigo conidios sin ser ellos mismos afectados (Goettel *et al.*, 2011)

La presencia de estos microorganismos en los suelos agrícolas representa un reservorio para el aislamiento de agentes potenciales de biocontrol (Hasan *et al.*, 2012, Goettel *et al.*, 2011; Quesada-Moraga *et al.*, 2007). Las prácticas agrícolas que se desarrollan cada año poseen, a su vez, un importante impacto en la diversidad fúngica entomopatógena presente. A pesar de ello, poco se conoce en profundidad sobre el comportamiento estructural de las comunidades de HE en los cultivos y las prácticas culturales realizadas. Este desconocimiento, puede acarrear la pérdida de un servicio agroecosistémico de importancia para el productor.

Para el caso de la viticultura argentina, la mayor parte (>99%) se encuentra concentrada en el Oeste del país, donde las características edafoclimáticas son muy específicas. Grandes amplitudes térmicas (con temperaturas estivales que superan los 35°C), baja humedad relativa, alta radiación ultravioleta y sobre todo la presencia

de vientos secos provenientes del Oeste, son algunas de las condiciones predominantes en la región vitícola argentina. El viento Zonda es un fenómeno climático capaz de incrementar la temperatura en varios grados y disminuir la humedad relativa a menos del 30% en un corto lapso, a veces pocas horas.

A estas condiciones climáticas extremas se suman prácticas agrícolas particulares, como la irrigación por goteo o por inundación, las enmiendas químicas y orgánicas, las labores de suelo, etc. Dentro de este contexto productivo, la búsqueda de alternativas a las prácticas fitosanitarias de base de química requiere de un mayor conocimiento de la diversidad de HE nativos de los viñedos del Oeste argentino.

El presente Capítulo parte de la exploración de suelos vitícolas de más de 15 años de plantación en las principales provincias productoras de vid. La presencia de hongos adaptados a las condiciones climáticas regionales proporcionaría una mayor ventaja en la aplicación de un microorganismo como agente de biocontrol. Asimismo, la búsqueda de cepas nativas se extendió a la colecta de artrópodos infectados *in vivo*.

Dentro del proceso de aislamiento e identificación de cepas adaptadas provenientes de las zonas productivas, se requiere de técnicas taxonómicas clásicas como la caracterización a partir de atributos macro y microscópicos. En muchos de los casos, las especies de HE (sobre todo aquellas pertenecientes al orden Hypocreales) representan complejos de cepas con características morfológicas muy similares, donde la diferenciación por técnicas clásicas resulta limitada (Rehner *et al.*, 2011; Rehner y Buckley, 2005). Esta dificultad en la diferenciación de cepas dentro de los complejos de especies requiere de técnicas moleculares capaces de ser lo suficientemente robustas como para poder observar divergencias intragrupo.

El presente Capítulo posee como objetivos: 1. Verificar la presencia de HE nativos en los viñedos del Oeste argentino mediante muestreos de suelos y/o individuos infectados *in vivo*. 2. Establecer las características morfológicas de las cepas de hongos entomopatógenos aisladas, y 3. Identificar los hongos entomopatógenos aislados mediante técnicas moleculares y determinar su filogenia.

1.3 Materiales y Métodos

1.3.1 Aislamiento de hongos entomopatógenos

Obtención de aislados a partir de suelos vitícolas

Se determinaron 29 zonas de muestreo a lo largo de la mayor región vitícola del Oeste argentino (>98% del total de los viñedos del país), comprendiendo las provincias de Mendoza, San Juan, Catamarca, La Rioja, Salta, Neuquén y Río Negro. Se consideró como única condición que los viñedos muestreados tuviesen, en lo posible, 15 años de plantación. No se discriminó el tipo de producción (convencional, orgánica y/o biodinámica), sistema de conducción, riego, presencia de verdeo, etc. En todos los casos, esta información se registró por posibles correlaciones con la presencia de HE. En la Tabla 1 se presentan las zonas de muestreos relevadas y en la Tabla 2 las principales características de las mismas.

Se procedió a realizar para cada zona un muestreo compuesto de una hectárea a fin de garantizar una mejor representación de la misma. Se recolectaron 4 submuestras por zona, las cuales comprendían de al menos 200 g de los primeros 20 cm de suelo al pie de la viña, procurando eliminar presencia de rocas, hojarasca, raíces, etc. Las submuestras recolectadas fueron rotuladas y conservadas a 4°C y obscuridad hasta su tratamiento en laboratorio (Klingen *et al.* 2002; Quesada-Moraga *et al.*, 2007; Inglis *et al.*, 2012; Marques, 2012;).

Bajo condiciones controladas, cada submuestra fue tamizada hasta los 45 orificios.cm²-1, y se colocó el tamizado obtenido sobre hojas de papel periódico en exposición con la temperatura y humedad ambiente por al menos 4 horas o hasta lograr un secado uniforme de las mismas, de manera de evitar la presencia de nemátodos entomopatógenos.

El aislamiento de HE a partir de suelos vitícolas se basó en la técnica del “insecto trampa” propuesta por Meyling (2007). Esta metodología plantea colocar en condiciones controladas de humedad y temperatura, insectos en estado juvenil en contacto con la tierra tamizada con el objeto de ser infectados por HE. Se utilizaron estados juveniles de *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) y *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) en los estadios de larva L4 y L5 (por su facilidad de manipulación). La elección de estas especies recayó en la relevancia que posee *L. botrana* en la presente Tesis y la facilidad de cría y similitud morfológica de *P. interpunctella*.

Las submuestras tamizadas se unificaron y homogenizaron por zona. En cajas de Petri de 9 cm de diámetro, se colocaron 20 g de suelo homogenizado y humedecido con agua estéril (hasta capacidad de campo). Seguidamente, se

colocaron por caja de Petri de 9 cm de diámetro, 5 individuos L4 u L5, con 5 repeticiones por zona (Klingen *et al.* 2002; Meyling, 2007; Quesada-Moraga *et al.*, 2007). Se realizó un testigo con suelo tamizado estéril.

Tabla 1: Datos y coordenadas de las zonas de muestro relevadas

Zona	Provincia	Departamento	Localidad	Latitud	Longitud
1	Mendoza	Las Heras	El Algarrobal	S32 50.272	O68 45.934
2	Mendoza	Luján de Cuyo	Las Compuertas	S33 01.879	O68 57.731
3	Mendoza	Luján de Cuyo	Vistalba	S33 01.824	O68 53.770
4	Mendoza	Luján de Cuyo	Perdriel	S33 05.119	O68 54.521
5	San Juan	San Martín	San Martín	S31 31.433	O68 24.812
6	San Juan	San Martín	San Martín	S31 29.793	O68 22.913
7	San Juan	Caucete	Caucete	S31 41.290	O68 18.361
8	San Juan	Caucete	Caucete	S31 41.014	O68 16.487
9	San Juan	25 de Mayo	25 de Mayo	S31 43.248	O68 18.115
10	Salta	Cafayate	Cafayate	S26 05.952	O65 57.957
11	Salta	Cafayate	Cafayate	S26 06.019	O65 57.633
12	Salta	Cafayate	Cafayate	S26 06.252	O65 57.535
13	Salta	Cafayate	Tolombón	S26 12.062	O65 56.406
14	Salta	Cafayate	Tolombón	S26 12.151	O65 56.334
15	Salta	Cafayate	Tolombón	S26 12.029	O65 56.509
16	La Rioja	Chilecito	Tilimuqui	S29 09.235	O67 23.349
17	La Rioja	Chilecito	Malligasta	S29 11.992	O67 25.108
18	La Rioja	Chilecito	Anguinar	S29 15.392	O67 25.868
19	La Rioja	Chilecito	Nonogasta	S29 21.558	O67 26.553
20	La Rioja	Chilecito	Vichigasta	S29 29.491	O67 29.020
21	Catamarca	Tinogasta	Tinogasta	S28 03.512	O67 35.246
22	Neuquén	Confluencia	San Patricio	S38 36.343	O68 17.002
23	Neuquén	Confluencia	San Patricio	S38 36.306	O68 17.028
24	Neuquén	Confluencia	San Patricio	S38 36.181	O68 16.787
25	Río Negro	Gral. Roca	Peñas Blancas	S37 39.511	O67 52.224
26	Río Negro	Gral. Roca	Peñas Blancas	S37 39.515	O67 52.229
27	Río Negro	Gral. Roca	Gral. Roca	S39 03.159	O67 38.799
28	Río Negro	Gral. Roca	Gral. Roca	S39 03.519	O67 37.917
29	Río Negro	Gral. Roca	Gral. Roca	S39 03.749	O67 38.489

Tabla 2: Relevamiento de las principales características agronómicas de las zonas muestreadas

Zona	Suelo	Riego	Cobertura	Conducción	Herbicida	Manejo
1	A	Mixto	SC	Espaldero	S/D	Convencional
2	FA	Goteo	SC	Espaldero	S/D	Convencional
3	FA	Goteo	SC	Espaldero	S/D	Convencional
4	FA	Goteo	SC	Espaldero	S/D	Convencional
5	FA	Superficial	SC	Parral	S/D	Convencional
6	FA	Superficial	SC	Parral	S/D	Convencional
7	FAr	Superficial	SC	Espaldero	S/D	Convencional
8	F	Superficial	SC	Espaldero	S/D	Convencional
9	Ar	Superficial	SC	Espaldero	S/D	Convencional
10	FA	Goteo	G	Parral bajo	Si	Convencional
11	FA	Goteo	O	Espaldero	Si	Convencional
12	FA	Goteo	G/O	Parral	Si	Convencional
13	FA → A	Mixto	C	Parral	Si	Convencional
14	FA → A	Mixto	C	Parral	Si	Convencional
15	FA → P	Goteo	N	Espaldero	Si	Convencional
16	FL	Goteo	N (+++)	Parral	No	Orgánico
17	FLA	Superficial	N	Parral	Si	Convencional
18	FLA	Goteo	N	Parral	No	Orgánico
19	FA	Superficial	N (-)	Parral	No	Convencional
20	FL	Superficial	N	Parral	No	Convencional
21	FA → A	Goteo	N (-)	Parral	Si	Convencional
22	FLA	Goteo	N (--)	Espaldero	Si	Convencional
23	FA	Goteo	N (--)	Espaldero	Si	Convencional
24	FA	Goteo	N (--)	Espaldero	Si	Convencional
25	FAr	Superficial	N (-)	Espaldero	No	Convencional
26	FAr	Superficial	N (-)	Espaldero	No	Convencional
27	FA	Superficial	N	Espaldero	Si	Convencional
28	FL	Superficial	N	Espaldero	Si	Convencional
29	FL	Superficial	N (-)	Espaldero	Si	Convencional

Referencias: Suelo: A: Arenoso; F: Franco; L: Limoso; Ar: Arcilloso; P: Pedregoso; →: Tendencia / Cobertura: SC: Sin cobertura; C: Centeno, G: Gramíneas; O: Orujo, N: Vegetación; (-): medianamente pobre; (--) pobre; (---) muy pobre; (+) medianamente abundante; (++) abundante; (+++) muy abundante / Herbicida: S/D: Sin datos

Todas las cajas se conservaron a temperatura (24°C) y fotoperiodo (16:8), por 7 días consecutivos (incubadora construida por el CONICET). Se observó diariamente la presencia de individuos muertos, los cuales fueron retirados y colocados por al menos 48h en cámara húmeda para favorecer emergencia de micelio y formación de conidios.

Los individuos que presentaron síntomas de infección y/o emersión del micelio fueron sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio al 1% v/v por 30 segundos para desinfectar la superficie y evitar la presencia de organismos saprófitos. Seguidamente, se seccionó cada individuo en dos mitades las cuales fueron colocadas en cajas de Petri de 5 cm de diámetro con medio Agar Papa Glucosado (APG) (agar 15 g.L⁻¹; caldo de papa 200 g.L⁻¹; glucosa 20 g.L⁻¹), con agregado de estreptomicina (50 mg.L⁻¹), y conservados a 24°C por un periodo de 10 días consecutivos. Posteriormente, se realizaron repiques sucesivos de las colonias obtenidas hasta garantizar la ausencia de posibles contaminantes.

Una vez obtenidas colonias puras, se procedió a realizar un cultivo monospórico de cada cepa aislada, para ello, se utilizó la técnica descrita por Cañedo y Ames (2004). Dicha técnica se basa en recoger directamente de las cajas de Petri los conidios y realizar una suspensión de los mismos en agua estéril con un tensioactivo (Tween80® al 0,1% v/v), para lo cual se colocó 1 mL del agua y tensioactivo y una pequeña porción de los conidios recogidos, se agitó en vortex® y se cuantificó en cámara de Neubauer la concentración de conidios por mL. Seguidamente se realizó una dilución de la suspensión, colocando 100 μ L de la misma en 900 μ L de agua estéril y tensioactivo. Se repitieron las diluciones hasta obtener una concentración menor a 100 conidios/mL. Seguidamente, se sembró la dilución final en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con medio APG con agregado de estreptomicina (50 mg.L⁻¹), las cuales se conservaron a la obscuridad a 24°C durante 96h. Finalmente, se observó bajo el microscopio estereoscópico bajo cámara de flujo laminar vertical la presencia de colonias, las cuales se repicaron a nuevas cajas de Petri con medio APG con agregado de estreptomicina (50 mg.L⁻¹) y se las conservaron a 24°C.

Obtención de aislados a partir de artrópodos infectados in vivo

El aislamiento de HE a partir de artrópodos infectados *in vivo* implica la búsqueda de individuos a campo que presenten síntomas o síndrome de infección. En los diferentes recorridos a campo para la recolección de muestras de suelo y/o material entomológico se procuró la búsqueda de individuos con las características antes mencionadas.

De encontrarse un individuo infectado, el mismo era conservado en un tubo plástico para colectas a campo con tapa de algodón. En laboratorio, se procedió a sumergir a los mismos en una solución de hipoclorito de sodio al 1% v/v por 30 segundos para desinfectar la superficie y evitar la presencia de organismos saprófitos. Seguidamente, se seccionó cada individuo en dos mitades las cuales fueron colocadas en cajas de Petri de 5 cm de diámetro con medio APG con agregado de estreptomicina (50 mg.L^{-1}), y conservados a 24°C por un periodo de 10 días consecutivos. Posteriormente, se realizaron repiques sucesivos de las colonias obtenidas hasta garantizar la ausencia de posibles contaminantes.

Una vez obtenidas colonias puras, se procedió a realizar un cultivo monospórico de cada cepa aislada, para ello, se utilizó la técnica descrita por Cañedo y Ames (2004). Dicha técnica se basa en recoger directamente de las cajas de Petri los conidios y realizar una suspensión de los mismos en agua estéril con un tensioactivo (Tween80® al 0,1% v/v), para lo cual se colocó 1 mL del agua y tensioactivo y una pequeña porción de los conidios recogidos, se agitó en vortex® y se cuantificó en cámara de Neubauer la concentración de conidios por mL. Seguidamente se realizó una dilución de la suspensión, colocando 100 μL de la misma en 900 μL de agua estéril y tensioactivo. Se repitieron las diluciones hasta obtener una concentración menor a 100 conidios/mL. Seguidamente, se sembró la dilución final en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con medio con agregado de estreptomicina (50 mg.L^{-1}), las cuales se conservaron a la obscuridad a 24°C durante 96h. Finalmente, se observó bajo el microscopio estereoscópico bajo cámara de flujo laminar vertical la presencia de colonias, las cuales se repicaron a nuevas cajas de Petri con medio APG con agregado de estreptomicina (50 mg.L^{-1}) y se las conservaron a 24°C .

Trazabilidad de las cepas aisladas

Se estableció una nomenclatura especial para el tratamiento y trazabilidad de las cepas aisladas. Una primera letra mayúscula correspondiente al género identificado (B: *Beauveria*, M: *Metarhizium*, P: *Paecilomyces*), seguida de la identificación de procedencia en inglés (“soil” para cepas aisladas de muestras de suelo e “ins” para aquellas aisladas directamente de artrópodos), la referencia del país “AR” y el código numérico compuesto de la zona de colecta y el punto de muestreo. La única excepción en la nomenclatura corresponde a la cepa denominada “ACA”, la cual fue la primera cepa aislada de un artrópodo y se registró en GenBank® con ese nombre.

1.3.2 Identificación de cepas aisladas

A modo ilustrativo, la Figura 19 resume los pasos empleados para la identificación de las especies aisladas.

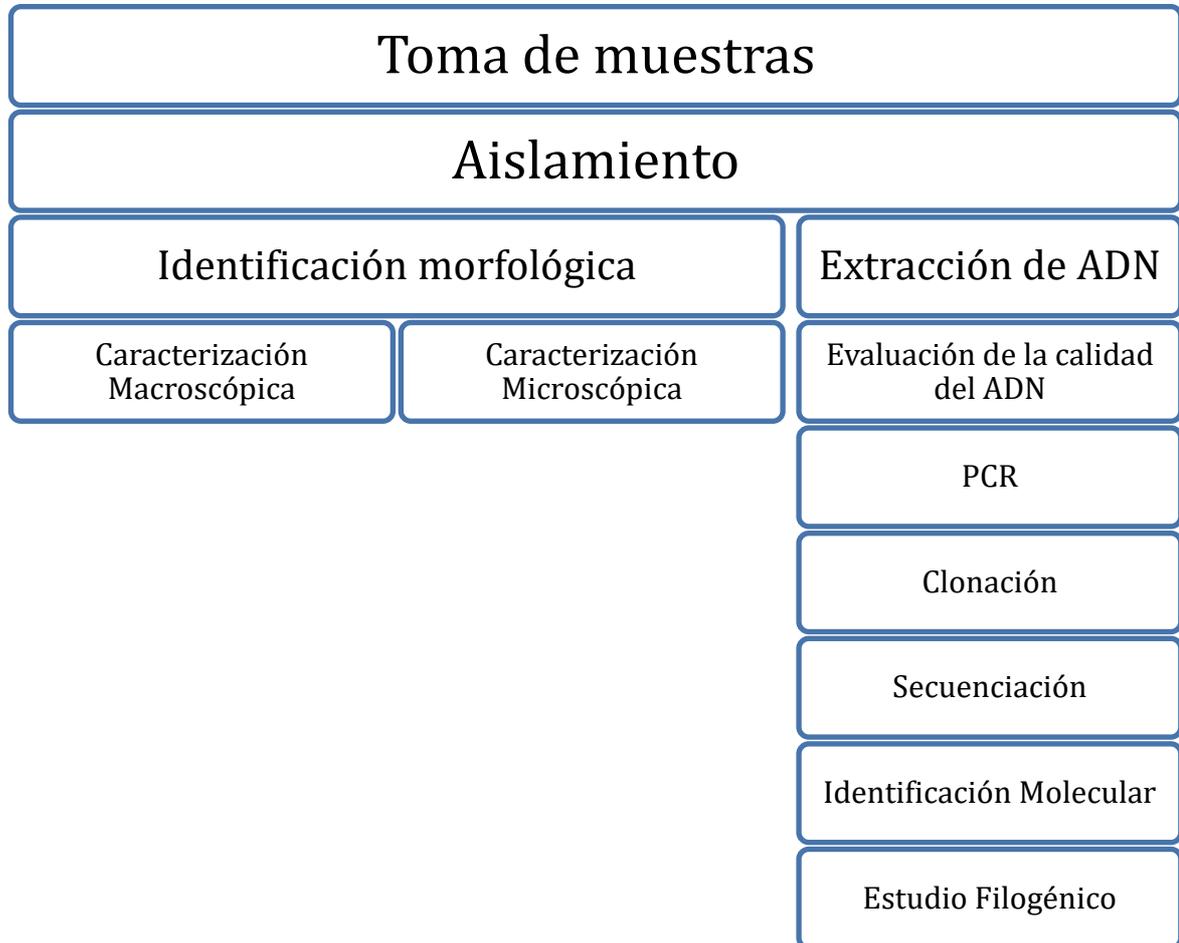


Figura 19: Esquema del procedimiento efectuado para la identificación de cepas de hongos entomopatógenos aislados

Identificación morfológica: caracterización micro y macroscópica

Todas las especies y sus cepas aisladas, tanto de muestras de suelo como de artrópodos infectados, fueron caracterizadas micro y macroscópicamente en el proceso de identificación del género fúngico al cual pertenecían.

Para la caracterización macroscópica, cada cepa fue repicada en una caja de Petri con medio APG con agregado de estreptomicina (50 mg.L⁻¹). Las cajas fueron incubadas a 24°C durante al menos 7 días consecutivos o hasta una superficie mayor a ½ de la caja de Petri. En todos los casos se caracterizaron las colonias por: color, aspecto, bordes tal como describe Humber (2005).

Respecto a la caracterización microscópica, el procedimiento empleado fue simplemente un montaje en tricolorante de Gueguen entre portaobjeto y cubreobjeto. Los montajes fueron observados en un microscopio Carl Zeiss® Axioplan® con una magnificación al 1000X, caracterizando a las cepas por el aspecto y tamaño de los conidios, disposición de los mismos y de sus conidióforos (Humber, 2005; Humber, 2012)

Identificación molecular

Extracción de ADN

Previa a la extracción de ADN, cada cepa monospórica obtenida fue repicada en microtubos de 1,5 mL con 500 µL de medio líquido papa glucosado (caldo de papa 200 g.L⁻¹; Glucosa 20 g.L⁻¹) e incubados durante 72 a 96 h a 24°C en cámaras de cultivo acondicionadas. Pasado el tiempo de incubación se observó cada microtubo para determinar desarrollo micelial. Seguidamente, los microtubos fueron centrifugados durante 10 minutos a 13.000 rpm eliminando el sobrenadante obtenido y conservando el pellet a -80°C en ultrafreezer por 3 h como mínimo. Los pellets conservados fueron liofilizados mediante un Liofilizador Christ® Alpha 1-4LD plus® por al menos 16 h continuas.

Para la extracción de ADN propiamente dicha se modificó la técnica de Zola y Pukkila (1986) sin la utilización de Proteinasa K. Los pellets liofilizados fueron lacerados mecánicamente por agitación mediante el uso de microesferas de vidrio (30 ciclos/segundo), y resuspendidos en buffer de extracción CTAB 1X precalentado a 65°C (2M Tris HCl pH 8; 0,7M ClNa; 0,5M EDTA; 13,7 mM CTAB y 1% m/v PVP-40). Los microtubos se colocaron a baño María a 65°C por 60 minutos agitando enérgicamente cada tubo en vortex® cada 10-20 minutos. Trascurrido el tiempo en baño María, se agregó a cada tubo 400 µL de Cloroformo-Isoamílico (24:1) agitando a 200 rpm durante 10 minutos. Seguidamente, los tubos se centrifugaron a 13.000 rpm a 4°C durante 10 minutos; se recuperaron los sobrenadantes transfiriendo cada uno a un nuevo microtubo rotulado junto con 330 µL de alcohol Isopropílico (98,5% v/v), y se conservaron a -24°C por 2h. Pasado el tiempo establecido, los microtubos se centrifugaron a 13.000 rpm a 4°C por 10 minutos eliminando los sobrenadantes. En el fondo de cada microtubo se formó un pellet de ADN el cual fue lavado mediante el agregado de 800 µL de alcohol etílico al 70% v/v y agitando suavemente a 200 rpm por 10 minutos. Posteriormente, los microtubos se centrifugaron a 13.000 rpm a 4°C durante 10 minutos eliminando los sobrenadantes. Los pellets fueron secados mediante el uso de un secador Speed Vac Concentrator® (Savant®) por 7 minutos, resuspendiendo el ADN en 50 µL de agua miliq®.

La calidad del ADN obtenido se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% m/v a 100 V por 35 minutos. Asimismo, la concentración ($ng.\mu L^{-1}$) y pureza (relación absorbancia 260/280) de cada ADN obtenido fue medida mediante espectrofotometría con un equipo Nanodrop®.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se evaluó la performance de 6 pares de *primers* (cebadores) en el ADN extraído del micelio de los aislamientos identificados como pertenecientes a los tres géneros de HE caracterizados morfológicamente. Se realizaron para cada par de *primer* tres ensayos: ADN extraído puro, una dilución en agua miliq de 10 veces el ADN extraído y una dilución en agua miliq de 100 veces el ADN extraído. Estos últimos ensayos se realizaron con el fin de poder evaluar la performance de cada cebador.

Para la amplificación de los espaciadores internos transcritos del ADN ribosomal (~600 pb) se utilizaron los *primer* ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') siguiendo las condiciones de termociclado descritas en la Tabla 3.

Tabla 3: Condiciones de termociclado para la amplificación de la región ADN ribosomal

ITS5/ITS4		
Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
94	4	
94	1	
55	1	35
72	2	
72	5	
4	∞	

Fuente: Informe Técnico 2014 del Departamento de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (México)

En cuanto a la amplificación de la región intergénica Bloc (~1500 pb) se utilizaron los *primers* B5.1F (5'-CGACCCGGCCAACACTTTGA-3') y B3.1R (5'-GTCTTCCAGTACCACTACGCC-3') siguiendo las condiciones de termociclado descritas en la Tabla 4.

Tabla 4: Condiciones de termociclado para la amplificación de la región intergénica Bloc

B5.1F/B3.1R		
Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)	Ciclos
94	120	
94	30	
56	30	35
72	120	
72	15 (minutos)	
4	∞	

Fuente: Informe Técnico 2014 del Departamento de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (México)

Asimismo, se evaluó la performance de la región RNA polimerasa II subunidad larga “a” (RPB1a) (~1400 pb) con los cebadores RPB1A (5'-GARTGYCCDGGDCAYTTYGG-3') y RPB1A_VH6R (5'-ATGACCCATCATRGAYTCCTTRTG-3'). Las condiciones de termociclado fueran las mismas que para la región intergénica Bloc (Tabla 4).

En la región RNA polimerasa II subunidad larva “b” (RPB1b) (~1500-1600 pb) se utilizaron los *primers* RPB1B_UVH6Fa (5'-CAYAAGGARTCYATGATGGGTCAT-3') y RPB1B_G2R (5'-GTCATYTGDTGCDGGYTCDCC-3'). En este caso en los primeros ciclos de elongación de la cadena se empleó la técnica de *Touchdown* con disminución de 1°C en la temperatura de apareamiento entre ciclos, según se describe en la Tabla 5.

Tabla 5: Condiciones de termociclado para la amplificación de la región RPB1b con Touchdown

RPB1B_UVH6Fa/RPB1B_G2R		
Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
94	2	
94	0,5	
66		
65		
64		
63		
62		
61	0,5	10
60		
59		
58		
57		
72	1	
94	0,5	
56	0,5	36
72	1	
72	10	
4	∞	

Fuente: Informe Técnico 2014 del Departamento de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (México)

Respecto a la región RNA polimerasa II segunda subunidad larga “a” (RPB2a) (~1200 pb) se realizó también mediante la técnica *Touchdown* en los primeros ciclos con los *primer* fRPB2_5F (5'-GAYGAYMGWGATCAYTTYGG-3') y RPB2:7cR (5'-CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT-3') siguiendo las condiciones de termociclado descritas en la Tabla 6.

Tabla 6: Condiciones de termociclado para la amplificación de la región RPB2a con Touchdown

fRPB2_5F/RPB2_7cR		
Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
94	2	
94	0,5	
60		
59		
58		
57		
56		
55	0,5	10
54		
53		
52		
51		
72	1	
94	0,5	
50	0,5	36
72	1	
72	10	
4	∞	

Fuente: Informe Técnico 2014 del Departamento de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (México)

Finalmente, se procedió a amplificar la región parcial de la secuencia de naturaleza conservada del factor de elongación 1-alfa (EF-1 α) (~1200 pb) mediante PCR *touchdown* en los ADN de las cepas caracterizadas dentro de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium*. En el caso del género *Beauveria* se utilizaron los *primers* 983F (5'-GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT-3') y 2218R (5'-ATGACACCRACRGCACRGTGTG-3') (Rehner y Buckley, 2005). Para el género *Metarhizium* los cebadores fueron EF1T (5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') y EF2T (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') (Bischoff *et al.*, 2009). Las condiciones de termociclado son las descritas en la Tabla 7.

Tabla 7: Condiciones de termociclado para la amplificación de la región (EF-1 α) con Touchdown

PCR touchdown región EF-1 α		
Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
94	2	
94	0,5	
66		
65		
64		
63		
62	0,5	9
61		
60		
59		
58		
57		
72	1	
94	0,5	
56	0,5	36
72	1	
72	10	
4	∞	

Fuente: Rehner y Buckley 2005

En todos los casos, las amplificaciones resultantes fueron evaluadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% m/v durante 35 minutos a 100 V.

Secuenciación

Todas las muestras tratadas fueron luego enviadas a secuenciar por Beckman Coulter Genomics® mediante el método de secuenciación Sanger. Se trataron las secuencias mediante el uso del programa MEGA 6.1® (Tamura *et al.*, 2013), removiendo los extremos de baja calidad que pudieran estar presentes (se verificaron esos extremos mediante los cromatogramas correspondientes). Finalmente, las secuencias tratadas se alinearon mediante el software CLUSTAL W® (Thompson *et al.*, 1994).

Estudios filogenéticos

A partir de las secuencias depuradas y alineadas, se procedió a realizar el estudio filogenético de las mismas en conjunto con secuencias obtenidas de la base de datos NCBI GenBank® con grados de similitud superiores al 99% y otras

pertenecientes a aislamientos del mismo género con menor grado de similitud (Tablas 9, 10 y 11). El estudio comprendió la construcción de un árbol de Neighbor-Joining construido por la técnica *Maximum Composite Likelihood* con el programa MEGA 6.1® (Tamura *et al.*, 2013). El gráfico resultante (*Bootstrap*) presentó ramificaciones con relaciones superiores al 70% en 2.000 réplicas. Se fijó como “raíz” (*root*) de cada *Bootstrap* la secuencia obtenida de NCBI GenBank® correspondiente a la fase que se considera perfecta (Teleomorfa) de cada género evaluado; en el caso del género *Beauveria* se fijó como raíz a *Cordyceps militaris* (HQ881020), para el género *Metarhizium* a la especie *Metacordyceps taii* (AB550734), finalmente para el género *Paecilomyces* se utilizó la especie *Cordyceps ningxiaensis* (NR137117).

Tabla 8: Lista de especies del género *Beauveria* utilizadas para el estudio filogenético de las cepas aisladas.

Código GenBank	Especie	Autores	Journal / Institución
HQ881006	<i>B. amorpha</i>	Rehner, S.A. <i>et al.</i>	Mycologia 103 (5), 1055-1073 (2011)
HQ881008	<i>B. amorpha</i>	Rehner, S.A. <i>et al.</i>	Mycologia 103 (5), 1055-1073 (2011)
HQ880994	<i>B. australis</i>	Rehner, S.A. <i>et al.</i>	Mycologia 103 (5), 1055-1073 (2011)
HQ880996	<i>B. australis</i>	Rehner, S.A. <i>et al.</i>	Mycologia 103 (5), 1055-1073 (2011)
KJ500423	<i>B. bassiana</i>	Rehner, S.A. <i>et al.</i>	Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, USA (2014)
EF193187	<i>B. bassiana</i>	Meyling, N.V. <i>et al.</i>	Insect Biocontrol Laboratory, USA (2006)
EF193185	<i>B. bassiana</i>	Meyling, N.V. <i>et al.</i>	Insect Biocontrol Laboratory, USA (2006)
JQ867149	<i>B. bassiana</i>	Cai, Y. & Huang, B.	Anhui Provincial Key Laboratory, Anhui Agr. Univer., China (2012)
AY883706	<i>B. bassiana</i>	Rehner, S.A. <i>et al.</i>	Insect Biocontrol Laboratory, USA (2004)
AY531965	<i>B. bassiana</i>	Rehner, S.A. & Buckley, E.	Mycologia 97 (1), 84-98 (2005)
FJ545732	<i>B. bassiana</i>	Marquez, M. <i>et al.</i>	Entomología Agrícola, U. de Córdoba, Spain (2008)
EF193180	<i>B. bassiana</i>	Meyling, N.V. <i>et al.</i>	Insect Biocontrol Laboratory, USA (2006)
AY883696	<i>B. bassiana</i>	Rehner, S.A. <i>et al.</i>	Insect Biocontrol Laboratory, USA (2004)
HQ880976	<i>B. brongniartii</i>	Rehner, S.A. <i>et al.</i>	Mycologia 103 (5), 1055-1073 (2011)
HQ880989	<i>B. brongniartii</i>	Rehner, S.A. <i>et al.</i>	Mycologia 103 (5), 1055-1073 (2011)
HQ880991	<i>B. brongniartii</i>	Rehner, S.A. <i>et al.</i>	Mycologia 103 (5), 1055-1073 (2011)
JN689371	<i>B. lii</i>	Zhang, S.L. <i>et al.</i>	Mycotaxon 121, 199-206 (2012)
HQ881002	<i>B. varroae</i>	Rehner, S.A. <i>et al.</i>	Mycologia 103 (5), 1055-1073 (2011)
LT220766	<i>B. varroae</i>	Sharma, L.	Departamento de Agronomia , UTAD, Portugal (2016)
HQ881020	<i>Cordyceps militaris</i>	Rehner, S.A. <i>et al.</i>	Mycologia 103 (5), 1055-1073 (2011)

Tabla 9: Lista de especies del género *Metarhizium* utilizadas para el estudio filogenético de las cepas aisladas.

Código GenBank	Especie	Autores	Journal / Institución
KC561893	<i>M. anisopliae</i>	Quan, Y. <i>et al.</i>	Guizhou Key Laboratory of Agricultural Biotechnology
KP027953	<i>M. anisopliae</i>	Rezende, J.M. <i>et al.</i>	Biocontrol (2015)
AB807793	<i>M. brunneum</i>	Nishi, O. <i>et al.</i>	Lett. Appl. Microbiol. 57(6):554-560 (2013)
KF233885	<i>M. brunneum</i>	Razinger, J. <i>et al.</i>	Agricultural Institute of Slovenia, Slovenia (2013)
KM391924	<i>M. brunneum</i>	Steinwender, B.M. <i>et al.</i>	J. Invertebr. Pathol. 123:6-12 (2014)
KM091888	<i>M. pinghaense</i>	Juliya, R.F. & Suresh, C.K.	No publicado
AB550717	<i>M. pinghaense</i>	Nishi, O. <i>et al.</i>	Appl. Entomol. Zool. (Jpn) 46:301-309 (2011)
KC561894	<i>M. pinghaense</i>	Quan, Y. <i>et al.</i>	Guizhou Key Laboratory of Agricultural Biotechnology
KC870072	<i>M. pinghaense</i>	Kirubakaran, S.A. <i>et al.</i>	No publicado
KC870067	<i>M. pinghaense</i>	Kirubakaran, S.A. <i>et al.</i>	No publicado
AB550713	<i>M. robertsii</i>	Nishi, O. <i>et al.</i>	Lett. Appl. Microbiol. 57(6):554-560 (2013)
KJ542151	<i>M. robertsii</i>	Steinwender, B.M. <i>et al.</i>	J. Invertebr. Pathol. 123:6-12 (2014)
KM391926	<i>M. robertsii</i>	Steinwender, B.M. <i>et al.</i>	J. Invertebr. Pathol. 123:6-12 (2014)
KP027974	<i>M. robertsii</i>	Rezende, J.M. <i>et al.</i>	Biocontrol (Dordrecht) (2015) in Press
KP027976	<i>M. robertsii</i>	Rezende, J.M. <i>et al.</i>	Biocontrol (Dordrecht) (2015) in Press
KP027978	<i>M. robertsii</i>	Rezende, J.M. <i>et al.</i>	Biocontrol (Dordrecht) (2015) in Press
KP178555	<i>M. robertsii</i>	Kepler, R.M. <i>et al.</i>	Environ. Microbiol. 17(8):2791-2804 (2015)
AB807797	<i>Metacordyceps taii</i>	Nishi, O. <i>et al.</i>	Lett. Appl. Microbiol. 57(6):554-560 (2013)

Tabla 10: Lista de especies utilizadas para el estudio filogenético de las cepas aisladas del género *Paecilomyces*.

Código GenBank	Especie	Autores	Journal / Institución
GU979977	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Ridkaew, R. <i>et al.</i>	Phylogenetics Laboratory, NCGEB, Khlong Luang, Thailand
GU979987	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Ridkaew, R. <i>et al.</i>	Phylogenetics Laboratory, NCGEB, Khlong Luang, Thailand
FR734158	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Perdomo, H. <i>et al.</i>	Unitat de Microbiologia, Universitat Rovira i Virgili, Spain
FR734150	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Perdomo, H. <i>et al.</i>	Unitat de Microbiologia, Universitat Rovira i Virgili, Spain
LC008342	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Ban, S. <i>et al.</i>	National Institute of Technology and Evaluation, Kisarazu, Japan
EF468790	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Sung, G.H. <i>et al.</i>	Stud. Mycol. 57:5-59 (2007)
AY526477	<i>Paecilomyces variotii</i>	Luangsa.ard, J.J.D <i>et al.</i>	Mycologia 96(4):773-780 (2004)
AY526475	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Luangsa.ard, J.J.D <i>et al.</i>	Mycologia 96(4):773-780 (2004)
AY526470	<i>Paecilomyces ghanensis</i>	Luangsa.ard, J.J.D <i>et al.</i>	Mycologia 96(4):773-780 (2004)
DQ522559	<i>Isaria tenuipes</i>	Spatafora, J.W. <i>et al.</i>	Mol. Ecol. 16(8):1701-1711 (2007)
EF468989	<i>Paecilomyces carneus</i>	Sung, G.H. <i>et al.</i>	Stud. Mycol. 57:5-59 (2007)
AY526474	<i>Paecilomyces farinosus</i>	Luangsa.ard, J.J.D <i>et al.</i>	Mycologia 96(4):773-780 (2004)
GU980023	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Ridkaew, R. <i>et al.</i>	Phylogenetics Laboratory, NCGEB, Khlong Luang, Thailand
HQ842818	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Luangsa.ard, J.J.D <i>et al.</i>	FEMS Microbiol. Lett. 321(2):141-149 (2011)
HQ842825	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Luangsa.ard, J.J.D <i>et al.</i>	FEMS Microbiol. Lett. 321(2):141-149 (2011)
JF896088	<i>Isaria takamizusanen</i>	Luangsa.ard, J.J.D <i>et al.</i>	FEMS Microbiol. Lett. 321(2):141-149 (2011)
NR137117	<i>Cordyceps ningxiaensis</i>	Bau, T. y Yan, J.Q.	Nova Hedwigia 100(1-2):251-258 (2015)

1.4 Resultados

1.4.1 Aislamiento de hongos entomopatógenos

Aislamiento a partir de suelos vitícolas

De las muestras obtenidas a campo, se pudieron aislar un total de 27 cepas fúngicas tal cual figura en la Tabla 11.

Los cultivos “Testigo” (suelo tamizado estéril), no presentaron sintomatología de afección fúngica. Una vez las larvas sucumbían por inanición, se observaba, generalmente, la presencia de hongos saprófitos de los géneros: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus*.

Ciertas cajas de Petri con muestras de suelo presentaron larvas infectadas con hongos del género *Fusarium*. Este género está citado como agente entomopatógeno, pero dado su carácter de fitopatógeno, no fue considerado como resultado positivo.

Las muestras de suelo de la zona 19 presentaron 100% de mortandad de las larvas en ausencia de síndrome. Esta particularidad, donde las larvas recién muertas no mostraban sintomatología típica de afecciones fúngicas, hizo suponer la presencia de algún agroquímico en la muestra. Se consultó al productor de donde se extrajo el suelo, quien informara la utilización de Clorpirifos para el control de formícidos. Dicha información no fue señalada al momento de la toma de muestras.

No se observó diferencia estadística ($p > 0,05$) en la presencia de cepas entomopatógenas respecto a las prácticas agrícolas empleadas: riego por goteo o superficial, suelo descubierto o presencia de verdeo (permanente o temporario).

Tabla 11: Resultados de aislamientos de cepas a partir de muestras de suelos vitícolas

Zona	Provincia	Departamento	Localidad	Presencia	Nº cepas
1	Mendoza	Las Heras	El Algarrobal	Negativo	0
2	Mendoza	Luján de Cuyo	Las Compuertas	Positivo	5
3	Mendoza	Luján de Cuyo	Vistalba	Negativo	0
4	Mendoza	Luján de Cuyo	Perdriel	Positivo	3
5	San Juan	San Martín	San Martín	Negativo	0
6	San Juan	San Martín	San Martín	Negativo	0
7	San Juan	Caucete	Caucete	Negativo	0
8	San Juan	Caucete	Caucete	Negativo	0
9	San Juan	25 de Mayo	25 de Mayo	Negativo	0
10	Salta	Cafayate	Cafayate	Positivo	1
11	Salta	Cafayate	Cafayate	Negativo	0
12	Salta	Cafayate	Cafayate	Negativo	0
13	Salta	Cafayate	Tolombón	Negativo	0
14	Salta	Cafayate	Tolombón	Positivo	1
15	Salta	Cafayate	Tolombón	Positivo	3
16	La Rioja	Chilecito	Tilimuqui	Positivo	6
17	La Rioja	Chilecito	Malligasta	Positivo	5
18	La Rioja	Chilecito	Anguinar	Positivo	2
19	La Rioja	Chilecito	Nonogasta	Negativo	0
20	La Rioja	Chilecito	Vichigasta	Negativo	0
21	Catamarca	Tinogasta	Tinogasta	Negativo	0
22	Neuquén	Confluencia	San Patricio	Negativo	0
23	Neuquén	Confluencia	San Patricio	Negativo	0
24	Neuquén	Confluencia	San Patricio	Positivo	1
25	Río Negro	Gral. Roca	Peñas Blancas	Negativo	0
26	Río Negro	Gral. Roca	Peñas Blancas	Negativo	0
27	Río Negro	Gral. Roca	Gral. Roca	Negativo	0
28	Río Negro	Gral. Roca	Gral. Roca	Negativo	0
29	Río Negro	Gral. Roca	Gral. Roca	Negativo	0

Aislamiento a partir de artrópodos infestados in vivo

A partir de los relevamientos de artrópodos que pudieran presentar sintomatología de afección por HE por afección natural (Tabla 12), se lograron aislar 3 cepas del género *Beauveria*.

Tabla 12: Resultados de aislamientos de cepas a partir de artrópodos

Artrópodo/Orden	Provincia	Localidad	Latitud	Longitud
<i>Tetranychus urticae</i>	Mendoza	Chacras de Coria	S32 50.272	O68 45.934
<i>Naupactus xanthographus</i>	Mendoza	Chacras de Coria	S33 00.261	O68 52.398
Cicadidae	Jujuy	Ingenio Ledesma	S23 49.130	O64 47.250

1.4.2 Identificación de las especies y de sus cepas aisladas

Identificación morfológica: caracterización micro y macroscópica

Tanto las cepas aisladas de suelos como aquellas obtenidas a partir de aislamientos de artrópodos, se dividieron en tres grupos.

El primer grupo, perteneciente al género *Beauveria*, presentaba macroscópicamente colonias circulares de color blanquecinas, bordes definidos y aspecto algodonoso compacto (Figura 20 A). Microscópicamente, se observaban conidios semiesféricos a elípticos incoloros dispuestos en zigzag (Figura 20 B y C) sobre el conidióforo con base en forma de botella. Los conidios presentaban un largo medio de 2,3 μm (1,17 – 3,45 μm), un ancho medio de 1,84 μm (1,08 – 2,81 μm) y una relación media entre largo y ancho de 1,23 (0,86 – 1,75).

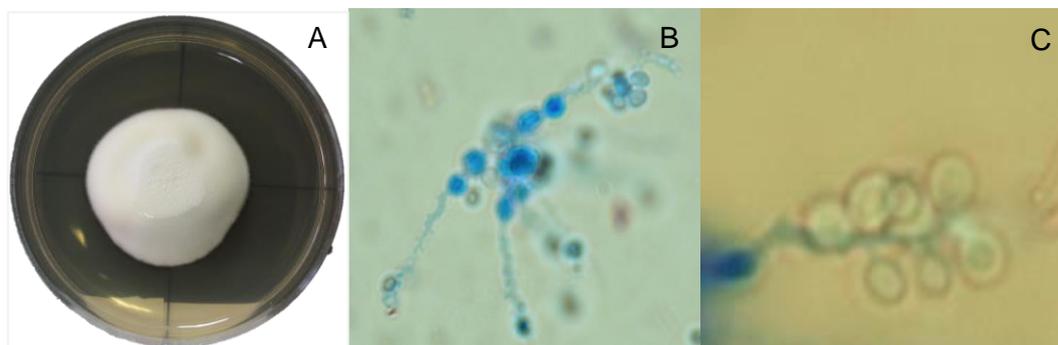


Figura 20: Aspectos macroscópicos y microscópicos de las cepas correspondientes al primer grupo. (A) detalle de la colonia; (B) detalle del conidióforo (1000X); aumento digital detalle disposición zigzag de los conidios sobre el conidióforo con base en botella.

El segundo grupo, perteneciente al género *Metarhizium*, presentaba macroscópicamente colonias circulares de color verde oliva, bordes poco definidos e irregulares y aspecto algodonoso laxo (Figura 21 A). Microscópicamente, se observaban conidios ovoides alargados verde oliva dispuestos en cadena densas de forma basípeta sobre conidióforos hialinos (Figura 21 B). Los conidios presentaban un largo medio de 6,58 μm (5,12 – 8,58 μm), un ancho medio de 2,65 μm (1,68 – 3,53 μm) y una relación media entre largo y ancho de 2,51 (1,82 – 3,78).

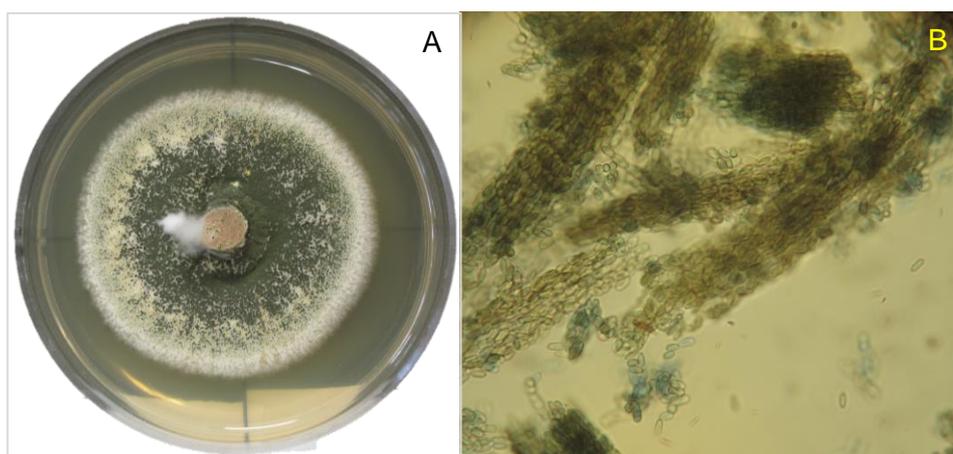


Figura 21: Aspectos macroscópicos y microscópicos de las cepas correspondientes al segundo grupo. (A) detalle de la colonia; (B) detalle de la masa de conidios dispuestos en cadena (100X).

El tercer grupo, perteneciente al género *Paecilomyces*, presentaba macroscópicamente colonias circulares de color rosa mate, bordes poco definidos y aspecto pulverulento (Figura 22 A). Microscópicamente, se observaban conidios semiesféricos a esféricos dispuestos en cadena laxas sobre conidióforos hialinos con fiálide extendida (Figura 22 B). Los conidios presentaban un largo medio de 2,1 μm (2 – 3,5 μm), un ancho medio de 3,2 μm (2,5 – 4,5 μm) y una relación media entre largo y ancho de 1,19 (0,55 – 2,1).

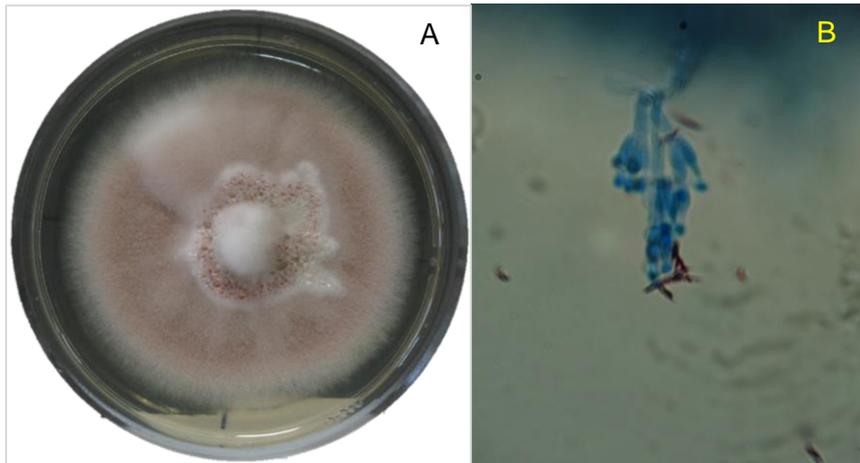


Figura 22: Aspectos macroscópicos y microscópicos de las cepas correspondientes al tercer grupo. (A) detalle de la colonia; (B) detalle de los conidióforos con fiálides extendidas (100X).

En la figura 23 se pueden observar larvas de *L. botrana* afectadas por cada género fúngico aislado.



Figura 23: Larvas de *L. botrana* utilizadas en la técnica de insecto trampa para el aislamiento de hongos entomopatógenos a partir de muestras de suelos. (A) Primer grupo *Beauveria*; (B) Segundo grupo *Metarhizium*; (C) Tercer grupo *Paecilomyces*.

A partir de las caracterizaciones macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas de suelos, se pudo realizar una clasificación según su zona de recolección (Tabla 13).

Tabla 13: clasificación del número de cepas aisladas de muestras de suelos vitícolas en función a los grupos morfológicos identificados

Zona	Provincia	Departamento	Localidad	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
2	Mendoza	Luján de Cuyo	Las Compuertas	0	4	1
4	Mendoza	Luján de Cuyo	Perdriel	1	1	1
10	Salta	Cafayate	Cafayate	0	1	0
14	Salta	Cafayate	Tolombón	0	1	0
15	Salta	Cafayate	Tolombón	0	3	0
16	La Rioja	Chilecito	Tilimuqui	0	6	0
17	La Rioja	Chilecito	Malligasta	0	5	0
18	La Rioja	Chilecito	Anguinar	0	2	0
24	Neuquén	Confluencia	San Patricio	0	0	1

Identificación molecular

El protocolo de Zola y Pukkila (1986) modificado, resultó ser una técnica adaptada para la extracción de ADN total de todas las muestras tratadas. Las relaciones de absorbancia 260/280 fueron próximas a 2, lo cual muestra que la técnica además de ser sencilla de ejecutar proporciona resultados de calidad (Figura 24).

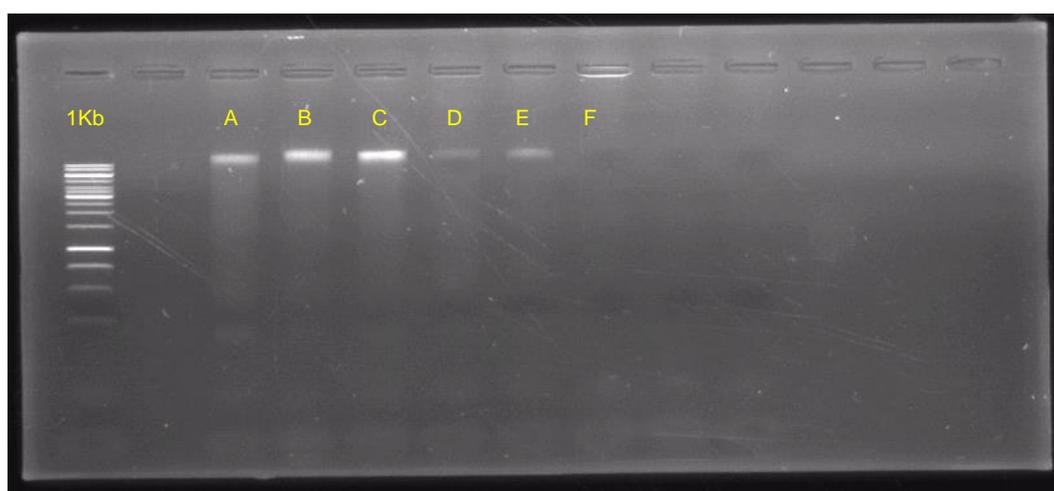


Figura 24: Ejemplo de una fotografía con el resultado de electroforesis sobre gel de agarosa con una muestra del ADN total de algunas de las cepas aisladas. (A) PsoilAR4.1(2); (B) MsoilAR4.3; (C) MsoilAR2.5(2); (D) BinsAR1; (E) BinsAR2; (F) Testigo

Del estudio de la performance de los 6 pares de *primers* utilizados se pudo observar que:

- El par de *primers* utilizado para amplificar la región ITS mostró resultados positivos para los tres grupos morfológicos de hongos entomopatógenos aislados, mismo a diluciones de 100 veces la concentración de ADN extraída.
- El par de *primers* utilizado para amplificar la región BLOC arrojó resultados positivos solamente en los grupos morfológicos 1 y 2 cuando la concentración de ADN extraída era pura o hasta una dilución de 10 veces de la concentración pura.
- El par de *primers* utilizado para amplificar la región RPB1a no mostró resultados positivos para ninguno de los grupos morfológicos de hongos entomopatógenos aislados.
- El par de *primers* utilizado para amplificar la región RPB2a mostró resultados positivos para dos cepas del grupo morfológico 1, solamente cuando se trabajó con una concentración de ADN extraído puro.
- El par de *primers* utilizado para amplificar la región RPB1b solamente arrojó resultados positivos para los aislados pertenecientes al grupo morfológico 1.
- El par de *primers* utilizado para amplificar la región EF-1 α mostró resultados positivos para los grupos morfológicos 1 y 2, mismo a diluciones de 100 veces la concentración de ADN extraída.

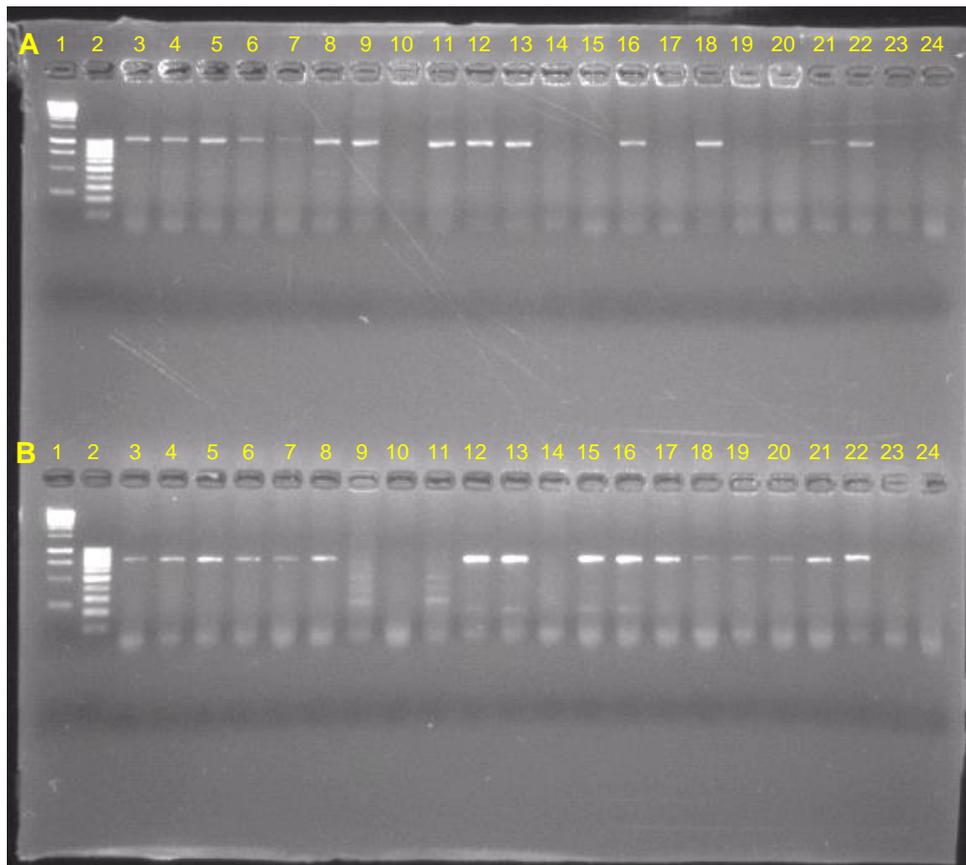


Figura 25: Ejemplo de una fotografía con el resultado de electroforesis sobre gel de agarosa de la reacción PCR para (A) EF-1 α para *Beauveria*; (B) EF-1 α para *Metarhizium*. 1. 1Kb, 2. 100bp, 3. ACA, 4. RINCO, 5. BinsAR1, 6. CCH, 7. BinsAR2, 8. BsoilAR4.1(2), 9 a 11. Cepas francesas, 12. MsoilAR2.5(2), 13. MsoilAR2.3(1), 14. PsoilAR24.3, 15. MsoilAR18.5(3), 16. MsoilAR2.3(2), 17. MsoilAR18.5(2), 18. MsoilAR2.3(4), 19. MsoilAR4.3, 20. MsoilAR14.3, 21. MsoilAR15.1, 22. Cepa francesa, 23. Psoil2.3(4) y 24. Blanco. Las cepas francesas presentes en esta imagen no forman parte de la presente Tesis.

Estudios filogenéticos

Con los resultados obtenidos de las secuenciaciones realizadas por Beckman Coulter Genomics© y el análisis BLAST® realizado para cada cepa se pudo establecer el género taxonómico de cada grupo morfológico aislado.

Para el primer grupo morfológico, el género identificado fue *Beauveria* (Sordariomycetes: Hypocreales: Cordycipitaceae), el segundo grupo morfológico correspondió al género *Metarhizium* (Sordariomycetes: Hypocreales: Clavicipitaceae) y el tercer grupo morfológico al género *Paecilomyces* (Sordariomycetes: Hypocreales: Clavicipitaceae).

Respecto a los gráficos *Bootstrap* realizados para cada género en función a las secuencias obtenidas en GenBank® (Tablas 8, 9 y 10), los resultados obtenidos son los que aparecen en las Figuras 26, 27 y 28.

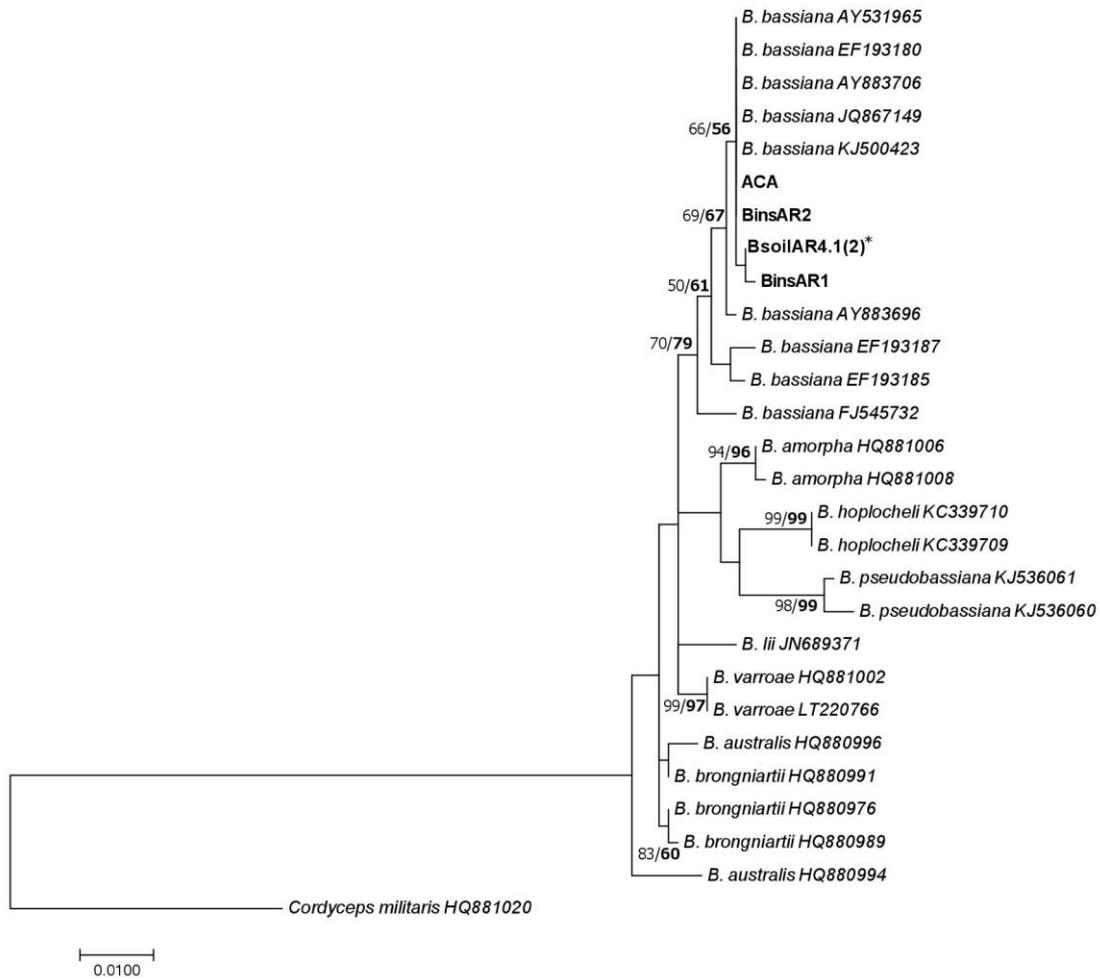


Figura 26: *Bootstrap* obtenido del análisis de Maximum Likelihood para las cepas aisladas del género *Beauveria*. Los valores en las ramificaciones corresponden a Maximum Likelihood y Maximum Parsimony (en negrita) (≥ 60). La cepa marcada con asterisco indica origen de muestra de suelo.

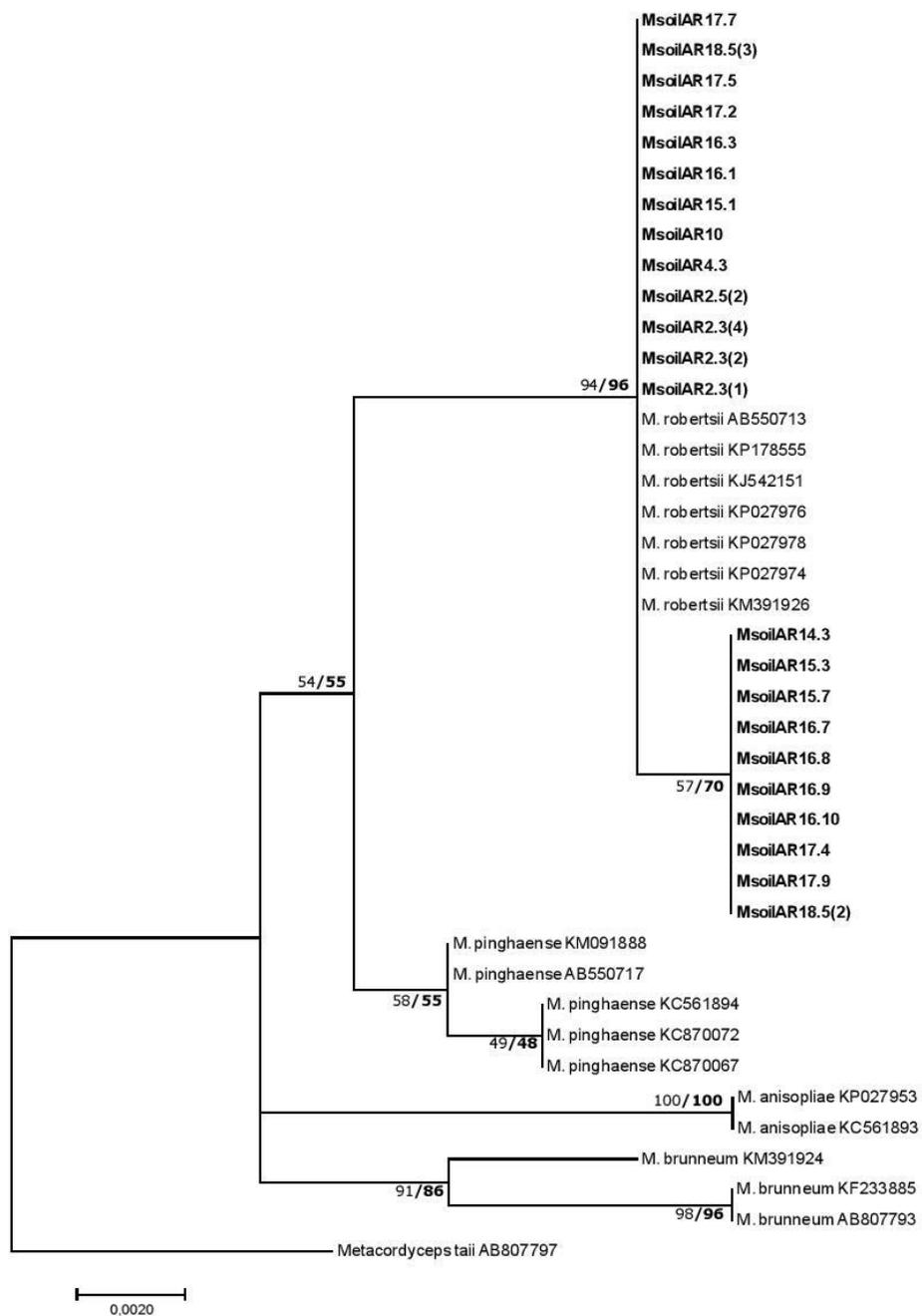


Figura 27: *Bootstrap* obtenido del análisis de Maximum Likelihood para las cepas aisladas del género *Metarhizium*. Los valores en las ramificaciones corresponden a Maximum Likelihood y Maximum Parsimony (en negrita) (≥60)

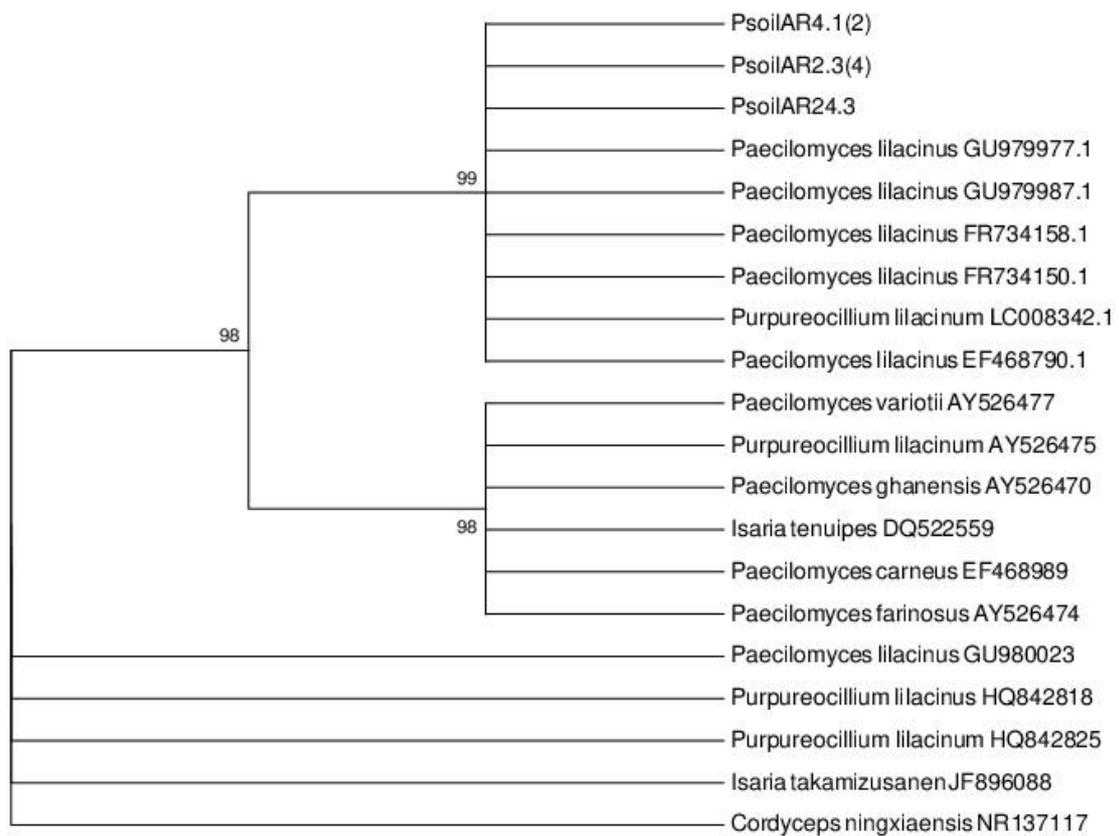


Figura 28: *Bootstrap* obtenido del análisis de Neighbor-Joining por la técnica *Maximum Composite Likelihood* con ramificaciones mayores al 70% para las cepas aisladas del género *Paecilomyces*.

1.5 Discusión

Mucho se ha podido esclarecer en estos últimos años sobre los aspectos ecológicos de los HE gracias al considerable incremento en el uso de técnicas moleculares (Enkerli y Widmer, 2010). El empleo de esta herramienta proveyó de nuevas vías de investigación y permitió descifrar ciclos de vida, ocurrencias naturales e interacciones entre los HE y los factores ambientales (Enkerli y Widmer, 2010). Asimismo, Quesada-Moraga *et al.* (2007) plantean que el aislamiento de HE nativos de una región no solo provee datos sobre la distribución, ocurrencia y biodiversidad de estos microorganismos, sino que también ofrece un reservorio de potenciales agentes de biocontrol de plagas agrícolas. Toda esta nueva información es esencial y necesaria para profundizar el entendimiento de la diversidad genética y la estructura de las comunidades de las especies entomopatógenas presentes en un agroecosistema, para entonces así poder desarrollar y proponer nuevas alternativas en el control de plagas (Steinwener *et al.*, 2014).

A partir del muestreo realizado a lo largo de los casi 1945 km transcurridos en las principales áreas vitícolas del Oeste argentino (180 submuestras de suelos y recolección de artrópodos infectados), se pudo caracterizar a las especies de HE encontradas en los agroecosistemas mediante criterios morfológicos y genéticos.

La mayoría de las cepas de las especies entomopatógenas nativas aisladas fueron las pertenecientes al segundo grupo morfológico (77% - 23 de un total de 30 cepas) las cuales se identificaron mediante las observaciones macro y microscópicas dentro del género *Metarhizium*. Como describe Humber (2012) en sus claves, se observaron conidióforos ramificados con ápices cónicos conformando un himenio denso en el cual se encontraban los conidios cilíndricos a ovoides en largas cadenas unidas entre si por sus laterales cual columnas. La coloración de las columnas de conidios vario del ver oliva a un amarillo verdoso (Padilla-Melo *et al.*, 2000). La predominancia del género *Metarhizium* en los agroecosistemas vitícolas argentinos es consistente con los resultados obtenidos en estudios previos, donde se reporta una mayor abundancia de este género en los suelos agrícolas en comparación con suelos no utilizados para la agricultura en la misma región (Steinwener *et al.*, 2014).

Al igual que en otros géneros de la Clase Hyphomycetes, las especies de *Metarhizium* son difíciles de distinguir morfológicamente (Rehner y Buckley, 2005; Tsui *et al.*, 2006). Esta similitud morfológica entre cepas de *Metarhizium* íntimamente relacionadas y otras especies emparentadas se asemeja a lo que Taylor y Berbee (2006) describen como una posible ocurrencia de aislamiento

reproductivo y por ende una divergencia genética, lo cual sería la causante de los cambios morfológicos. El uso de herramientas y análisis moleculares es considerado como la más fiable técnica de aproximación para diferenciar entre especies dentro de un grupo taxonómico. A partir de los resultados obtenidos por el uso de los cebadores del factor de elongación 1-alfa, las 23 cepas aisladas de *Metarhizium* fueron identificadas como *Metarhizium robertsii*. Esta prevalencia de la especie *M. robertsii* es también concordante con los resultados obtenidos en Canadá por Bidochka *et al.* (2001) y Bidochka y Small (2005), donde esta especie fue la más frecuente en los suelos agrícolas. Sin embargo, en suelos agrícolas y borduras verdes de Dinamarca la situación descrita fue diferente, con la coocurrencia de al menos cuatro especies del género *Metarhizium*: *M. brunneum* fue el más frecuente (78,8%), *M. majus* y *M. flavoviride* los menos frecuentes (3,3% cada uno) y *M. robertsii* sólo representó un 14.6% del total (Steinwener *et al.*, 2014).

Respecto a la evaluación de la performance de los cebadores utilizados, los resultados obtenidos son coincidentes con otros estudios realizados, como los de Kepler *et al.* (2014) quienes remarcan que, si bien los *primers* ITS muestra resultados positivos en la amplificación de los espacios transcritos de las subunidades ribosomales, estos son muy poco variables como para mostrar diferencias dentro del grupo taxonómico. Lo mismo ocurriría con los otros cebadores evaluados, siendo el factor de elongación de la subunidad 1-alfa el único lo suficientemente robusto como para mostrar diferencias en el estudio filogenético.

En cuanto a las cepas pertenecientes al primer grupo morfológico (13% - 4 de un total de 30 cepas), las mismas fueron identificadas a partir de las observaciones macro y microscópicas dentro del género *Beauveria*. Humber (2005) describe a la principal característica morfológica del género como la presencia de conidios en zigzag (simpodulosporas), lo cual fue observado microscópicamente en todas las cepas del grupo 1.

La presencia de este género en el muestreo realizado se soporta de la hipótesis de ser un género ampliamente distribuido geográficamente, como así también, ser un género de los hyphomycetes entomopatógenos edáficos que mayor interés presenta como modelo para el control de especies plaga (Bidochka y Khachatourians, 1991; Rehner y Buckley, 2005). En cuanto a su presencia en suelos agrícolas, El Kichaoui *et al.* (2017) informaron haber aislado especies de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* a partir de colectas de insectos infectados y muestreos de suelos en plantaciones de palmas en Gaza, donde las características edafo-climáticas podrían considerarse como similares a las presentes en los viñedos del Oeste argentino. Sin embargo, la presencia y distribución de estos dos géneros en

suelos agrícolas es muy variable. Meyling y Eilenberg (2006, 2007) observaron que tanto la distribución de *Beauveria* y *Metarhizium*, como sus dinámicas poblacionales, se encuentran muy relacionadas a las prácticas agrícolas. El uso de agroquímicos, los laboreos de suelo y las rotaciones de cultivos juegan un rol primordial como factores preponderantes en la presencia de estos hongos. Los mismos autores concuerdan que *Metarhizium* posee mayor plasticidad a las prácticas agrícolas que el género *Beauveria*, razón por la cual es más frecuente su presencia en los agroecosistemas. Asimismo, Quesada-Moraga *et al.* (2007) plantean que no pudieron observar efectos significativos entre el hábitat y la presencia de *B. bassiana*, pero sí una fuerte asociación entre la presencia de *M. anisopliae* y los suelos cultivados. Los mismos autores establecen que existiría una predominancia de *B. bassiana* en suelos con alto contenido en arcilla, alto pH y bajo contenido de materia orgánica, aunque Asensio *et al.* (2003) establecen que no observaron diferencias significativas respecto a las características fisicoquímicas del suelo. Respecto a los modelos de prácticas culturales, Klingen *et al.* (2002) observaron que cuando se compara la ocurrencia de HE edáficos en un cultivo convencional y uno orgánico, la presencia es mayor en los suelos laboreados de las prácticas orgánicas. Sin embargo, los autores destacan que no se puede observar diferencia alguna en la ocurrencia de los HE sobre las borduras, sin importar el modelo agrícola empleado.

En lo que respecta a la diferenciación de especies dentro del género *Beauveria*, se han propuesto varias técnicas. En algunas ocasiones las diferencias entre las especies son más marcadas, pero en la mayoría de los casos estas variantes son muy sutiles y se vuelven imposible distinguirlas (Rehner *et al.*, 2011; Oda *et al.*, 2014). Esta dificultad es atribuible a la existencia de un complejo de especies del género *Beauveria*, donde el reconocimiento es difícil debido a la falta de información de las características taxonómicas. Ante dicha dificultad, los factores de elongación 1-alfa utilizados fueron lo suficientemente robustos para diferenciar a las cepas aisladas de otras especies de *Beauveria* presentes en el banco genético GenBank®. Todas las cepas encontradas correspondieron a la especie *Beauveria bassiana*. Al igual que en caso del género *Metarhizium*, Rehner *et al.* (2011) coinciden en que, si bien los cebadores ITS utilizados arrojan resultados positivos en la reacción PCR, la información que otorga el fragmento replicado es limitada, mostrando dificultades en los alineamientos de los pares de base tanto intra como extra-grupo, lo cual genera ambigüedad en los estudios filogenéticos. Este planteo de la falta de robustez por parte de los cebadores ITS es ya presentada por Rehner y Buckley en 2005. A excepción del primer EF-1-alfa, los otros cebadores evaluados en el presente capítulo y que dieron positivo para la amplificación de la zona génica

de interés en *Beauveria*, tampoco resultaron lo suficientemente robustos para mostrar las diferencias intragénero.

El tercer grupo morfológico y menos frecuente (10% - 3 cepas de un total de 30), mostro características macro y microscópicas similares a las especies pertenecientes al género *Paecilomyces*. Humber (2005), describe como distintivo del género, la presencia de conidióforos con forma de botellas y cuellos extendidos (fiálides) donde los conidios globosos a alimonados se disponen en cadenas laxas muy frágiles. La coloración de las colonias es también distintiva del género, teniendo al color rosa mate como la pigmentación por excelencia, aunque pueden presentarse casos diferentes. En este caso, los cebadores ITS 4 y 5 no fueron lo suficientemente robustos para diferenciar las secuencias de ADN obtenidas de otras secuencias similares presentes en GenBank®. El análisis BLAST® de GenBank® arrojó que las 3 cepas aisladas poseen gran similitud con la especie *Paecilomyces lilacinus*. Sin embargo, estudios filogenéticos como los realizados por Luangsa-ard *et al.* (2004, 2011) proponen al género *Purpureocillium* como el más adecuado para la especie, denominándola como *Purpureocillium lilacinum*, tomándose a *Paecilomyces* como una posible sinonimia. Humber (2005, 2012) plantea a *Isaria* como otra sinonimia del género. Aún, los conocimientos sobre este género fúngico no están del todo desarrollado, por ello ensayos con factores de elongación 1-alfa adecuados a la especie serían necesarios, tendiendo a incrementar la robustez en los árboles filogenéticos realizados y así poder observar si existen diferencias entre las cepas aisladas.

1.6 Bibliografía

- Asensio, L.; Carbonell, T.; López-Jiménez, J.A.; López-Llorca, L. 2003. Entomopathogenic fungi in soils from Alicante province. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1(3):37-45.
- Ban, S.; Azuma, Y.; Sato, H.; Suzuki, K.; Nakagiri, A. 2014. Inducing teleomorph and DNA sequencing of *Isaria takamizusanensis*. (Sin publicar) *National Institute of Technology and Evaluation*, NITE Biological Resource Center, Chiba, Japón.
- Bau, T. y Yan, J.Q. 2015. *Cordyceps ningxiaensis* sp. nov., a new species from dipteran pupae in Ningxia Hui Autonomous Region of China. *Nova Hedwigia*, 100(1-2):251-258.
- Bidochka, M.J. y Khachatourians, G.G. 1991. The implication of metabolic acids produced by *Beauveria bassiana* in pathogenesis of migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 58(1):106-117.
- Bidochka, M.J.; Kamp, A.M.; Lavender, T.M.; Dekoning, J.; Amritha de Croos, J.N. 2001. Habitat Association in Two Genetic Groups of the Insect-Pathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*: Uncovering Cryptic Species? *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1335-1342.2001>
- Bidochka, M.J. y Small, C.L. 2005. Phylogrography of *Metarhizium*, an Insect Pathogenic Fungus, en: Vega, F.E. and Blackwell, M. (Eds.) *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution*, Oxford University Press, New York, pp. 28-50.
- Bischoff, J.F.; Rehner, S.A.; Humber, R.A. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4):512-530.
- Cai, Y. y Huang, B. 2012. Phylogenetic analysis of *Beauveria* sp. isolated from China. (Sin publicar) *Anhui Provincial Key Laboratory*, Anhui Agricultural University, China.
- Cañedo, V. y Ames, T. 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. *Centro Internacional de la Papa (CIP)*, ISBN 92-9060-238-4.
- El Kichaoui, A.Y.; Abu Asaker, B.A.; El-Hindi, M.W. 2017. Isolation, Molecular Identification and under Lab Evaluation of Entomopathogenic Fungi *M. anisopliae* and *B. bassiana* against the Red Palm Weevil *R. furrigenus* in Gaza Strip. *Advances in Microbiology*, 7:109-124.
- Enkerli, J. y Widmer, F. 2010. Molecular ecology of fungal entomopathogens: molecular genetic tools and their application in populations and fate studies. *BioControl*, 55:17-37.
- Goettel, M.S.; Eilenberg, J.; Glare, T. 2011. Entomopathogenic Fungi and their Role

- in Regulation of Insect Populations. En: Insect control: biological and synthetic agents. Gilbert, L.I. y Gill, A.A. (Eds.) *Academic Press*. Capítulo 11, pp. 387-431.
- Hasan, W.A.; Assaf, L.H.; Abdullah, S.K. 2012. Occurrence of entomopathogenic and other opportunistic fungi in soil collected from insect hibernation sites and evaluation of their entomopathogenic potential. *Bull, Iraq nat. Hist. Mus.* 12(1):19-27.
- Humber, R.A. 2005. Entomopathogenic fungal identification. Disponible en USDA, <https://www.ars.usda.gov/ARSTUserFiles/80620520/apswkshoprev.pdf> (visto el 22 de Junio de 2015).
- Humber, R.A. 2012. Identification of entomopathogenic fungi. En: Lacey, L.A. (Ed.) *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, 2^{da} edición, Academic Press (Elsevier) Londres, pp. 151-186.
- Inglis, G.D.; Enjerli, J.; Goettel, M.S. 2012. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. En: Lacey, L.A. (Ed.) *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, 2^{da} edición, Academic Press (Elsevier) Londres, pp. 189-251.
- Jaronski, S.T. 2007. Soil ecology of the entomopathogenic Ascomycetes: A critical examination of what we (think) we know. En *Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management*, Ekesi, S. y Maniania, N.K. (Eds), Research Signpost, India, pp. 1-52.
- Juliya, R.F. y Sureshm C.K. 2014. Diversity of insect pathogenic fungi in agricultural and adjoining semi natural habitats. (Sin publicar) *Department of Biotechnology*, University of Agricultural Sciences, Bangalore, India.
- Kirubakaran, S.A.; Sathishnarayann, S.; Senthil-Nathan, S. 2013. Characterization of *Metarhizium* strains virulence on the rice pest *Cnaphalocrocis medinalis* Guenee. (Sin publicar) *Sri Paramakalyani Center for Excellence in Environmental Sciences*, Department of Environmental Biotechnology, Manonmaniam Sundaranar University, Tamil Nadu, India.
- Kepler, R.M.; Humber, R.A.; Bischoff, J.F.; Rehner, S.A. 2014. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia* 106(4):811-829.
- Kepler, R.M.; Ugine, T.A.; Maul, J.E.; Cavigelli, M.A.; Rehner, S.A. 2015. Community composition and population genetics of insect pathogenic fungi in the genus *Metarhizium* from soils of a long-term agricultural research system. *Environmental Microbiology*, 17(8):2791-2804.
- Klingen, I.; Eilenberg, J.; Meadow, R. 2002. Effects of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils. *Agriculture*,

- Ecosystem and Environment* 91:191-198.
- Klingen, I. y Haukeland, S. 2006. Chapter 9: The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. En: Eilenberg, J. and Hokkanen, H.M.T. (Eds.) *An Ecological and Social Approach to Biological Control*. Springer, pp. 145-211.
- Luangsa-ard, J. Hywel-Jones, N.L.; Samson, R.A. 2004. The polyphyletic nature of *Paecilomyces sensu lato* based on 18S-generated rDNA phylogeny. *Mycologia*, 96(4):773-780.
- Luangsa-ard, J.; Houbraken, J.; van Doorn, T.; Hong, S.B.; Borman, A.M.; Hywel-Jones, N.L.; Samson, R.A. 2011. *Purpleocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Letters*, 321:141-149.
- Marques, G. 2012. Biodiversidade funcional do solo: qual o papel dos fungos entomopatogénicos na proteção da vinha? *Presentación CITAB*, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal 28 de mayo de 2012.
- Marques, G.; Machado, C.; Val, C.; Carlos, C.; Gonçalves, F.; Torres, L. 2011. Os fungos entomopatogénicos na proteção contra pragas da vinha na Região Demarcada do Douro. *Trabajo de investigación y tesis, CITAB, UTAD, Portugal*.
- Marquez, M.; Garrido-Jurado, I.; Iturriaga, E.; Quesada-Moraga, E.; Monte, E.; Hermosa, R. 2008. Genetic characterization of *Beauveria* Spanish isolates. (Sin publicar) *Entomología Agrícola*, Universidad de Córdoba, España.
- Meyling, N.V. y Eilenberg, J. 2006. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agr. Ecosyst. Environ.* 113:336-341.
- Meyling, N.V.; Rehner, S.A.; Lubeck, M.; Buckley, E.P.; Eilenberg, J.R. 2006. Sympatric coexistence of multiple species of the entomopathogenic fungus *Beauveria* in adjacent agricultural and non-agricultural habitats. (Sin publicar) *Insect Biocontrol Laboratory*, USDA-ARS, EEUU.
- Meyling, N.V. y Eilenberg, J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control* 43:145-155.
- Meyling, N.V. 2007. Methods for isolation of entomopathogenic fungi from soil environment. *Laboratory manual*. Department of Ecology, Faculty of Life Science, University of Copenhagen. Disponible en: <http://orgprints.org/11200> (visto el 15 de Octubre de 2013).
- Nishi, O.; Hasegawa, K.; Iiyama, K.; Yasunaga, Aoki, C.; Shimizu, S. 2011. Phylogenetic analysis of the *Metarhizium* spp. isolated from soil in Japan. *Applied Entomology and Zoology*, 46:301-309.

- Nishi, O.; Iiyama, K.; Yasunaga-Aoki, C.; Shimizu, S. 2013. Comparison of the germination rates of *Metarhizium* spp. conidia from Japan at high and low temperatures. *Letter of Applied Microbiology*, 57(6):554-560.
- Oda, H.; Hatakeyama, Y.; Yamamoto, Y.; Enomoto, K.; Shigano, T.; Iwano, H. 2014. Phylogenetic relationships among strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) isolated from Japan. *Applied Entomology and Zoology*, 49(2):213-221.
- Padilla-Melo, G.N.; Bernal-Uribe, M.G.; Vélez-Arango, P.E.; Montoya-Restrepo, E.C. 2000. Caracterización patogénica y morfológica de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* obtenidos de diferentes ordenes insectiles. *Cenicafé*, 51(1):28-40.
- Perdomo, H.; García, D.; Cano, J.; Gene, J.; Guarro, J. 2010. A multilocus analysis of clinical and environment isolates the emerging pathogen fungus *Paecilomyces lilacinus* and proposal of a new species: *Paecilomyces lavendulus*. (Sin publicar) *Unitat de Microbiologia*; Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España.
- Quan, Y.; Liu, Y.X.; Yang, Y.L.; Hyde, K.D.; Liu, Z.Y. 2014. Phylogenetic classification of *Metarhizium* in China. (Sin publicar) *Guizhou Key Laboratory of Agricultural Biotechnology*, Guizhou Academy of Agricultural Science, China.
- Quesada-Moraga, E.; Navas-Cortés, J.A.; Maranhao, E.A.; Ortiz-Urquiza, A.; Santiago-Álvarez, C. 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological research* 111(8):947-966.
- Razinger, J.; Schroers, H.J.; Urek, G. 2014. First results showing the biological control potential of *Metarhizium brunneum* against larvae of *Agriotes* wireworms. (Sin publicar) *Agricultural Institute of Slovenia*, Slovenia.
- Rehner, S.A.; Buckley, E.P.; Humber, R.; Sung, J.M. 2004. Cryptic lineage diversification, recombination and the potential for sexual mating in the mitotic insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. (Sin publicar) *Insect Biocontrol Laboratory*, USDA-ARS, EEUU.
- Rehner, S.A. y Buckley, E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97(1):84-98.
- Rehner, S.A.; Minnis, A.M.; Sung, G.; Luangsa-ard, J.J.; Devotto, L.; Humber, R.A. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* 103(5):1055-1073.
- Rezende, J.M.; Rigueti-Zanardo, A.B.; da Silva Lopez, M.; Delalibera, I.; Rehner, S.A. 2015. Phylogenetic diversity of Brazilian *Metarhizium* associated with sugarcane agriculture. *BioControl*, 60(4):495-505.

- Ridkaew, R.; Luangsa-Ard, J.; Hywel-Jones, N.; Samson, R. 2010. A phylogeny including the medically important *Paecilomyces lilacinus*. (Sin publicar) *Phylogenetics Laboratory*, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Pathum Rhani, Tailandia.
- Sharma, L. y Marques, G. 2016. Diversity of insect associated fungi from soils of Douro Wine region. (Sin publicar) *Departamento de Agronomia*, UTAD, Portugal.
- Spatafora, J.W.; Sung, G.H.; Sung, J.M.; Hywel-Jones, N.L., White, J.F. 2007. Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes. *Mol. Ecol.*, 16(8):1701-1711.
- Steinwender, B.M.; Enkerli, J.; Widmer, F.; Eilenberg, J.; Thorup-Kristensen, K.; Meyling, N.V. 2014. Molecular diversity of entomopathogenic fungal *Metarhizium* community within and agroecosystem. *Journal of Invertebrate Pathology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2014.09.002>
- Sung, G.; Hywel-Jones, N.L.; Sung, J.; Luangsa-Ard, J.J.; Shrestha, B.; Spatafora, J.W. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*, DOI: 10.3114/sim.2007.57.01
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D. ; Filipski, A. ; Kumar, S. 2013. MEGA6 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- Taylor, J.W. y Berbee, M.L. 2006. Dating divergences in the Fungal Tree of Life: review and new analyses. *Mycologia*, 98:838-849.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity for detection of *Cryptosporidium parvum*, *E. coli* K99, and rotavirus in calf feces. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11:314-318.
- Tsui, C.K.M.; Sivichai, S. ; Berbee, M.L. 2006. Molecular systematics of *Helicoma*, *Helicomycetes* and *Helicosporium* and their teleomorphs inferred from rDNA sequences. *Mycologia*, 98:94-104.
- Zhang, S.L.; He, L.M.; Chen, X.; Huang, B. 2012. *Beauveria lii* sp. nov. isolated from *Henosepilachna vigintioctopunctata*. (Sin publicar) *Anhui Provincial Key Laboratory*, Anhui Agricultural University, China.
- Zola, M.E. y Pukkila, P.J. 1986. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Molecular and Cellular Biology* 6(1):195-200.

Anexos Capítulo I



Characterization of entomopathogenic fungi from vineyards in Argentina with potential as biological control agents against the European grapevine moth *Lobesia botrana*

Rodrigo López Plantey · Daciana Papura · Carole Couture · Denis Thiéry · Pablo H. Pizzuolo · María Victoria Bertoldi · Gabriela Susana Lucero

Received: 23 July 2018 / Accepted: 8 July 2019 / Published online: 9 August 2019
© International Organization for Biological Control (IOBC) 2019

Abstract Biological control by entomopathogenic fungi is a possible alternative to chemical insecticides. As the grapevine moth *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae), recently introduced in Argentina, is now the major pest in most of the vineyards in the country despite quarantine regulations, native entomopathogenic fungi could be a preferable alternative to current synthetic insecticides. Thus, the aim of this study was to characterize native fungus strains isolated from 45 soil samples, using larvae of *L. botrana* as bait insect, and infected arthropods from the wine-growing region in the west of Argentina. Sixteen strains were identified, belonging to two species: four strains to *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) and 12 strains to *Metarhizium robertsii* (Hypocreales:

Clavicipitaceae). Based on their physiological features, *M. robertsii* strains collected from the west region of Argentina seem to be the most tolerant to the high temperatures specific to this region. Therefore, being well adapted to Argentinean climate conditions, some of the native *M. robertsii* could be proposed as biological control agents against *L. botrana*.

Keywords *Beauveria bassiana* · *Metarhizium robertsii* · *Lobesia botrana* · Biocontrol · Viticulture · Argentina · *Hypocreales*

Introduction

The European grapevine moth *Lobesia botrana* Denis & Schiffermüller (Lepidoptera: Tortricidae), the main pest in European vineyards (Delbac and Thiéry 2016), was recently introduced in the American continent. It reached Argentina in 2010, when it was declared a quarantine pest (National Service of Sanity and Quality of the Agri-food sector, SENASA, administrative resolution No. 122/2010). Despite regulations designed to protect grapevines against this introduced pest, based on compulsory large-scale insecticide treatments, *L. botrana* continued to spread and is now recorded in most Argentinean vineyards (López Plantey unpublished data).

Therefore, the use of entomopathogenic fungi as a control strategy for lepidoptera, known from ancient

Handling Editor: Nicolai Meyling

R. López Plantey (✉) · P. H. Pizzuolo · G. S. Lucero
Laboratorio de Fitopatología, IBAM, Universidad Nacional de Cuyo, CONICET, Facultad de Ciencias Agrarias, Almirante Brown 500, Chacras de Coria M5528AHB, Argentina
e-mail: rlopezplantey@fca.uncu.edu.ar

D. Papura · C. Couture · D. Thiéry
UMR-SAVE, INRA/Bordeaux Sciences Agro, Villenave-d'Ornon, France

M. V. Bertoldi
IBAM, Universidad Nacional de Cuyo, CONICET, Facultad de Ciencias Agrarias, Almirante Brown 500, Chacras de Coria M5528AHB, Argentina

times, could be a preferable alternative to chemical treatment, since their natural metabolite activity is generally selective and prevents the emergence of resistance in pest populations (Butt et al. 2016). Commercial entomopathogenic fungi products used for biological pest control are mainly produced from *Beauveria* and *Metarhizium* strains. Several species within the *Beauveria* genus have been found to be highly effective for the control of a wide variety of phytophagous pests, including lepidopteran (Bidochka and Khachatourians 1991; de Faria and Wraight 2007; Safavi et al. 2010; Wraight et al. 2010 and Baskar et al. 2012). Concerning *L. botrana*, it has been shown that the *Beauveria bassiana* ITEM-1559 strain has a high capacity to control *L. botrana* larvae, causing 55% of deaths in Italian populations (Cozzi et al. 2013). Some studies have shown that *Metarhizium anisopliae* sensu lato can be highly effective to control Lepidopteran pests such as *Spodoptera litura*, Noctuidae (Sahayaraj and Borgio 2010). Those fungi are commonly found in both cultivated and undisturbed soils, although their natural distribution appears to be linked to habitat and agricultural practices (Meyling and Eilenberg 2007; Jaronski 2007; Meyling et al. 2009). Furthermore, the efficacy and persistence of these fungal treatments against pests are conditioned by biotic factors (Quesada-Moraga et al. 2007; Jaronski 2007; Thompson et al. 2006) and abiotic factors (Jaronski 2009). Therefore, a greater understanding of entomopathogenic fungus ecology is needed to find the optimal conditions and to define the limits in their use for biological control (Lacey et al. 2015).

If entomopathogenic fungi were to be implemented in Argentina to manage the *L. botrana* population, it should be essential to select the fungal strains whose survival and fitness are best adapted to such environmental conditions. As the performance of the fungi virulence may vary even among strains depending on biotic and abiotic factors, the main step in the implementation of the control strategy should be to isolate, identify and characterize native entomopathogenic fungal communities that are able to survive and preserve their pathogenicity under different climatic conditions. The western Argentinian wine-growing region is characterized by semi-arid weather with low precipitation (under 200 mm year⁻¹) mainly during winter, when the so-called *Zonda*, a warm, dry, downslope wind, can raise the temperature by over 15 °C in only a few hours,

while the northern part is a semi-desertic mountainous area characterized by warm subtropical weather with rainfall concentrated during summer. The aim of this study was to characterize native fungus strains isolated from sample of soils, using larvae of *L. botrana* as bait insect, and infected arthropods from the wine-growing region in the west region of Argentina.

Materials and methods

Biological material

A total of 45 samples of soil and three infected arthropods (insects and mites found during the soil collection) were collected in 2014 along a 1945 km transect across the vine growing area in western Argentina. The samples were collected in seven provinces: Mendoza, San Juan, Catamarca, La Rioja, Salta, Neuquén and Río Negro. Four soil sub-samples were collected from each of the 45 sites. These subsamples were taken at a depth of 20 cm, close to the vine trunk. Each subsample was sieved up to a mesh size of 45 and unified to form a single sample which was preserved at 4 °C until its use (four months) (Inglis et al. 2012; Quesada-Moraga et al. 2007).

The entomopathogenic fungi were isolated from the soil adapting the technique of insect bait proposed by Meyling (2007). The adjustment consisted in the use of L4 and L5 instar larvae of *L. botrana* that were reared in an artificial medium (Ferreira et al. 2003) at the Entomology Laboratory of the Universidad Nacional de Cuyo (Mendoza, Argentina). The isolation technique consisted in distributing each sample into three glass Petri dishes (9 cm in diameter) with 20 g of humidified soil and five *L. botrana* larvae in each (n = 15 larvae per sample). The Petri dishes were conserved for seven days at controlled temperature and photoperiod (24 °C and L:D 12:12, respectively). After seven days of exposure to soil, dead larvae were treated with a solution of sodium hypochlorite (1% in volume) for 30 s for external disinfection and washed with sterilised distillate water and conserved in a humidity chamber (> 70%) to facilitate sporulation. After four days, larvae were placed in Petri dishes with a nutritive medium of Potato Dextrose Agar (PDA) 2% Biokar diagnostics® and added streptomycin SIGMA® (50 mg l⁻¹). For the infected arthropods occasionally found in the field during the soil sample

Table 1 Entomopathogenic strains collected from the vine-growing area of the west coast of Argentina, listed in alphabetic order

Strain	Genus	Substrate	GenBank	GPS localization
ACA	<i>Beauveria</i>	Acari	MG188796	S 32° 50.272 W 68° 45.934
BsoilAR-4.1(2)	<i>Beauveria</i>	<i>L. botrana</i> (in soil)	MH070615	S 33° 05.111 W 68° 54.540
BinsAR-1	<i>Beauveria</i>	Heteroptera	MK492665	S 23° 49.130 W 64° 47.250
BinsAR-2	<i>Beauveria</i>	Coleoptera	MH070614	S 33° 00.261 W 68° 52.398
MsoilAR-2.5(2)	<i>Metarhizium</i>	<i>L. botrana</i> (in soil)	MH070611	S 33° 01.774 W 68° 57.847
MsoilAR-4.3	<i>Metarhizium</i>	<i>L. botrana</i> (in soil)	MH070613	S 33° 05.119 W 68° 54.521
MsoilAR-18.5(3)	<i>Metarhizium</i>	<i>L. botrana</i> (in soil)	MH070612	S 29° 15.392 W 67° 25.868
MsoilAR-14.3(3)	<i>Metarhizium</i>	<i>L. botrana</i> (in soil)	MH070610	S 26° 12.151 W 65° 56.334
MsoilAR-2.3(2)	<i>Metarhizium</i>	<i>L. botrana</i> (in soil)	MK492657	S 33° 01.879 W 68° 57.731
MsoilAR-2.3(4)	<i>Metarhizium</i>	<i>L. botrana</i> (in soil)	MK492658	S 33° 01.874 W 68° 57.897
MsoilAR-10	<i>Metarhizium</i>	<i>L. botrana</i> (in soil)	MK492659	S 26° 05.952 W 65° 57.957
MsoilAR-15	<i>Metarhizium</i>	<i>L. botrana</i> (in soil)	MK462660	S 26° 12.029 W 65° 56.509
MsoilAR-16.9	<i>Metarhizium</i>	<i>L. botrana</i> (in soil)	MK462661	S 29° 09.235 W 67° 23.349
MsoilAR-16.7	<i>Metarhizium</i>	<i>L. botrana</i> (in soil)	MK492662	S 29° 09.275 W 67° 23.185
MsoilAR-17.2	<i>Metarhizium</i>	<i>L. botrana</i> (in soil)	MK492663	S 29° 11.992 W 67° 25.108
MsoilAR-17.5	<i>Metarhizium</i>	<i>L. botrana</i> (in soil)	MK492664	S 29° 12.011 W 67° 25.144

collection, the isolation procedure was similar to that of soil-isolated strains. Infected arthropods were submitted to an external disinfection and placed directly in Petri dishes with the same nutritive medium as soil strains.

Monosporic entomopathogenic fungi strains were obtained from the original cultures, using the methodology proposed by Inglis et al. (2012). Fungi growth and multiplication were observed on PDA, in 50-mm Petri dishes. The fungi collection was stored in the Phytopathology laboratory of the IBAM-FCA (Instituto de Biología Agrícola de Mendoza) by three methods: on glycerol 10% at -80°C , on PDA at 4°C and lyophilised (Table 1).

Morpho-physiological characterization

The fungal strains were morphologically characterized based on their colony color, shape, and type of edge, as described by Humber (2012). Furthermore, each of the strains was colored using Gueguen's technique (Langeron and Vanbreuseghem 1952), observed in a Carl Zeiss© Axioplan® microscope at 1000 magnifications, and characterized according to the shape and size of conidiophores and conidia ($n = 70$ per sample) (Humber 2012). The length, width and the length/width ratio were measured for each

strain, and the results were analyzed performing a one-way ANOVA with the InfoStat 2017p® software to test each variable separately and compare strains. Means were separated using the LSD Fisher test ($\alpha = 0.05$).

In order to provide a physiological characterization of these fungi, the growth area of the colonies was assessed on PDA at five different temperatures (4°C , 17°C , 21°C , 24°C and 35°C) using the UAT-CONICET® incubators (variation $\sim 1^{\circ}\text{C}$). For this purpose, the colony area of each fungus strain was recorded daily, until it reached the edge of 55 mm-diameter Petri dishes (Boiteux et al. 2014). The average data of area growth on the tenth day for five biological repetitions (for each strain at different temperature conditions) was statistically analyzed performing a one-way ANOVA with the InfoStat 2017p® software to test the effect of strain for each temperature. Means were separated using the LSD Fisher test ($\alpha = 0.05$).

Molecular identification

DNA extraction

The mycelium obtained from each of the fungi strains and cultivated as monosporic colonies was chopped

separately in 1.5 ml microtubes containing 500 µl of potato dextrose broth and then incubated at 24 °C for 72–96 h. The microtubes were centrifuged for 10 min at 13,000 rpm and placed in an ultra-freezer (– 80 °C) for a minimum of 3 h before lyophilisation in a Christ® alpha 1-4 LD plus® lyophilizer for a minimum of 16 h.

The DNA extraction was performed using the technique described by Zola and Pukkila (1986), with some adaptations. The lyophilized mycelium was lacerated mechanically with glass beads and resuspended in CTAB buffer extraction 1× (2 M Tris HCl at pH 8, 0.7 M ClNa, 0.5 M EDTA, 13.7 mM CTAB and 1% w/v PVP-40). The microtubes were placed in a water bath at 65 °C for 60 min. Isoamyl–chloroform (24:1) was added later to the microtubes and centrifuged for 10 min at 13,000 rpm. The supernatant was transferred to a new microtube to which isopropyl alcohol was added and kept cold (– 24 °C) for 2 h. Afterwards, the microtubes were centrifuged for 10 min at 13,000 rpm. The pellet was washed with 70% ethyl alcohol, centrifuging for 10 min at 13,000 rpm. The formed pellets were dried in a Savant® Speed Vac Concentrator® for 7 min. Finally, the obtained DNA was resuspended in 50 µl of milliQ® water. The quality of DNA samples was verified by migration on electrophoresis 2% agarose gel at 100 V for 35 min. The DNA concentration was measured for each of the samples by means of the Nanodrop® spectrophotometer.

PCR and sequencing

The molecular identification and the phylogenetic characterisation of the Argentinean entomopathogenic fungi strains was carried out by using a partial sequence of the nuclear protein-encoding gene, the translation elongation factor 1-alpha (EF-1 α). The fungi strains identified as *Beauveria* spp., according to the morphological identification, were also characterized by molecular methods using the primers 983F (5'-GCYCCYGGHCA YCGTGAYTTYAT) and 2218R (5'-ATGACACCRACRGCACRGTGTG) and a touchdown PCR procedure, following the instructions by Rehner and Buckley (2005).

The fungi samples morphologically identified as *Metarhizium* were characterized by using the primers EF1T (5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC) and EF2T (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT) that

amplified another fragment of the same nuclear protein-encoding gene, following the PCR conditions described in Bischoff et al. (2009). Finally, all samples were run in 2% Agarose gel at 100 V for 35 min to determine the presence and the quality of the specific band amplification (~ 1200 pb for both primers).

All the samples were sequenced by the Beckam Coulter Genomics® company. The lower quality parts of each sequence were removed before making the multiple-sequence alignments of translation EF1- α (1200 bp long) by using the CLUSTAL W software (Thompson et al. 1994). Phylogenetic analyses included all the sequences produced for the present study and some supplementary sequences available in the NCBI GenBank® (Rehner and Buckley 2005; Bischoff et al. 2009; Meyling et al. 2009; Nishi et al. 2011, 2013; Zhang et al. 2013; Rehner et al. 2006, 2011; Denier and Bulmer 2015; Steinwender et al. 2014; Kepler et al. 2015; Rezende et al. 2015).

Two analyses were conducted with MEGA 7 (Tamura et al. 2013): maximum likelihood parsimony and maximum parsimony. Branch support was estimated by bootstrapping with 500 replicates.

Results

Characterization by morphological and molecular criteria

Out of the total collected samples (n = 45), 29% had a positive result, with at least one strain that could be isolated. Sixteen entomopathogenic fungi strains could be isolated and cultivated directly from soil samples or infected arthropods (Table 1) and they were differentiated into two well-defined groups according to the morphological criteria. For the first group, four strains were identified as *Beauveria* sp.: ACA, BinsAR-1 and BinsAR-2 from an infected hemipteran, coleopteran and mite and BsoilAR-4.1(2), which was isolated from the soil. These strains were collected in Mendoza province, the main wine-growing area of central Argentina. The fungal colonies on PDA displayed a regular round shape with well-defined edges and a compact cottony aspect, with a clear white coloring and light beige on the reverse, which specifically characterized these strains. Under the microscope, the fungus presented zigzagging conidiophores (sympodulospores) and conidia

Table 2 Conidial sizes of the studied strains of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium robertsii*

Strain	Genus	Length (μm)		Width (μm)		Length/width ratio	
		F = 1465.26; df = 6, 406 ($p < 0.0001$)	Mean (SE)	F = 194.00; df = 6, 406 ($p < 0.0001$)	Mean (SE)	F = 345.99; df = 6, 406 ($p < 0.0001$)	Mean (SE)
ACA	<i>Beauveria</i>	1.92 (0.32)	a	1.53 (0.25)	a	1.27 (0.19)	a
BsoilAR-4.1(2)	<i>Beauveria</i>	1.88 (0.28)	a	1.56 (0.26)	a	1.22 (0.19)	a
BinsAR-2	<i>Beauveria</i>	2.66 (0.31)	b	2.24 (0.28)	b	1.20 (0.14)	a
MsoilAR-2.5(2)	<i>Metarhizium</i>	5.85 (0.44)	c	2.38 (0.25)	c	2.49 (0.30)	b
MsoilAR-4.3	<i>Metarhizium</i>	6.47 (0.50)	d	2.59 (0.33)	d	2.53 (0.33)	b
MsoilAR-18.5(3)	<i>Metarhizium</i>	7.24 (0.63)	e	2.89 (0.28)	e	2.53 (0.34)	b
MsoilAR-14.3(3)	<i>Metarhizium</i>	6.55 (0.52)	d	2.67 (0.27)	d	2.47 (0.28)	b

Values with the same letter indicate not significant differences ($p < 0.05$) for each measurement. Strains are listed in alphabetic order

showed, on average, a globular shape with a length of 2.23 μm (1.17–3.45 μm), a width of 1.84 μm (1.08–2.81 μm) and a length/width ratio of 1.23 (0.86–1.75) (Table 2). Genetic analysis, based on the EF-1 α amplification, confirmed that the four sequences, morphologically identified as *Beauveria* sp., matched at 100% with *B. bassiana* sequences published on the NCBI GenBank (Fig. 1).

Twelve isolates were identified as *Metarhizium* sp. according to morphological criteria. All these strains were recuperated from the vineyard soils along the 1945 km transect across the western Argentinean vineyards (over 95% of the total Argentinean grape growing area). Microscopic observations revealed that the *Metarhizium* conidia were arranged in long chains and had a cylindrical shape with an average length of 6.58 μm (5.12–8.58 μm), a width of 2.65 μm (1.68–3.53 μm) and a length/width ratio of 2.51 (1.82–3.78) (Table 2).

Genetic analysis, based on the gene EF-1 α amplification, confirmed that the 12 sequences morphologically identified as *Metarhizium* sp. matched at 99% the *Metarhizium robertsii* sequences published on the NCBI GenBank (Fig. 2). Among the 12 Argentinean *Metarhizium* strains, two distinct genotypes were identified: a first genotype that included the two isolates from Mendoza (MsoilAR-2.5(2), MsoilAR-4.3) and one from the northern region (MsoilAR-18.5(3)), and a second genotype including the strain from Salta province (MsoilAR-14.3). A high degree of similarity, greater than 90%, was observed within the *Metarhizium* group as well as in the *Beauveria* group.

Temperature-dependent growth of *B. bassiana* and *M. robertsii*

The physiological characterisation of *B. bassiana* and *M. robertsii* fungi, by the assessment of colony growth area across a wide temperature range, was done in order to test their capacity to adapt to the local conditions. From the two species, at least two strains we selected came from the north and at least two from the central region of Argentina. So we were able to analyse three strains of *B. bassiana* (ACA, BinsAR-2 and BsoilAR-4.1(2)) collected from central Argentina, and four *M. robertsii* strains: two collected from the same region in central Argentina (MsoilAR-2.5(2) and MsoilAR-4.3) and two other *M. robertsii* strains (MsoilAR-18.5(3) and MsoilAR-14.3(3)) collected from northern Argentina. As only one strain of *B. bassiana* was collected from northern Argentina (BinsAR-1), it was excluded from the analysis.

Two *B. bassiana* (ACA and BinsAR2) and the four *M. robertsii* strains showed low growth areas at 17 °C. Only BsoilAR4.1(2) showed statistically higher growth than the other strains. At 4 °C growth was very low for all strains. However, BsoilAR4.1(2) was significantly higher than the others. Different responses were obtained at the optimal temperature growth (21 °C and 24 °C). This behavior could not be attributed to the geographical origin of the strains or species (Table 3). However, at the highest temperature tested (35 °C) all four *M. robertsii* strains and one *B. bassiana* (BsoilAR-4.1(2)) still showed a larger growth area than the other two *B. bassiana* strains

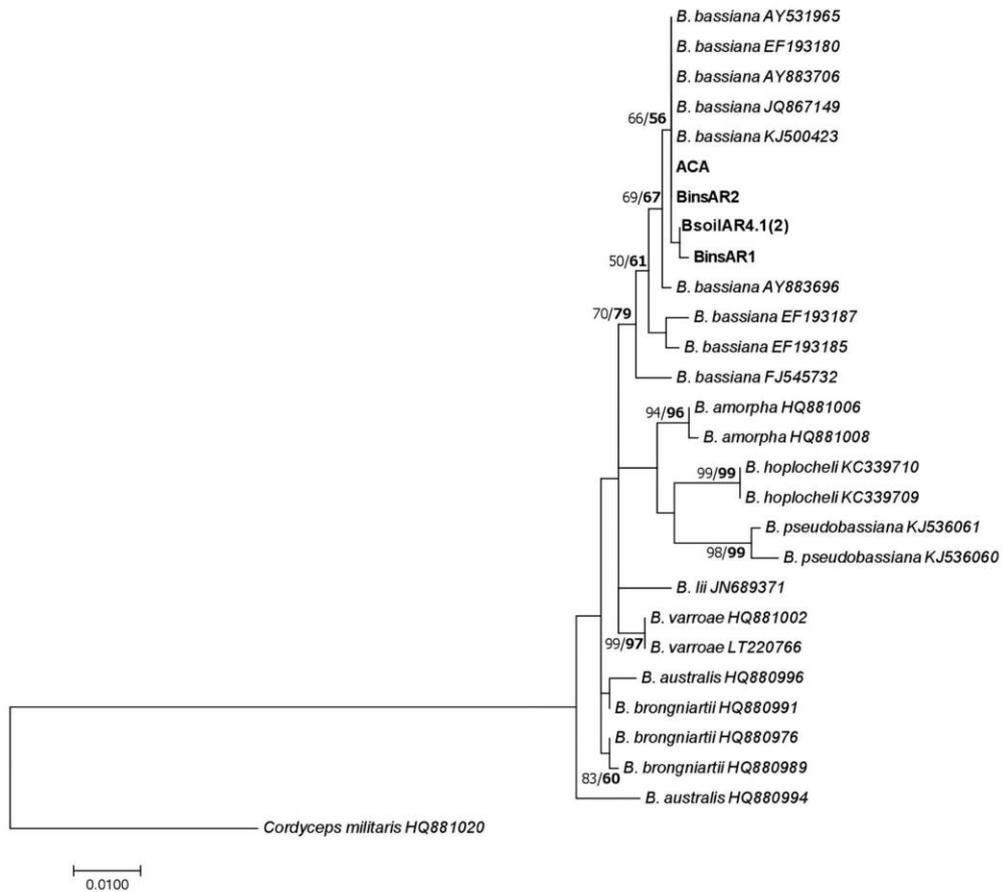


Fig. 1 Phylogeny of *Beauveria* as shown by joint maximum likelihood and maximum parsimony methods. Strains in bold indicate the origin from Argentinean vineyards. The scale bar represents 0.0100 substitutions per nucleotide position

(ACA and BinsAR2), which did not grow at 35 °C (Table 3).

Discussion

All the entomopathogenic fungi isolated along the 1945 km of the wine-growing region of the west of Argentina were characterized using morphological and genetic criteria. They were also characterized based on the temperature range of growth. The study of this physiological characteristic was significant,

taking in account the great distance existing between the first sample taken in the north and the last one in the south of the country. Out of the entomopathogenic strains specifically baited from the soil with the *Lobesia botrana* larvae, the majority (12 out of a total of 16 isolated strains) were identified as *Metarhizium* spp. according to morphological criteria and only one strain was attributed to the *Beauveria* spp. Goble et al. (2010) also use insect pest larvae (*Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) and *Thaumatotibia leucotreta* (Lepidoptera: Tortricidae)) as bait and compare the number of entomopathogenic strains isolated through

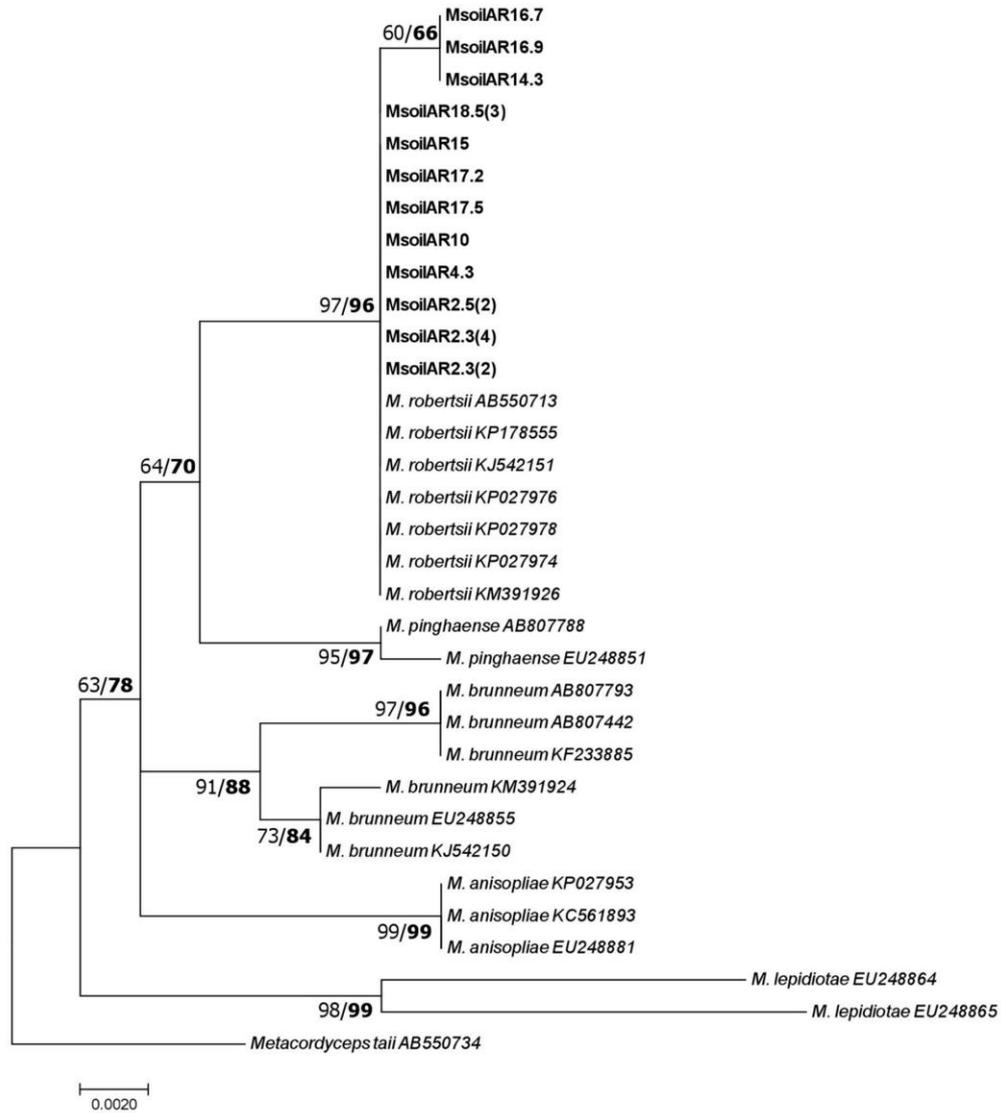


Fig. 2 Phylogeny of *Metarhizium* as shown by joint maximum likelihood and maximum parsimony methods. Strains in bold indicate the origin from Argentinean vineyards. The scale bar represents 0.0020 substitutions per nucleotide position

the use of these pests with the standard technique using *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). They found that there is a greater susceptibility of *G. mellonella* to entomopathogenic fungi, resulting in an

excellent bait insect. Nevertheless, from a pest management point of view, the importance of the pathogenicity of the organisms found on target insect is not discussed. The use of the target insect as bait

the use of these pests with the standard technique using *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). They found that there is a greater susceptibility of *G. mellonella* to entomopathogenic fungi, resulting in an excellent bait insect. Nevertheless, from a pest management point of view, the importance of the pathogenicity of the organisms found on target insect is not discussed. The use of the target insect as bait

Table 3 Comparison of growth area (cm²) of *Beauveria* and *Metarhizium* strains at five different temperatures (°C) on the tenth day of culture

Strain	4 °C F = 11.02; df = 6, 14 (p = 0.0001)		17 °C F = 17.25; df = 6, 14 (p < 0.0001)		21 °C F = 3.22; df = 6, 14 (p = 0.0335)		24 °C F = 6.77; df = 6, 14 (p = 0.0016)		35 °C F = 22.55; df = 6, 14 (p < 0.0001)	
	Mean (SE)		Mean (SE)		Mean (SE)		Mean (SE)		Mean (SE)	
ACA	0.24 (0.03)	b	1.44 (0.16)	a	7.62 (0.31)	a b c	4.54 (0.49)	a	0.31 (0.09)	a
BsoilAR4.1(2)	0.33 (0.04)	c	6.61 (2.15)	b	8.89 (2.26)	b c	9.97 (0.97)	d	3.59 (0.38)	c
BinsAR2	0.21 (0.01)	a b	1.21 (0.14)	a	8.83 (0.72)	b c	6.32 (0.76)	a b	0.54 (0.09)	a
MsoilAR2.5(2)	0.24 (0.03)	b	2.15 (0.12)	a	11.95 (5.79)	c	9.00 (1.23)	c d	3.18 (1.13)	b c
MsoilAR4.3	0.20 (0.02)	a	1.70 (0.14)	a	5.80 (0.49)	a b	4.91 (0.68)	a	2.48 (0.48)	b
MsoilAR14.3	0.18 (0.01)	a	1.57 (0.13)	a	8.81 (1.51)	b c	7.33 (2.81)	b c	3.61 (0.30)	c
MsoilAR18.5(3)	0.24 (0.04)	b	0.97 (0.08)	a	3.77 (1.54)	a	5.45 (1.32)	a b	2.92 (0.18)	b c

Strain name in bold type indicates origin in the north of Argentina; strain name in regular type indicates origin in the central region. Different letters indicate significant differences ($\alpha = 0.05$) in mean relative mycelial growth between strains at the same incubation temperature. Strains are listed in alphabetic order

insect would allow to advance on the pathogenicity studies, reducing the use of time resources and ensuring a possible inclusion in a management program. Three isolated *Beauveria* spp. were obtained directly from arthropods (hemipteran and mite). The finding of only two genera of entomopathogenic fungi in the samples coincides with what was reported by other authors, who report that although entomopathogenic fungi are common inhabitants of the soil, their diversity is low, with only one or two species coexisting (Goble et al. 2010; Quesada-Moraga et al. 2007; Keller et al. 2003).

Nonetheless, as in many genera of the Hypocreales order, the *Metarhizium* species could not be easily distinguished based on morphological features (Rehner and Buckley 2005; Tsui et al. 2006). Based on the data for EF-1 α , all the 12 *Metarhizium* strains isolated from the wine-growing area in Argentina were identified as *Metarhizium robertsii*. The high prevalence of *M. robertsii* in Argentinean grape growing areas is consistent with the results by Bidochka et al. (2001) and Bidochka and Small (2005) in Canada, where this species was most frequent in soils from managed lands. However, Steinwender et al. (2014) described a different situation in agricultural fields and surrounding hedgerow in Denmark, with the co-occurrence of the least four *Metarhizium* species.

Four out of the 16 Argentinean strains collected in the central part of the country showed typical

Beauveria morphological features. The species within this genus are very difficult to differentiate (Rehner et al. 2011; Oda et al. 2014), probably because of the existence of a *Beauveria* species complex. The use of translation EF-1 α allowed us to identify all four strains as *Beauveria bassiana* sensu stricto El Kichaoui et al. (2017) have reported in the Gaza Strip the existence of the same two genera of entomopathogenic fungi in an agricultural environment that is fairly similar to that in western Argentina.

In this study, we have shown that the three *B. bassiana* strains and the four *M. robertsii* strains had an optimum growth at 21 °C, with a minimum growth at 4 °C, as many of the mesophilic fungi (Fargues et al. 1992). But the most striking result of this study is the capacity of all four *M. robertsii* strains, assessed in terms of colony area growth, to keep developing well even at the high temperatures tested (35 °C). Furthermore, the four *Metarhizium* strains showed the same growth fitness (area) at this high temperature, despite their origin (wine-growing area of central and northern Argentina). Bischoff et al. (2009) mentioned that the genus is frequently isolated from tropical and temperate regions, as we saw in our study. Meyling and Eilenberg (2007) explain that this tolerance to temporal high temperature could be an adaptation of a specific genetic group to agroecosystem conditions, which appears to be more important than the geographical origin of the strains (Uma Devi et al. 2005). A genetically-distinct *M. anisopliae* strain group,

collected from the agricultural area in Canada (hay, alfalfa, corn, wheat, grapes, etc.), had also shown an ability for growth at high temperatures (i.e. 37 °C), while a second genetically distinct group, associated to forest areas, showed a cold-active growth ability (i.e. 8 °C). As those groups were morphologically indistinguishable, there were considered as different cryptic species (Bidochka and Small 2005). This ability to grow at high temperature should therefore act as selective force in determining population distribution patterns (Bidochka et al. 2001).

Considering the high summer temperatures, the thermal range—which can reach 20 °C—, scarce rainfalls and strong winds, it is obvious that the use of biocontrol agents as a way to control *L. botrana* in Argentina requires the selection of entomopathogenic fungi with the capacity to tolerate such conditions. Bearing this in mind, native *M. robertsii* strains, in particular, seem to show a specific growth-ability at high temperatures, being adapted to the climate conditions of northern and also central Argentina. *B. bassiana* strain BsoilAR-4.1(2) could also be considered as good candidates to be used as biocontrol agents against *L. botrana*, mainly in the wine-growing environment of central Argentina. The mentioned physiological adaptation characteristics of isolated strains, together with the essential fact that the fungi were specifically obtained from the use of *L. botrana* larvae as a bait insect (Klingen et al. 2002), in conjunction with a low negative impact agroecosystem management can provide evidence in favor of the use of these fungi as microbiological control agents.

It has been shown that the persistence of entomopathogenic fungi in agricultural areas could also be influenced by agricultural practices, such as organic or conventional production systems, and by fungicide applications (Lacey et al. 2015). However, in viticulture, as a perennial cropping system with a high potential to serve as a habitat to entomopathogenic fungi, the abundance of *Metarhizium* spp. does not seem to be impacted by these agricultural practices (Uzman et al. 2019). Experiences carried out in the Laboratorio de Fitopatología (UNCuyo) show that the main fungicides used in Argentine viticulture would not have a negative effect on the normal development of native isolates, producing fungistatic, rather than fungicidal effects (unpublished data). These findings have significant implications for their use as microbiological control agents in viticulture.

In an integrated pest management program, the correct combination of different tools to manage pest population is essential if one is to maintain the program under a certain economic threshold. Entomopathogenic fungi could be an important tool in the context of a control strategy, in combination with an integrated pest management program in which these organisms can act as a complementary tool to the use of pesticides. This could reduce the application of synthetic products and allow their rotation, with a view to reducing the risks of selecting resistant individuals, while having a low negative environmental impact and reducing the risks of killing non-target insects as the strains were selected for their action against the studied pest. Strain characterisation according to pathogenic potential against these grapevine pests in Argentina will be the topic of further study carried out by our work team.

Acknowledgements We thank the following individuals for their cooperation, courtesy and help in the creation of this paper: Laura Torres Monteiro, Sylvie Richart Cervera, Pascale Roux, Laura García, María López Plantey, Jonathan Gaudin, Juliette Poidatz, Antonella Balloni, Andrés Riquelme, Josefina Zuin Segura and Aurélia Nivault. Additionally, we thank the following institutions for their financial cooperation: Cooperation Vitivinícola Argentina (COVIAR), Universidad Nacional de Cuyo (SeCTyP) and INRA-Bordeaux.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Baskar K, Raj GA, Mohan PM, Lingathurai S, Ambrose T, Muthu C (2012) Larvicidal and growth inhibitory activities of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* against Asian Army worm, *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae). *J Entomol* 9(3):155–162
- Bidochka MJ, Khachatourians GG (1991) The implication of metabolic acids produced by *Beauveria bassiana* in pathogenesis of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J Invertebr Pathol* 58(1):106–117
- Bidochka MJ, Small CL (2005) Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. In: Vega FE, Blackwell M (eds) *Insect-fungal associations: ecology and evolution*. Oxford University Press, New York, pp 28–50
- Bidochka MJ, Kamp AM, Lavender TM, Dekoning J, Amritha de Croos JN (2001) Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? *J Appl Environ Microbiol* 67(3):1335–1342

- Bischoff JF, Rehner SA, Humber RA (2009) A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* 101(4):512–530
- Boiteux J, Soto Vargas C, Pizzuolo P, Lucero G, Silva MF (2014) Phenolic characterization and antimicrobial activity of folk medicinal plant extracts for their applications in olive production. *Electrophoresis* 35:1709–1728
- Butt TM, Coates CJ, Dubovskiy IM, Ratcliffe NA (2016) Entomopathogenic fungi: new insights into host–pathogen interactions. *Adv Genet* 94:307–364
- Cozzi G, Somma S, Haidukowski M, Logrieco A (2013) Ochratoxin A management in vineyards by *Lobesia botrana* biocontrol. *Toxins* 5(1):49–59
- de Faria MR, Wraight SP (2007) Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol Control* 43(3):237–256
- Delbac L, Thiéry D (2016) Damage to grape flowers and berries by *Lobesia botrana* larvae (Denis & Schiffenüller) (Lepidoptera: Tortricidae), and relation to larval age. *Aust J Grape Wine Res* 22(2):256–261
- Denier D, Bulmer MS (2015) Variation in subterranean termite susceptibility to fatal infections by local *Metarhizium* soil isolates. *Insect Soc* 62(2):219–226
- El Kichaoui AY, Bara'a A, El-Hindi MW (2017) Isolation, molecular identification and under lab evaluation of the entomopathogenic fungi *M. anisopliae* and *B. bassiana* against the red palm weevil *R. ferrugineus* in Gaza Strip. *Adv Microbiol* 7:109–124
- Fargues J, Maniana N, Delmas J, Smits N (1992) Influence de la température sur la croissance in vitro d'hyphomycètes entomopathogènes. *Agronomie, EDP Sciences* 12(7):557–564
- Ferreira A, Bastos MMSM, Aguiar A (2003) Criação de traça da uva *Lobesia botrana*. In: Actas do VI encontro nacional de proteção integrada, Castelo Branco-Portugal, 83–88
- Goble TA, Dames JF, Hill MP (2010) The effects of farming system, habitat type and bait type on the isolation of entomopathogenic fungi from citrus soils in the Eastern Cape Province, South Africa. *BioControl* 55(3):399–412
- Humber RA (2012) Identification of entomopathogenic fungi. In: Lacey LA (ed) *Manual of techniques in invertebrate pathology*, 2nd edn. Academic Press (Elsevier), London, pp 151–186
- Inglis GD, Enkerli J, Goettel MS (2012) Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: hypocreales. In: Lacey LA (ed) *Manual of techniques in invertebrate pathology*, 2nd edn. Academic Press (Elsevier), London, pp 189–251
- Jaronski ST (2007) Soil ecology of the entomopathogenic ascomycetes: a critical examination of what we (think) we know. In: Maniana K, Ekesi S (eds) *Use of entomopathogenic fungi in biological pest management*. Research SignPosts, Trivandrum, pp 91–143
- Jaronski ST (2009) Ecological factor in the inundative use of fungal entomopathogens. *BioControl* 55(1):159–185
- Keller S, Kessler P, Schweizer C (2003) Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *BioControl* 48(3):307–319
- Kepler RM, Ugine TA, Maul JE, Cavigelli MA, Rehner SA (2015) Community composition and population genetics of insect pathogenic fungi in the genus *Metarhizium* from soils of a long-term agricultural research system. *Environ Microbiol* 17(8):2791–2804
- Klingen I, Eilenberg J, Meadow R (2002) Effects of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils. *Agric Ecosyst Environ* 91:191–198
- Lacey LA, Grzywacs D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS (2015) Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *J Invertebr Pathol* 132:1–41
- Langeron M, Vanbreuseghem R (1952) *Présis de mycologie*. Masson et Cie (eds) Paris
- Meyling N (2007) *Methods for isolation of entomopathogenic fungi from soil environment*. Laboratory manual. Department of Ecology, Faculty of Life Science, University of Copenhagen. <http://orgprints.org/11200>. Accessed 15 Oct 2013
- Meyling N, Eilenberg J (2007) Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biol Control* 43:145–155
- Meyling N, Lübeck M, Buckley EP, Eilenberg J, Rehner SA (2009) Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. *Mol Ecol* 18(6):1282–1293
- Nishi O, Hasegawa K, Iiyama K, Yasunaga-Aoki C, Shimizu S (2011) Phylogenetic analysis of the *Metarhizium* spp. isolated from soil in Japan. *Appl Entomol Zool* 46:301–309
- Nishi O, Iiyama K, Yasunaga-Aoki C, Shimizu S (2013) Comparison of the germination rates of *Metarhizium* spp. conidia from Japan at high and low temperatures. *Lett Appl Microbiol* 57(6):554–560
- Oda H, Hatakeyama Y, Yamamoto Y, Enomoto K, Shigano T, Iwano H (2014) Phylogenetic relationships among strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) isolated from Japan. *Appl Entomol Zool* 49(2):213–221
- Quesada-Moraga E, Navas-Cortés JA, Maranhao EA, Ortiz-Urquiza A, Santiago-Álvarez C (2007) Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycol Res* 111(8):947–966
- Rehner SA, 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 SA, Posada FJ, Buckley EP, Infante F, Castillo A, Vega FE (2006) Cryptic lineage diversification, mating potential and recombination in the mitotic insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J Invertebr Pathol* 93:11–21
- Rehner SA, Minnis AM, Sung GH, Luangsa-ard JJ, Devotto L, Humber RA (2011) Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* 103(5):1055–1073
- Rezende JM, Riguetti-Zanardo AB, da Silva Lopez M, Delalibera I, Rehner SA (2015) Phylogenetic diversity of Brazilian *Metarhizium* associated with sugarcane agriculture. *BioControl* 60(4):495–505
- Safavi SA, Kharrazi A, Rasoulian GR, Bandani AR (2010) Virulence of some isolates entomopathogenic fungus,

- Beauveria bassiana* on *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). J Agric Sci Technol 12:13–21
- Sahayaraj K, Borgio F (2010) Virulence of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin on seven insect pests. Indian J Agric Res 44(3):195–200
- Steinwender BM, Enkerli J, Widmer F, Eilenberg J, Thorup-Kristensen K, Meyling NV (2014) Molecular diversity of the entomopathogenic fungal *Metarhizium* community within an agroecosystem. J Invertebr Pathol 123:6–12
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30(12):2725–2729
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity for detection of *Cryptosporidium parvum*, *E. coli* K99, and rotavirus in calf feces. J Vet Diagn Invest 11:314–318
- Thompson SR, Brandenburg RL, Arends JJ (2006) Impact of moisture and UV degradation of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin conidial viability in turfgrass. Biol Control 39:401–407
- Tsui CKM, Sivichai S, Berbee ML (2006) Molecular systematics of *Helicoma*, *Helicomycetes* and *Helicosporium* and their teleomorphs inferred from rDNA sequences. Mycologia 98:94–104
- Uma Devi K, Sridevi V, Murali Mohan Ch, Padmavathi J (2005) Effect of high temperature and water stress on in vitro germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. J Invertebr Pathol 88:151–189
- Uzman D, Pliester J, Leyer I, Entling MH, Reineke A (2019) Drivers of entomopathogenic fungi presence in organic and conventional vineyard soils. Appl Soil Ecol 133:89–97
- Wraight SP, Ramos ME, Avery PB, Jaronski ST, Vandenberg JD (2010) Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. J Invertebr Pathol 103(3):186–199
- Zhang SL, He LM, Chen X, Huang B (2013) *Beauveria lii* sp. nov. isolated from *Henosepilachna vigintioctopunctata*. Mycotaxon 121(1):199–206
- Zola ME, Pukkila PJ (1986) Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. Mol Cell Biol 6(1):195–200
- Rodrigo López Plantey** research focused on biological control of pests and plant diseases with emphasis in vine's pest and diseases
- Daciana Papura** works on key ecological drivers operating as biological control services against pests, provided by natural enemies (parasitoids, predators arthropods and small mammals, entomopathogenic fungi).
- Carole Couture** works on Genetics, molecular genomics, molecular biology and phylogeography.
- Denis Thiéry** works on pest ecology with special focus on behavioural and chemical ecology concerning the development of biocontrol against several pests as alternatives to pesticide use.
- Pablo H. Pizzuolo** works on fungal diseases of grapevine, olive trees and stone fruits, their diagnosis and management with low environmental impact products
- María Victoria Bertoldi** is a technical manager of the molecular biology laboratory.
- Gabriela Susana Lucero** works on fungal and Straminophila diseases of olive trees, grapevine, fruit and nut trees. She is specialized in diagnosis and management of Pytiaceae diseases.

Caracterización de las cepas de hongos entomopatógenos nativos: rangos térmicos y comportamiento frente a fungicidas de síntesis

Resumen

El uso de microorganismos en el Manejo Integrado de Plagas supone, entre otros aspectos, contar con agentes capaces de poder desarrollarse y tener acción patogénica en el agroecosistema donde se los empleará. Por ello, previa a su utilización se requieren estudios que, en cierta medida, permitan generar los conocimientos necesarios para garantizar el éxito de la técnica. Los factores abióticos y bióticos influyen en el normal desarrollo de los hongos entomopatógenos y en su prevalencia en el sistema. Del mismo modo, las acciones antropológicas en el medio poseen un impacto directo sobre los agentes de uso para el control biológico de plagas. El presente capítulo posee como objetivos: 1. Evaluar las características fisiológicas (rangos térmicos de crecimiento) de las cepas de hongos entomopatógenos aisladas, y 2. Evaluar el efecto de los principales fungicidas utilizados en la viticultura argentina sobre los entomopatógenos aislados. Para el primer objetivo se realizaron bioensayos para la determinación de los rangos térmicos de crecimiento mediante la evaluación del desarrollo radial micelial a 5 temperaturas diferentes (4, 17, 21, 24 y 35°C), durante 10 días consecutivos. En el segundo objetivo, se realizaron bioensayos en medios de cultivo conteniendo con cuatro productos fitosanitarios de uso corriente: azufre 80% WG, Mancozeb 80% WP, Quinoxifen 25% SC y oxiclورو de cobre 84% WP. Las dosis utilizadas correspondieron a las recomendadas por INTA. Luego se evaluó el desarrollo radial micelial durante 15 días. Los resultados obtenidos mostraron que las tres especies de hongos entomopatógenos evaluadas poseen un rango térmico óptimo entre los 20 y 25°C, por lo que se las considera mesófilas. Existió variación intraespecífica en el género *Metarhizium* y una alta plasticidad térmica en el género *Paecilomyces*. Algunas cepas de *Metarhizium* y *Paecilomyces* fueron capaces de desarrollarse a temperaturas superiores a los 24°C. Los resultados de los bioensayos con productos de síntesis química mostraron que, para las tres especies evaluadas, el azufre resultaría inofensivo, el oxiclورو de cobre ligeramente tóxico, el Quinoxifen modernamente tóxico y el Mancozeb tóxico. En ninguna de las cepas evaluadas el efecto de los principios químicos fue fungicida, sino que se observó un efecto fungistático. Asimismo, se observó la capacidad de ciertas cepas de solubilizar al cobre presente en el medio.

2.1 Introducción

Los factores abióticos y bióticos que actúan en un agroecosistema juegan un rol primordial en la viabilidad de los hongos entomopatógenos (HE), por ende, sus efectos son sumamente importantes, y por su implicancia en el posible uso de los HE como bioplaguicidas. Por ello, el éxito en la propuesta de un microorganismo como agente de control biológico en un programa de MIP implica, sobre todos los aspectos, contar con una especie capaz de poder desarrollarse y tener acción patogénica en el agroecosistema donde se empleará (Fargues *et al.*, 1992, 1997; Majchrowicz y Poprawski, 1993; Uma Devi *et al.*, 2005; Rachappa *et al.*, 2007).

Dentro de los factores abióticos que poseen mayor influencia, se cita a la temperatura como la limitante sobre el buen desarrollo de los HE (McClatchie *et al.*, 1994). Fargues *et al.* (1992,1997) hacen hincapié en que el manejo de plagas mediante el uso de HE, requiere de la búsqueda de microorganismos que posean una gama de tolerancia compatible con las condiciones climáticas del agroecosistema donde se utilizarán. Estos mismos autores junto con Uma Devi *et al.* (2005), citan cepas de HE capaces de tolerar temperaturas inferiores a los 15°C para su uso en zonas templadas e indican el interés por seleccionar cepas tolerantes a temperaturas superiores a los 25°C para zonas cálidas.

Las condiciones térmicas son necesarias tanto para el desarrollo vegetativo del hongo como así también para la viabilidad de los propágulos (conidios) y su capacidad infecciosa. McClatchie *et al.* (1994) menciona en su trabajo estudios realizados sobre la viabilidad de los conidios de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, que pocos minutos a 50-70°C son suficientes para afectar letalmente a los conidios de *Beauveria*, mientras que 10 minutos a 49-50°C son suficientes para generar el mismo efecto en *Metarhizium*.

Del mismo modo que con la temperatura, otros factores abióticos son estudiados por su importancia en el desarrollo de los HE. Por ejemplo, diferentes autores listan a la humedad relativa (HR) y a la luz ultravioleta (UV) junto con la temperatura como factores limitantes en la eficacia de la acción patogénica (Yañez y France, 2010; Parker *et al.*, 2015). Asimismo, Yañez y France (2010) hacen mención de otras condiciones que influyen sobre la eficacia de los agentes entomopatógenicos como son el uso de agroquímicos en el sistema y a la existencia y condiciones del hospedero.

En relación al uso de agroquímicos en un agroecosistema donde se plantea el recurrir a agentes de control biológico para el manejo de plagas, Rachappa *et al.* (2007) mencionan que la eficacia en la elección de los HE requiere que haya

compatibilidad con los productos autorizados que se usan para el manejo de plagas, enfermedades y malezas. Martins *et al.* (2012) remarcan a la compatibilidad de los HE con los productos de uso agrícola, como un punto de gran importancia y que debe ser tenido en cuenta por los productores a la hora de realizar cualquier intervención en el cultivo. Por ello es necesario discriminar los efectos que los productos químicos de uso cotidiano pudieran tener sobre los HE (Majchrowicz y Poprawski, 1993).

Para el caso de la viticultura del oeste argentino, los fungicidas resultan los insumos de mayor demanda y empleo por el sector puesto que los mismos, en ciertos casos, actúan con doble propósito al ser utilizados para el control de plagas como los ácaros mediante los tratamientos con azufre.

Teniendo en cuenta lo expuesto, el presente capítulo posee dos objetivos precisos dentro del estudio de cepas nativas de hongos entomopatógenos. Primero, evaluar las características fisiológicas (rangos de temperaturas óptimas de crecimiento) de las cepas de hongos entomopatógenos aisladas y, en segundo lugar, evaluar el efecto de los principales fungicidas utilizados en la viticultura argentina sobre los entomopatógenos aislados.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Estudio de los rangos térmicos de crecimiento

Para cada una de las cepas de HE aisladas se extrajo con un sacabocados de 0,5 cm de diámetro, un trozo de la zona en activo crecimiento de colonias de 7 días de crecimiento a 24°C y oscuridad. Dicho material se repicó en cajas de Petri de 5 cm de diámetro con medio APG (agar 15 g.L⁻¹; caldo de papa 200 g.L⁻¹; glucosa 20 g.L⁻¹), con agregado de estreptomina (50 mg.L⁻¹). Para el estudio se realizaron tres repeticiones por cepa y por cada rango térmico ensayado (4°C, 17°C, 21°C, 24°C y 35°C).

Diariamente se evaluó el desarrollo micelial de la colonia durante 10 días consecutivos y a total oscuridad. Al décimo día, se dio por finalizado el ensayo fotografiaron las cajas de Petri con una cámara Canon© PowerShot G11® a la misma distancia de foco. Las imágenes fueron analizadas por el software AxioVision® de Carl Zeiss© para determinar la superficie en cm² de la colonia al décimo día de crecimiento.

Se analizaron los datos del décimo día mediante el software Infostat 2017p® para determinar la media de crecimiento/cepa en cm² y las diferencias estadísticas mediante un ANOVA y un análisis de las medias por el test LSD Fisher con $\alpha=0,05$.

2.2.2 Estudio de la acción de diferentes fungicidas de síntesis sobre los aislados nativos

Se evaluó la posible acción de diferentes fungicidas de uso vitícola sobre el crecimiento de los aislados nativos de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces*. La técnica empleada fue la del medio de cultivo adicionado con la sustancia problema (Mónaco *et al.*, 2001; Castellanos González *et al.*, 2011).

Para el estudio se seleccionaron 4 productos de síntesis, representantes de las principales familias de fungicidas utilizados en los viñedos de Argentina. Los mismos se utilizaron a las dosis recomendadas por INTA (100 L.ha⁻¹): Quinoxifen 25% SC, Mancozeb 80% WP, Oxicloruro de Cobre 84% WP y Azufre 80% WG.

En cajas de Petri de 5 cm de diámetro, se agregaron 5 mL de medio APG. Mientras el medio aún se encontraba líquido, se adicionó a cada caja 1 mL de las suspensiones acuosas de los fungicidas evaluados a fin que cada fungicida mantuviera la dosis correspondiente en los 6 mL finales. Una vez solidificado el medio, se colocó en el centro de la caja un trozo de medio con hongo estudiado, el cual fue extraído con un sacabocados de 0,5 cm de diámetro de la zona de activo crecimiento de una e colonia de 7 días de edad crecidas a 24°C y oscuridad. Luego las cajas fueron incubadas a 24°C y oscuridad por 10 días. Se realizaron tres

repeticiones por tratamiento y se utilizó un testigo para cada cepa evaluada, al cual al medio se le agregó 1 mL de agua estéril.

Diariamente se marcaba el crecimiento de la colonia y a la finalización del ensayo se fotografiaron las cajas de Petri con una cámara Canon® PowerShot G11®. Las imágenes fueron analizadas por el software AxioVision® de Carl Zeiss® para determinar la superficie en cm² de la colonia al décimo día de crecimiento.

Se determinó el porcentaje de inhibición (%I) entre los periodos de crecimiento evaluados (días) para cada una de las cepas mediante la estimación del crecimiento/cepa en cm²/día para cada tratamiento y su testigo. La ecuación adaptada de Abbot fue:

$$\%I = \frac{Ct_n - CT_n}{Ct_n}$$

Donde (%I) Porcentaje de inhibición, (Ct_n) área en cm² de crecimiento de la colonia testigo en el día *n*, (CT_n) área en cm² de crecimiento de la colonia del tratamiento "x" en el día *n*.

Se ajustó mediante el software Infostat 2017p® un Modelo Lineal Mixto (MLM) donde se consideraron como efectos fijos los tratamientos (fungicida), las cepas (aislados), el tiempo (días) [considerado como covariable] y todas sus interacciones. Asimismo, en el modelo se incluyó un efecto de la unidad experimental (caja de Petri) como aleatorio, que se utilizó para modelar las correlaciones temporales entre observaciones que provienen de una misma unidad experimental en distintos momentos de tiempo. Se consideró un término de error aleatorio con distribución normal.

Las comparaciones estadísticas realizadas a partir del MLM se realizaron mediante un Test DGC ($\alpha= 0,05$) para dos momentos precisos; se comparó el %I en el último día de registro, a fin de estimar diferencias entre cepas y, además, se evaluó el efecto del tratamiento a lo largo del estudio.

Se clasificó la acción de los fungicidas evaluados mediante la escala confeccionada por la Organización Internacional de Lucha Biológica (Viñuela *et al.*, 1993) (Tabla 15) y el %I calculado para el décimo día de crecimiento.

Tabla 14: Clasificación de la acción de los fungicidas según el %I obtenido a los 10 días de incubación

%I	Clasificación
<30	Inofensivo
30-75	Ligeramente tóxico
75-90	Moderadamente tóxico
>90	Tóxico

Fuente: Viñuela *et al.*, 1993

2.3 Resultados

2.3.1 Estudio de los rangos térmicos de crecimiento

A continuación, se muestran los resultados de crecimiento de la colonia de cada cepa de HE aislada obtenidos para cada temperatura ensayada (Tabla 15, 16, 17, 18 y 19). Asimismo, las Figuras 29, 31 y 33 muestran a modo de ejemplo, el crecimiento de una cepa “tipo” para cada género aislado.

Las Figuras 30, 32, 34, 35 y 36 representan a modo gráfico el crecimiento para cada cepa de HE aislada obtenido en las temperaturas ensayadas, respecto al crecimiento medio del género evaluado.

Tabla 15: Valores de media de crecimiento (cm²) en el décimo día de incubación y resultados Test LSD Fisher ($\alpha = 0,05$) para cada una de las cepas evaluadas del género *Beauveria*

<i>Beauveria</i>									
°C	ACA		BsoilAR-4.1(2)		BinsAR-1		BinsAR-2		
	$p < 0,0001$		$p < 0,0001$		$p < 0,0001$		$p < 0,0001$		
4	0,24	A	0,33	A	0,21	A	0,26	A	
17	1,44±0,1	B	6,61±1,2	C	1,21	B	2,69	B	
21	7,62±0,2	D	8,89±1,3	CD	8,83±0,9	D	13,57±1,6	D	
24	4,54±0,3	C	9,97±0,6	D	6,32±0,5	C	10,36±0,9	C	
35	0,31±0,1	A	3,6±0,2	B	0,54	AB	0,11	A	

Dentro de una misma columna, medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

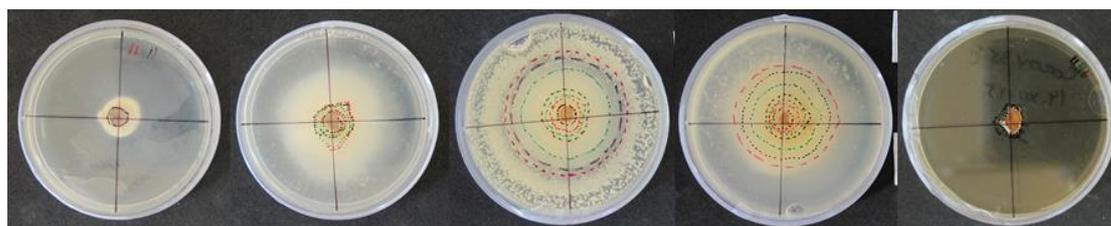


Figura 29: Ejemplo de áreas de crecimiento (cm²) a diferentes temperaturas de la cepa BinsAR-1. (A) 4°C; (B) 17°C; (C) 21°C; (D) 24°C; (E) 35°C.

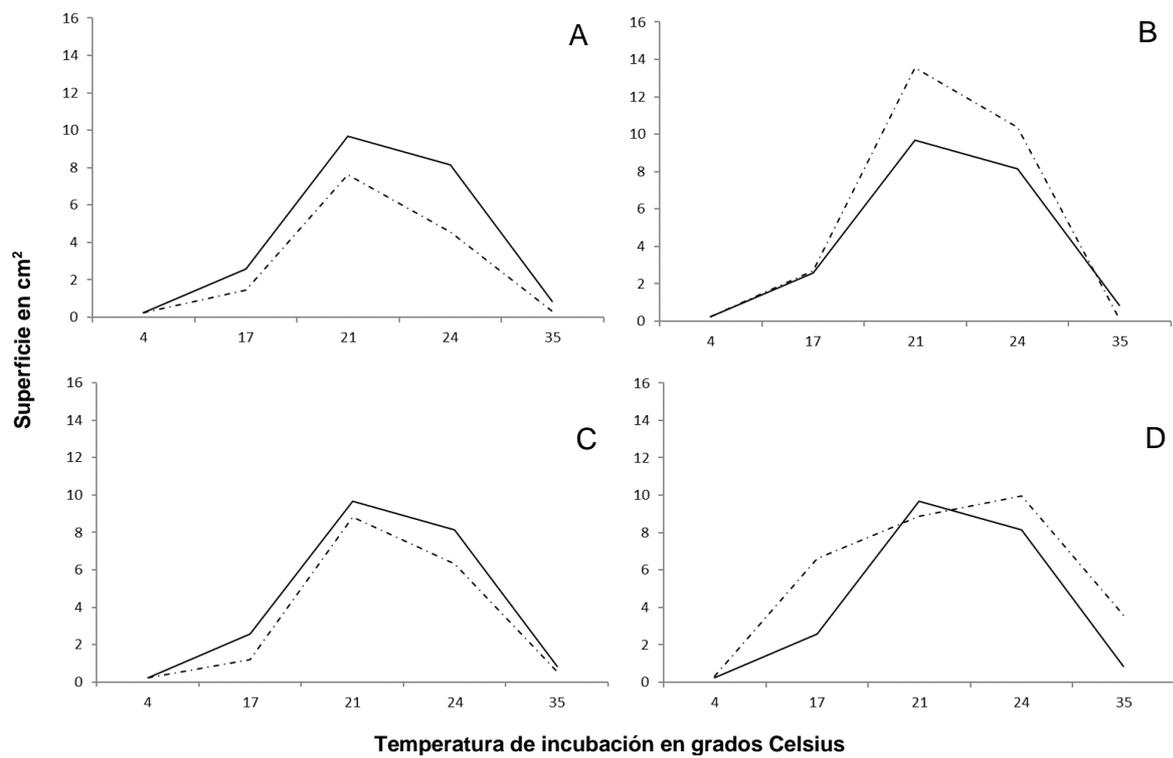


Figura 30: Curvas de crecimiento de las cepas de *Beauveria* respecto a la media del género (primera parte): (A) ACA; (B) BinsAR1; (C) BinsAR2; (D) BsoilAR4.1(2). La línea continua indica el valor medio para todas las cepas aisladas del género *Beauveria*.

Tabla 16: Valores de media de crecimiento (cm²) en el décimo día de incubación y resultados Test LSD Fisher ($\alpha = 0,05$) para cada una de las cepas evaluadas del género *Paecilomyces*

<i>Paecilomyces</i>						
	PsoilAR-4.1(2)		PsoilAR-2.3(4)		PsoilAR-24.3	
	$p < 0,0001$		$p < 0,0001$		$p < 0,0001$	
4°C	0,31	A	0,27	A	0,29	A
17°C	11,13 ± 1,2	B	9,99 ± 0,7	BC	10,23 ± 0,5	C
21°C	16,45 ± 2,5	C	16,68 ± 1,4	D	19,26 ± 1,9	E
24°C	15,6 ± 1,3	C	13,13 ± 1,9	CD	14,53 ± 0,6	D
35°C	8,16 ± 0,4	B	7,75 ± 0,3	B	7,19 ± 0,3	B

Dentro de una misma columna, medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

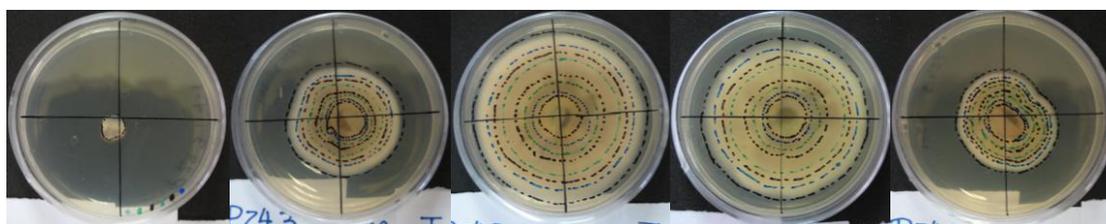


Figura 31: Ejemplo de áreas de crecimiento (cm²) a diferentes temperaturas de la cepa PsoilAR24.3. (A) 4°C; (B) 17°C; (C) 21°C; (D) 24°C; (E) 35°C.

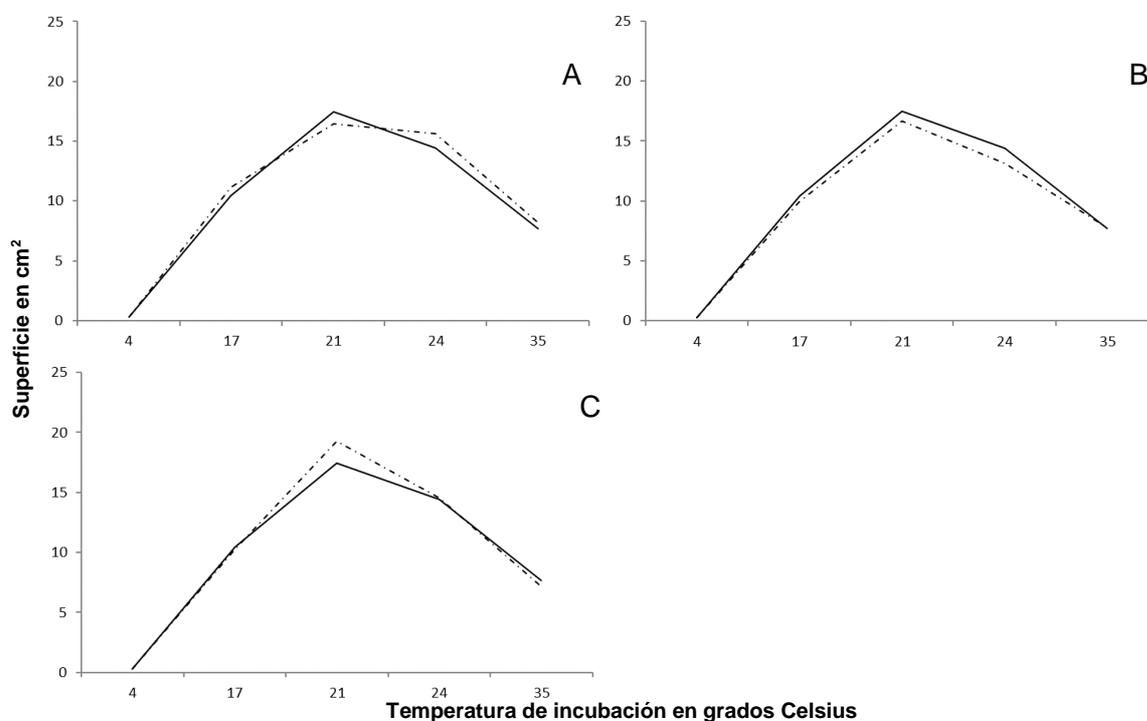


Figura 32: Curvas de crecimiento de las cepas de *Paecilomyces* respecto a la media del género: (A) PsoilAR4.1(2); (B) PsoilAR2.3(4); (C) PsoilAR24.3. La línea continua indica el valor medio para todas las cepas aisladas del género *Paecilomyces*.

Tabla 17: Valores de media de crecimiento (cm²) en el décimo día de incubación y resultados Test LSD Fisher ($\alpha = 0,05$) para cada una de las cepas evaluadas del género *Metarhizium*. Primera parte

Metarhizium																		
	MsoilAR-14.3		MsoilAR-18.5(3)		MsoilAR-2.5(2)		MsoilAR-4.3		MsoilAR-2.3(1)		MsoilAR-2.3(2)		MsoilAR-2.3(4)		MsoilAR-18.5(2)		MsoilAR-10	
	<i>p</i> 0,0001		<i>p</i> 0,0002		<i>p</i> 0,0015		<i>p</i> < 0,0001		<i>p</i> < 0,0001		<i>p</i> 0,0012		<i>p</i> 0,0015		<i>p</i> < 0,0001		<i>p</i> < 0,0001	
4°C	0,18	A	0,24	A	0,24	A	0,20	A	0,19	A	0,24	A	0,17	A	0,27	A	0,31	A
17°C	1,57±0,1	A B	0,97	A	2,15±0,1	A	1,70±0,1	B	1,59	A B	1,57	A	2,17	A	6,33±0,1	B	8,51 ±0,8	B
21°C	8,81±0,9	C	3,77±0,9	B	11,95±3,3	B	5,80±0,3	D	12,02±1	C	8,12±2	B	9,95±2,4	B	7,98±0,2	C	11,79 ±0,6	C
24°C	7,33±1,6	C	5,45±0,8	C	9,00±0,7	B	4,91±0,4	C	12,65±0,9	C	9,10±1,8	B	10,72±2,3	B	8,29±0,5	C	12,13±0,4	C
35°C	3,61±0,2	B	2,92±0,1	B	3,18±0,6	A	2,48±0,3	B	2,74±0,2	B	3,85±0,2	A	3,07±0,2	A	10,63±0,1	D	11,12±0,2	C

Dentro de una misma columna, medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 18: Valores de media de crecimiento (cm²) en el décimo día de incubación y resultados Test LSD Fisher ($\alpha = 0,05$) para cada una de las cepas evaluadas del género *Metarhizium*. Segunda parte

Metarhizium																		
	MsoilAR-15.1		MsoilAR-15.3		MsoilAR-15.7		MsoilAR-16.1		MsoilAR-16.3		MsoilAR-16.7		MsoilAR-16.8		MsoilAR-16.9		MsoilAR-16.10	
	<i>p</i> < 0,0001		<i>p</i> < 0,0001		<i>p</i> < 0,0001		<i>p</i> < 0,0001		<i>p</i> < 0,0001		<i>p</i> < 0,0001		<i>p</i> < 0,0001		<i>p</i> < 0,0001		<i>p</i> < 0,0001	
4°C	0,32	A	0,29	A	0,22	A	0,29	A	0,23	A	0,23	A	0,27	A	0,27	A	0,23	A
17°C	10,53±0,1	B	7,82±0,7	B	6,50±0,3	B	7,34±0,4	B	8,62±0,3	BC	7,46±0,6	BC	7,19±0,2	B	7,19±0,5	B	7,76±0,6	B
21°C	12,41±3	B	9,08±0,7	B	8,16±0,3	C	9,65±0,5	C	14,34±0,4	D	10,82±0,8	D	12,73±1,8	D	12,73±0,6	D	9,45±0,8	C
24°C	14,31±0,2	B	9,28±1,2	B	8,87±0,6	C	9,24±0,6	C	9,28±0,3	C	8,29±0,1	C	9,64±0,2	BC	9,64±0,5	BC	9,87±0,5	C
35°C	3,65±0,3	A	9,38±0,7	B	11,06±0,4	D	11,50±0,1	D	7,89±0,2	B	6,81±0,2	B	12,15±0,4	CD	12,15±0,4	CD	12,75±0,3	D

Dentro de una misma columna, medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 19: Valores de media de crecimiento (cm²) en el décimo día de incubación y resultados Test LSD Fisher ($\alpha = 0,05$) para cada una de las cepas evaluadas del género *Metarhizium*. Tercera parte.

<i>Metarhizium</i>										
	MsoilAR-17.2		MsoilAR-17.4		MsoilAR-17.5		MsoilAR-17.7		MsoilAR-17.9	
	$p < 0,0001$		$p < 0,0001$		$p < 0,0001$		$p < 0,0001$		$p < 0,0001$	
4°C	0,28	A	0,28	A	0,27	A	0,27	A	0,23	A
17°C	9,55±0,5	B	9,59±0,3	B	8,11±0,6	B	9,64±0,7	B	13,41±0,7	BC
21°C	14,52±0,9	D	11,54±0,4	C	11,98±1,2	C	17,11±1,3	D	15,69±0,4	C
24°C	10,08±0,8	BC	11,76±0,3	C	11,30±0,6	C	11,42±0,5	BC	11,42±1,7	B
35°C	11,93±0,4	C	11,54±0,3	C	12,62±0,4	C	12,89±0,1	C	12,24±0,5	B

Dentro de una misma columna, medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

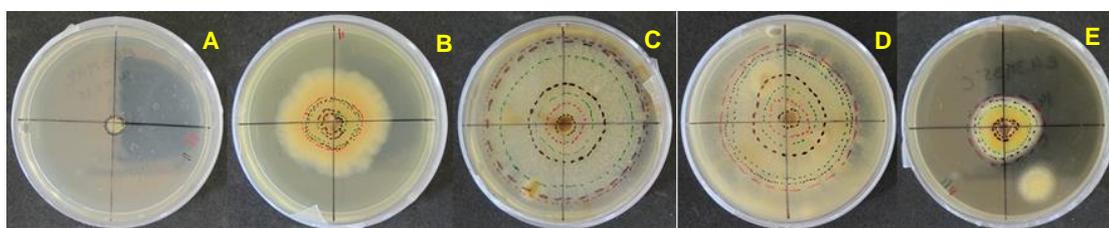


Figura 33: Ejemplo de áreas de crecimiento (cm²) a diferentes temperaturas de la cepa MsoilAR-4.3. (A) 4°C; (B) 17°C; (C) 21°C; (D) 24°C; (E) 35°C.

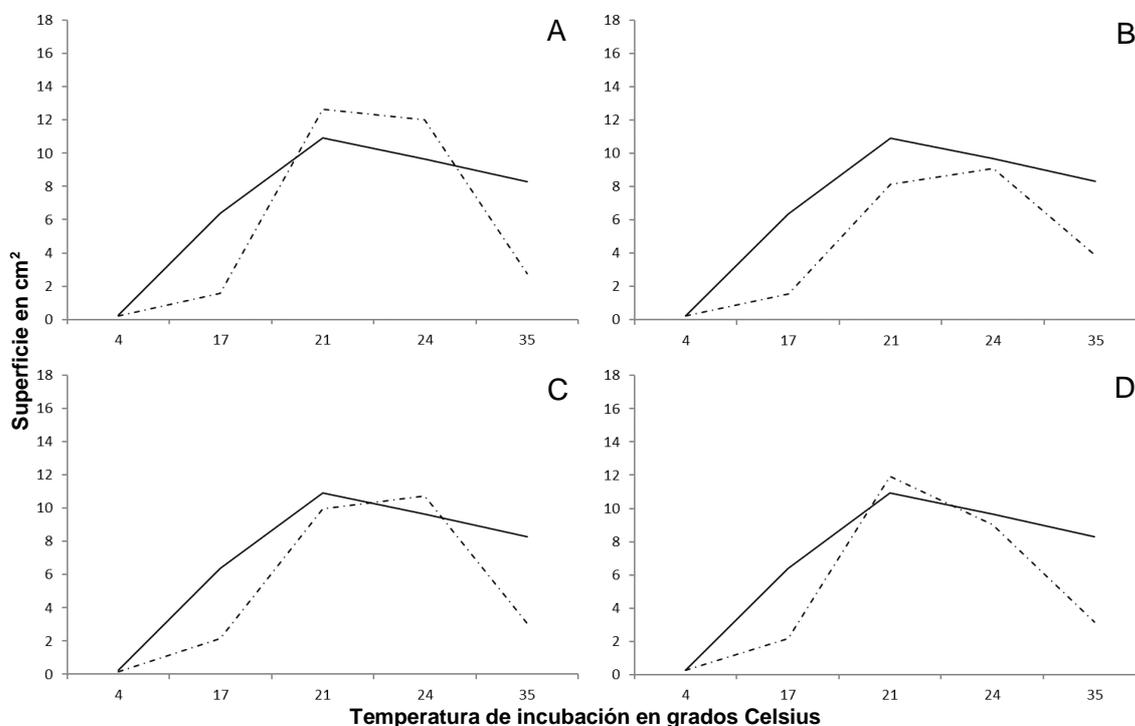


Figura 34: Curvas de crecimiento de las cepas de *Metarhizium* respecto a la media del género (Primera parte): (A) MsoilAR2.3(1); (B) MsoilAR2.3(2); (C) MsoilAR2.3(4); (D) MsoilAR2.5(2). La línea continua indica el valor medio para todas las cepas aisladas del género *Metarhizium*.

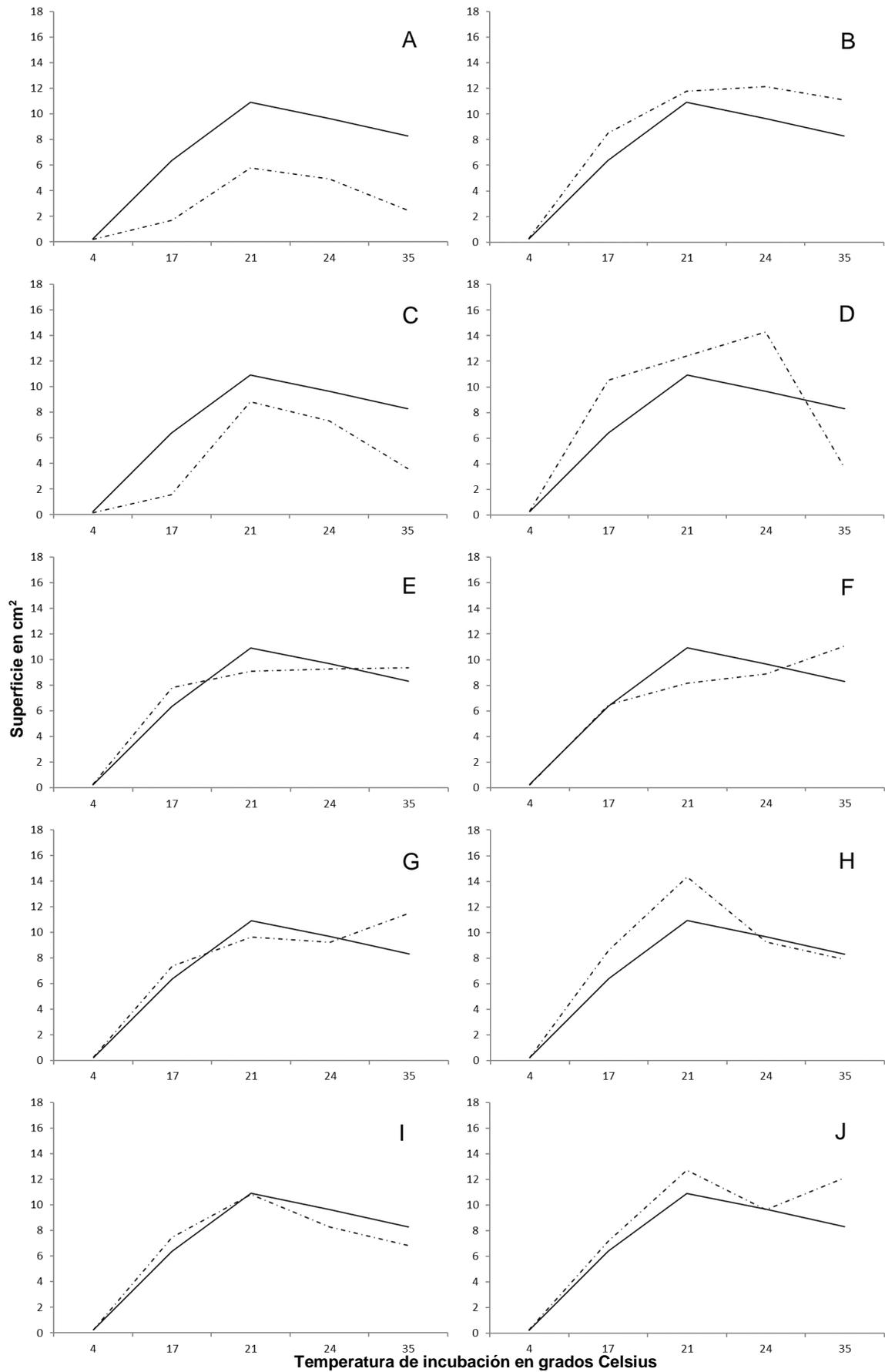


Figura 35: Curvas de crecimiento de las cepas de *Metarhizium* respecto a la media del género (segunda parte): (A) MsoilAR4.3; (B) MsoilAR10; (C) MsoilAR15.1; (D) MsoilAR15.1; (E) MsoilAR15.3; (F) MsoilAR15.7; (G) MsoilAR16.1; (H) MsoilAR16.3; (I) MsoilAR16.7; (J) MsoilAR16.8 La línea continua indica el valor medio para todas las cepas aisladas del género *Metarhizium*.

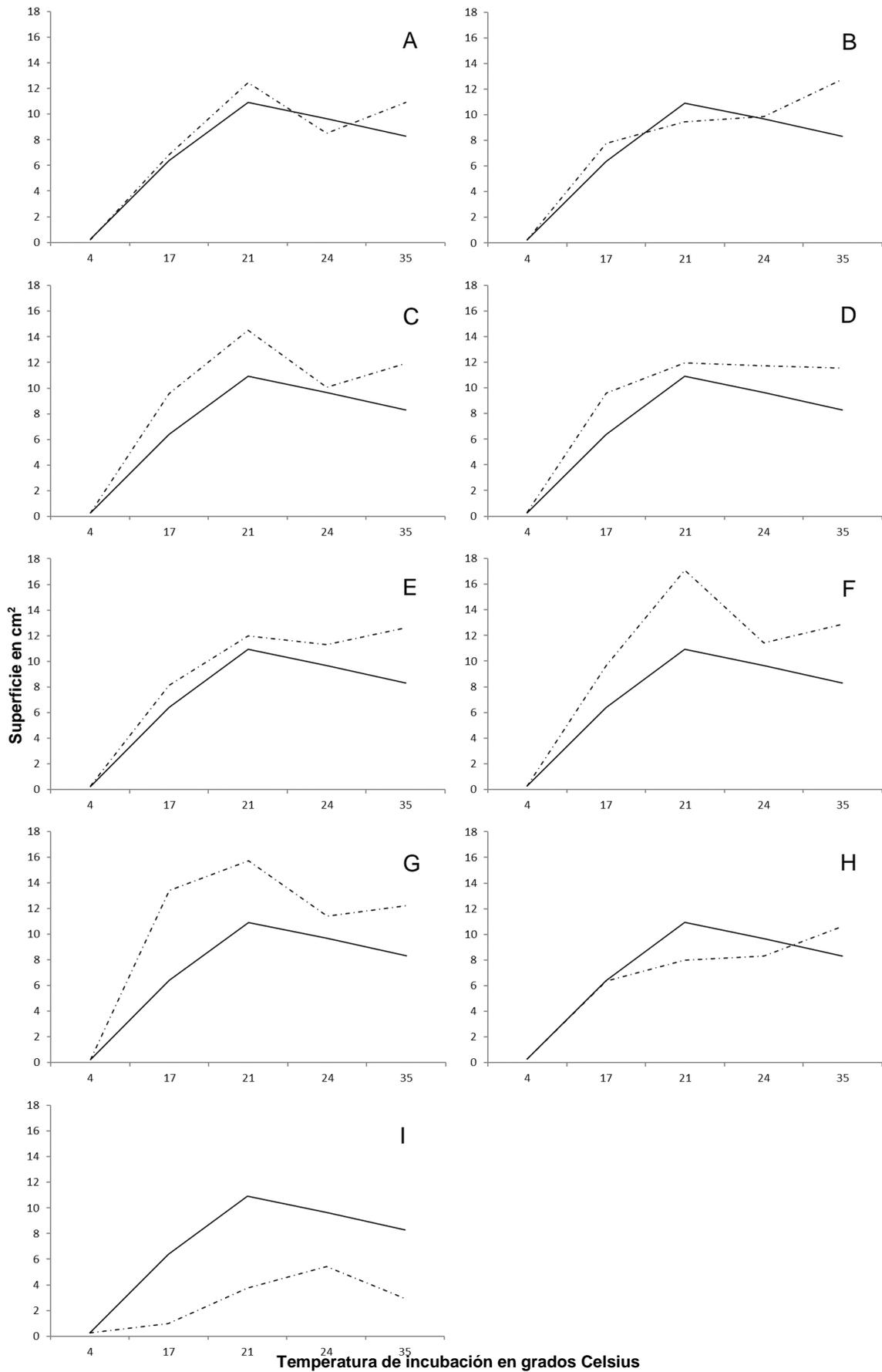


Figura 36: Curvas de crecimiento de las cepas de *Metarhizium* respecto a la media del género (tercera parte): (A) MsoilAR16.9; (B) MsoilAR16.10; (C) MsoilAR17.2; (D) MsoilAR17.4; (E) MsoilAR17.5; (F) MsoilAR17.7; (G) MsoilAR17.8; (H) MsoilAR18.5(2); (I) MsoilAR18.5(3). La línea continua indica el valor medio para todas las cepas aisladas del género *Metarhizium*.

Los resultados de crecimiento de la colonia de cada género de HE estudiado, obtenidos para cada temperatura ensayada son mostrados en las Tablas 21, 22, y 23.

Las Tablas 23, 24, 25, 26 y 27 muestran los resultados obtenidos de los análisis estadísticos efectuados (Test LSD Fisher) para los tres géneros en cada temperatura evaluada.

Tabla 20: Resultados obtenidos del Test LSD Fisher ($\alpha=0,05$) para los distintos Tratamientos ($p < 0,0001$) para el género *Beauveria* en función a la media del tamaño de la colonia (cm^2)

TRATAMIENTO (°C)	MEDIA (cm^2)	TEST LSD Fisher ($\alpha=0,05$)
4	0,25±0,01	A
17	2,59±0,49	B
21	9,67±0,68	D
24	8,15±0,77	C
35	0,84±0,3	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 21: Resultados obtenidos del Test LSD Fisher ($\alpha=0,05$) para los distintos Tratamientos ($p < 0,0001$) para el género *Paecilomyces* en función a la media del tamaño de la colonia (cm^2)

TRATAMIENTO (°C)	MEDIA (cm^2)	TEST LSD Fisher ($\alpha=0,05$)
4	0,29±0,01	A
17	10,45±0,47	C
21	17,46±1,08	E
24	14,42±0,79	D
35	7,70±0,23	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 22: Resultados obtenidos del Test LSD Fisher ($\alpha=0,05$) para los distintos Tratamientos ($p < 0,0001$) para el género *Metarhizium* en función a la media del tamaño de la colonia (cm^2)

TRATAMIENTO (°C)	MEDIA (cm^2)	TEST LSD Fisher ($\alpha=0,05$)
4	0,25±0,01	A
17	6,39±0,42	B
21	10,92±0,44	E
24	9,66±0,3	D
35	8,30±0,49	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 23: Resultados obtenidos del Test LSD Fisher ($\alpha=0,05$) para el Tratamiento a 4°C ($p > 0,0268$) para para todos los géneros en función a la media del tamaño de la colonia (cm²)

GENERO	MEDIA (cm ²)	TEST LSD Fisher ($\alpha=0,05$)
<i>Beauveria</i>	0,25±0,01	A
<i>Metarhizium</i>	0,25±0,01	A
<i>Paecilomyces</i>	0,29±0,01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 24: Resultados obtenidos del Test LSD Fisher ($\alpha=0,05$) para el Tratamiento a 17°C ($p < 0,0001$) para para todos los géneros en función a la media del tamaño de la colonia (cm²)

GENERO	MEDIA (cm ²)	TEST LSD Fisher ($\alpha=0,05$)
<i>Beauveria</i>	2,59±0,49	A
<i>Metarhizium</i>	6,39±0,47	B
<i>Paecilomyces</i>	10,45±0,42	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 25: Resultados obtenidos del Test LSD Fisher ($\alpha=0,05$) para el Tratamiento a 21°C ($p < 0,0001$) para para todos los géneros en función a la media del tamaño de la colonia (cm²)

GENERO	MEDIA (cm ²)	TEST LSD Fisher ($\alpha=0,05$)
<i>Beauveria</i>	9,67±0,68	A
<i>Metarhizium</i>	10,92±1,08	A
<i>Paecilomyces</i>	17,46±0,44	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 26: Resultados obtenidos del Test LSD Fisher ($\alpha=0,05$) para el Tratamiento a 24°C ($p < 0,0001$) para para todos los géneros en función a la media del tamaño de la colonia (cm²)

GENERO	MEDIA (cm ²)	TEST LSD Fisher ($\alpha=0,05$)
<i>Beauveria</i>	8,15±0,77	A
<i>Metarhizium</i>	9,66±0,79	B
<i>Paecilomyces</i>	14,42±0,3	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 27: Resultados obtenidos del Test LSD Fisher ($\alpha=0,05$) para el Tratamiento a 35°C ($p < 0,0001$) para para todos los géneros en función a la media del tamaño de la colonia (cm²)

GENERO	MEDIA (cm ²)	TEST LSD Fisher ($\alpha=0,05$)
<i>Beauveria</i>	0,84±0,3	A
<i>Metarhizium</i>	7,70±0,23	B
<i>Paecilomyces</i>	8,30±0,49	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

2.3.2 Estudio de la acción de diferentes fungicidas de síntesis sobre los aislados

A continuación, se muestran los resultados de porcentaje de inhibición (%) para cada cepa de HE aislada en los tratamientos empleados (Tabla 28, 30, 32, 34 y 36). Asimismo, las Tablas 29, 31, 33, 35 y 37 muestran la clasificación de la acción de los fungicidas según el %.

Las Figuras 37 y 40 muestran, a modo de ejemplo, el crecimiento a los 10 días de incubación para una cepa del género *Beauveria* y una para el género *Metarhizium*. Las Figuras 38, 39, 41, 42 y 43 representan a modo gráfico el % de cada tratamiento para cada cepa de HE aislada a lo largo de los 10 días de incubación.

Tabla 28: Valores de media de porcentaje de inhibición (%) a los 10 días de incubación y resultados Test DGC ($\alpha = 0,05$) para cada una de las cepas evaluadas del género *Beauveria*

Beauveria									
	ACA		BsoilAR-4.1(2)		BinsAR-1		BinsAR-2		
	$p < 0,0502$		$p < 0,0001$		$p < 0,0001$		$p < 0,0001$		
Azufre	0,38	A	0,01	A	(0,09)	A	0,04	A	
Quinoxifen	0,40	A B	0,44	B	0,07	A	0,45	C	
Mancozeb	0,88	BC	0,92	C	0,92	B	0,94	D	
Oxi. de Cu	0,93	C	0,37	B	0,76	B	0,35	B	

Dentro de una misma columna, medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 29: Clasificación de la acción de los fungicidas según el % obtenido a los 10 días de incubación para cada una de las cepas evaluadas del género *Beauveria*

Beauveria				
	ACA	BsoilAR-4.1(2)	BinsAR-1	BinsAR-2
Azufre	+	-	-	-
Quinoxifen	+	+	-	+
Mancozeb	++	+++	+++	+++
Oxi. de Cu	+++	+	++	+

Valores: (-) Inofensivo, (+) Ligeramente tóxico, (++) Moderadamente tóxico, (+++) Tóxico

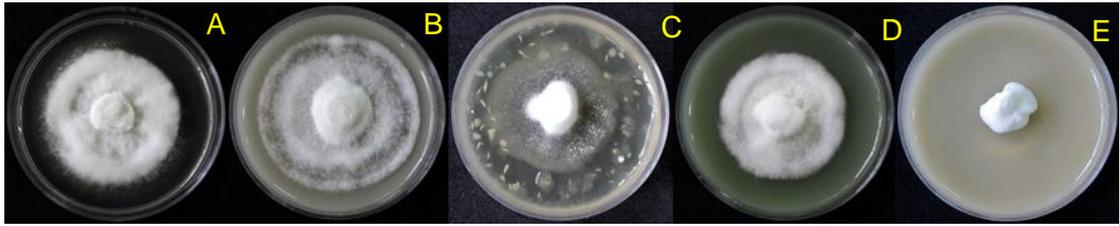


Figura 37: Ejemplo de áreas de crecimiento (cm^2) en los diferentes tratamientos para la cepa BsoilAR-4.1(2). (A) Testigo; (B) Azufre; (C) Quinoxifen; (D) Oxicloruro de Cobre; (E) Mancozeb.

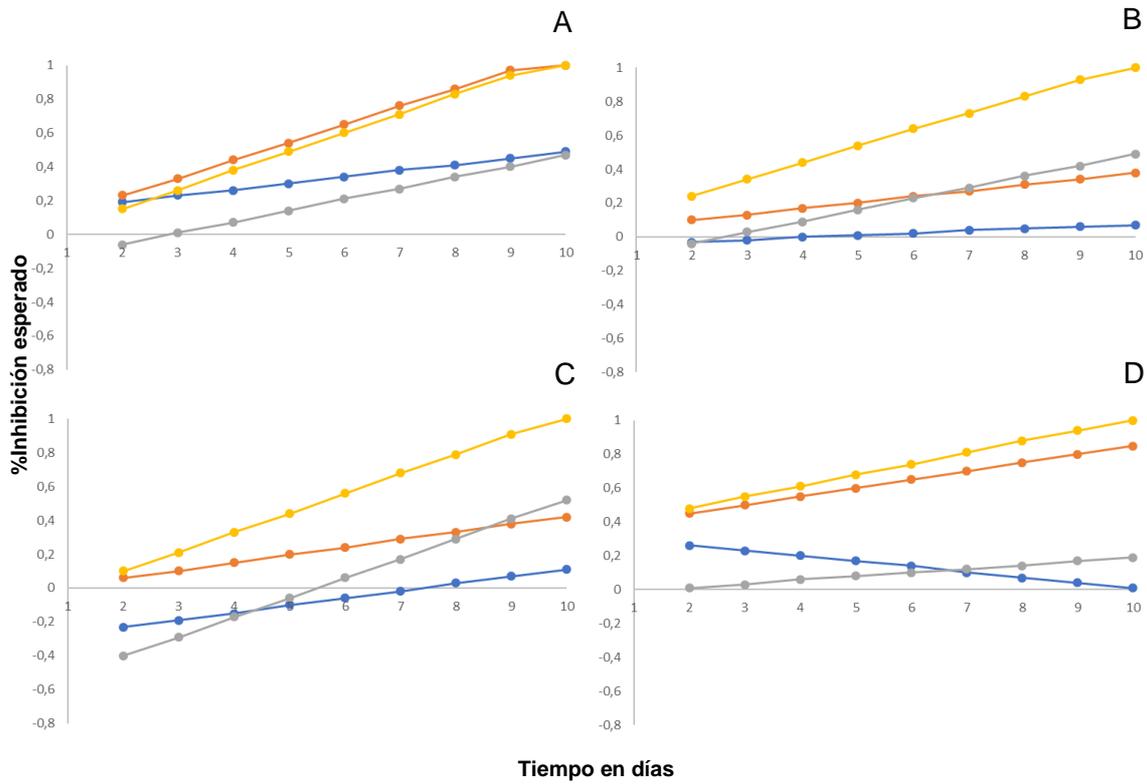


Figura 38: Gráficos de correlación entre el efecto de inhibición (%) y el tiempo (días) para cada tratamiento: Azulfre (azul), Quinoxifen (gris), Oxidocloruro de cobre (naranja), Mancozeb (amarillo). (A) ACA; (B) BinsAR2; (C) CCH y (D) BsoilAR4.1(2). Los valores de %I representan los valores estimados mediante el MLM ejecutado, valores negativos indican posibles efectos sinérgicos.

Tabla 30: Valores de media de porcentaje de inhibición (%) a los 10 días de incubación y resultados Test DGC ($\alpha = 0,05$) para cada una de las cepas evaluadas del género *Paecilomyces*

Paecilomyces						
	PsoilAR-4.1(2)		PsoilAR-2.3(4)		PsoilAR-24.3	
	$p < 0,0002$		$p < 0,0001$		$p < 0,0001$	
Azufre	0,53	A	0,42	A	0,31	A
Quinoxifen	0,89	B	0,83	B	0,78	B
Mancozeb	0,98	B	0,97	C	0,97	B
Oxicloruro de Cu	0,53	A	0,42	A	0,33	A

Dentro de una misma columna, medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 31: Clasificación de la acción de los fungicidas según el %I obtenido a los 10 días de incubación para cada una de las cepas evaluadas del género *Paecilomyces*

Paecilomyces			
	PsoilAR-4.1(2)	PsoilAR-2.3(4)	PsoilAR-24-3
Azufre	+	+	+
Quinoxifen	++	++	++
Mancozeb	+++	+++	+++
Oxicloruro de Cu	+	+	+

Valores: (-) Inofensivo, (+) Ligeramente tóxico, (++) Moderadamente tóxico, (+++) Tóxico

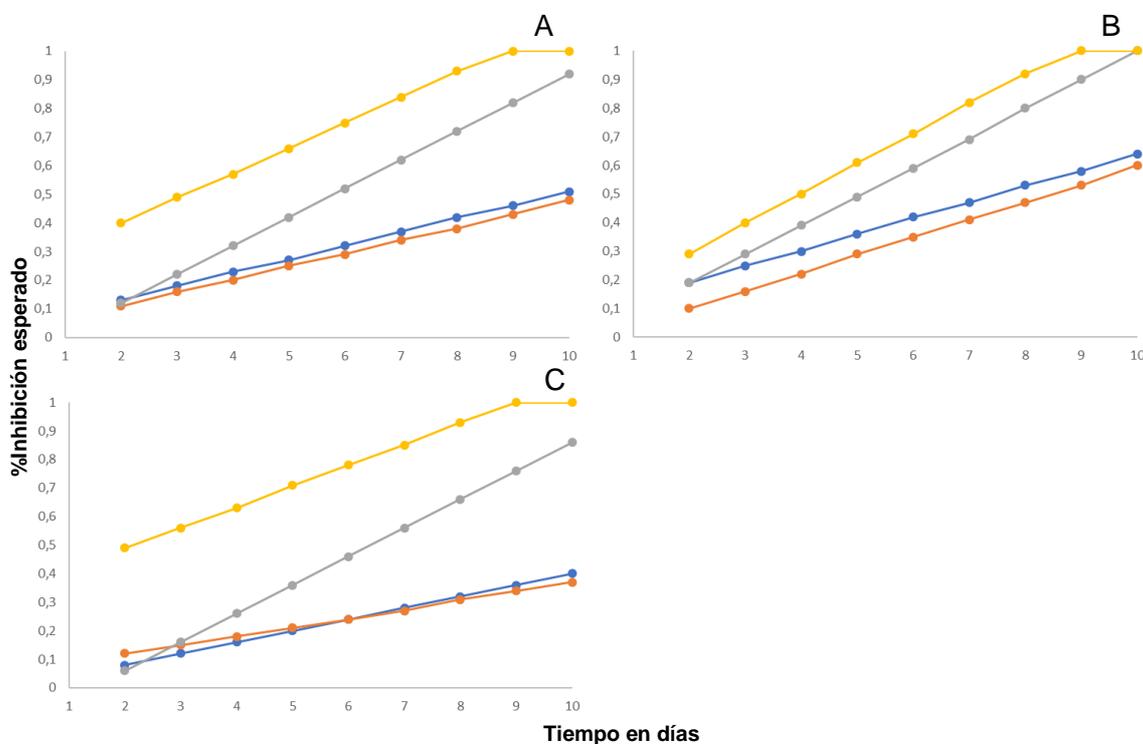


Figura 39: Gráficos de correlación entre el efecto de inhibición (%) y el tiempo (días) para cada tratamiento: Azufre (azul), Quinoxifen (gris), Oxicloruro de cobre (naranja), Mancozeb (amarillo). (A) PsoilAR2.3(4); (B) PsoilAR4.1(2) y (C) PsoilAR24.3. Los valores de %I representan los valores estimados mediante el MLM ejecutado, valores negativos indican posibles efectos sinérgicos.

Tabla 32: Valores de media de porcentaje de inhibición (%) a los 10 días de incubación y resultados Test DGC ($\alpha = 0,05$) para cada una de las cepas evaluadas del género *Metarhizium*. Primera parte

Metarhizium																		
	MsoilAR-14.3		MsoilAR-18.5(3)		MsoilAR-2.5(2)		MsoilAR-4.3		MsoilAR-2.3(1)		MsoilAR-2.3(2)		MsoilAR-2.3(4)		MsoilAR-18.5(2)		MsoilAR-10	
	$p < 0,0008$		$p < 0,0119$		$p < 0,0001$		$p < 0,0002$		$p < 0,0021$		$p < 0,0178$		$p < 0,0248$		$p < 0,0053$		$p < 0,001$	
Azufre	0,41	A	0,19	A	0,20	B	(0,13)	A	0,35	A	0,46	A	0,47	A	0,45	A	0,12	A
Quinoxifen	0,79	B	0,95	B	0,45	C	0,36	B	0,86	B	0,95	B	0,95	B C	0,95	B	0,94	C
Mancozeb	0,89	B	0,94	B	0,89	D	0,87	C	0,91	B	0,97	B	0,97	C	0,88	B	0,93	C
Oxi. de Cu	0,15	A	0,48	A	(0,04)	A	0,16	B	0,37	A	0,46	A	0,62	A B	0,39	A	0,22	B

Dentro de una misma columna, medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 33: Clasificación de la acción de los fungicidas según el %I obtenido a los 10 días de incubación para cada una de las cepas evaluadas del género *Metarhizium*. Primera parte

Metarhizium									
	MsoilAR-14.3	MsoilAR-18.5(3)	MsoilAR-2.5(2)	MsoilAR-4.3	MsoilAR-2.3(1)	MsoilAR-2.3(2)	MsoilAR-2.3(4)	MsoilAR-18.5(2)	MsoilAR-10
Azufre	+	-	-	-	+	+	+	+	-
Quinoxifen	++	+++	+	+	++	+++	+++	+++	+++
Mancozeb	++	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+++
Oxi. de Cu	-	+	-	-	+	+	+	+	-

Valores: (-) Inofensivo, (+) Ligeramente tóxico, (++) Moderadamente tóxico, (+++) Tóxico

Tabla 34: Valores de media de porcentaje de inhibición (%) a los 10 días de incubación y resultados Test DGC ($\alpha = 0,05$) para cada una de las cepas evaluadas del género *Metarhizium*. Segunda parte.

Metarhizium																
	MsoilAR-15.1		MsoilAR-15.3		MsoilAR-15.7		MsoilAR-16.1		MsoilAR-16.3		MsoilAR-16.7		MsoilAR-16.8		MsoilAR-16.9	
	$p < 0,0001$		$p < 0,0001$		$p < 0,0001$		$p 0,0004$		$p 0,0005$		$p 0,0299$		$p 0,0329$		$p 0,0001$	
Azufre	(0,24)	A	(0,14)	A	(0,02)	A	0,43	A	0,18	A	0,40	A	0,45	A	0,23	A
Quinoxyfen	0,90	C	0,90	C	0,91	B	0,84	B	0,85	C	0,85	B	0,82	B C	0,80	B
Mancozeb	0,88	C	0,90	C	0,91	B	0,86	B	0,88	C	0,84	B	0,87	C	0,90	B
Oxi. de Cu	0,53	B	0,26	B	0,01	A	0,37	A	0,46	B	0,67	A B	0,51	A B	0,41	A

Dentro de una misma columna, medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 35: Clasificación de la acción de los fungicidas según el %I obtenido a los 10 días de incubación para cada una de las cepas evaluadas del género *Metarhizium*. Segunda parte

Metarhizium								
	MsoilAR-15.1	MsoilAR-15.3	MsoilAR-15.7	MsoilAR-16.1	MsoilAR-16.3	MsoilAR-16.7	MsoilAR-16.8	MsoilAR-16.9
Azufre	-	-	-	+	-	+	+	-
Quinoxyfen	++	++	+++	++	++	++	++	++
Mancozeb	++	++	+++	++	++	++	++	++
Oxi. de Cu	+	-	-	+	+	+	+	+

Valores: (-) Inofensivo, (+) Ligeramente tóxico, (++) Moderadamente tóxico, (+++) Tóxico

Tabla 36: Valores de media de porcentaje de inhibición (%) a los 10 días de incubación y resultados Test DGC ($\alpha = 0,05$) para cada una de las cepas evaluadas del género *Metarhizium*. Tercera parte.

Metarhizium												
	MsoilAR-16.10		MsoilAR-17.2		MsoilAR-17.4		MsoilAR-17.5		MsoilAR-17.7		MsoilAR-17.9	
	$p < 0,001$		$p 0,0006$		$p < 0,001$		$p 0,0073$		$p < 0,001$		$p < 0,001$	
Azufre	0,11	A	0,06	A	0,10	A	0,22	A	0,16	A	0,36	A
Quinoxifen	0,94	C	0,73	B	0,92	B	0,92	B	0,89	B	0,89	B
Mancozeb	0,95	C	0,87	B	0,97	B	0,89	B	0,97	B	0,93	B
Oxi. de Cu	0,22	B	0,34	A	0,28	A	0,51	A	0,11	A	0,41	A

Dentro de una misma columna, medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 37: Clasificación de la acción de los fungicidas según el %I obtenido a los 10 días de incubación para cada una de las cepas evaluadas del género *Metarhizium*. Tercera parte.

Metarhizium						
	MsoilAR-16.10	MsoilAR-17.2	MsoilAR-17.4	MsoilAR-17.5	MsoilAR-17.7	MsoilAR-17.9
Azufre	-	-	-	-	-	+
Quinoxifen	+++	+	+++	+++	++	++
Mancozeb	+++	++	+++	++	+++	+++
Oxi. de Cu	-	+	-	+	-	+

Valores: (-) Inofensivo, (+) Ligeramente tóxico, (++) Moderadamente tóxico, (+++) Tóxico



Figura 40: Ejemplo de áreas de crecimiento (cm^2) en los diferentes tratamientos para la cepa MsoilAR-4.3. (A) Testigo; (B) Azufre; (C) Quinoxifen; (D) Oxidicloruro de Cobre; (E) Mancozeb.

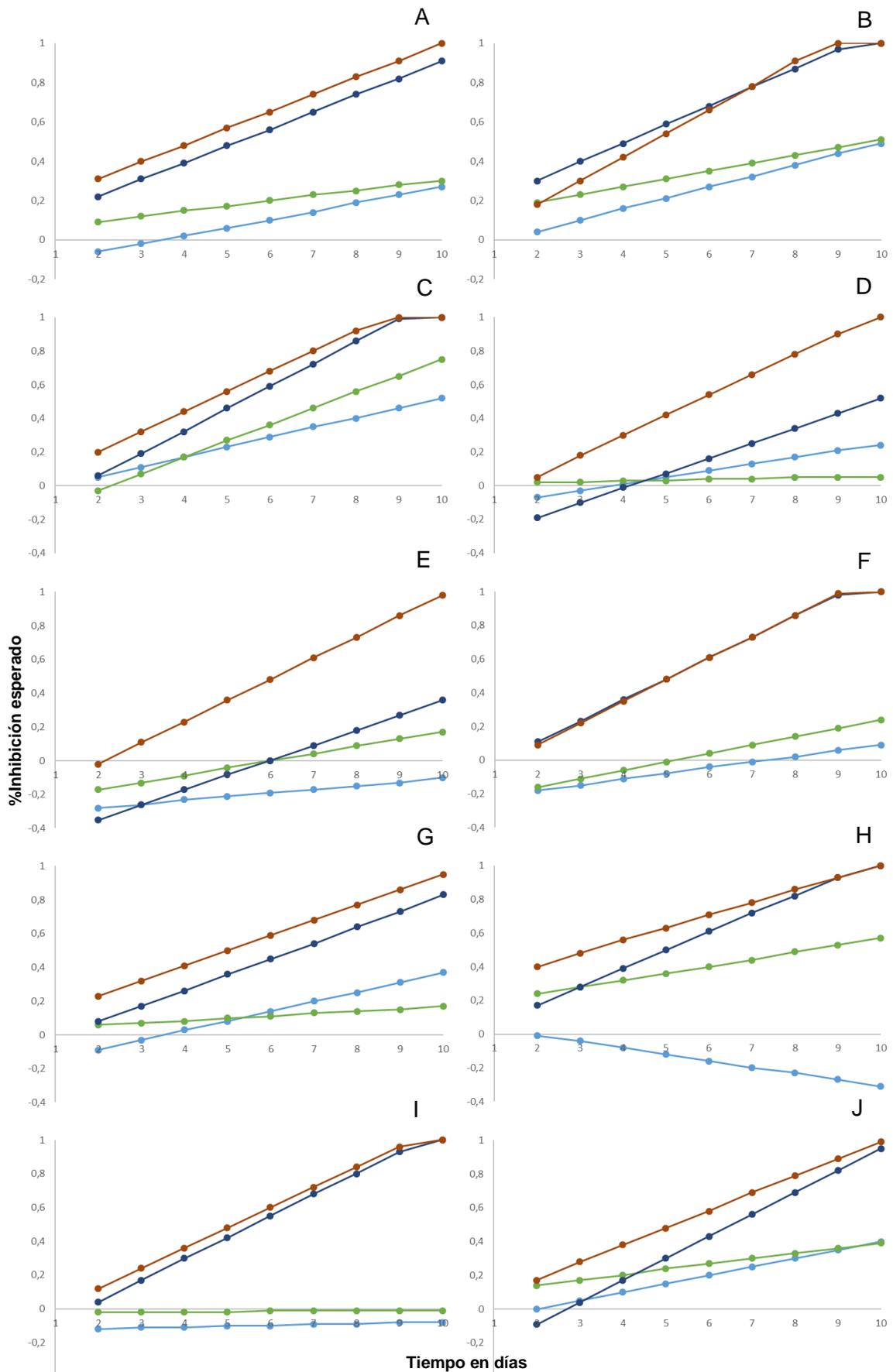


Figura 41: Gráficos de correlación entre el efecto de inhibición (%) y el tiempo (días) para cada tratamiento: Azulfre (celeste), Quinoxifen (azul), Oxicloruro de cobre (verde), Mancozeb (marrón). (A) MsoilAR2.3(1), (B) MsoilAR2.3(2), (C) MsoilAR2.3(4), (D) MsoilAR2.5(2), (E) MsoilAR4.3, (F) MsoilAR10, (G) MsoilAR14.3, (H) MsoilAR15.1, (I) MsoilAR15.7 y (J) MsoilAR16.1. Los valores de % representan los valores estimados mediante el MLM ejecutado, valores negativos indican posibles efectos sinérgicos.

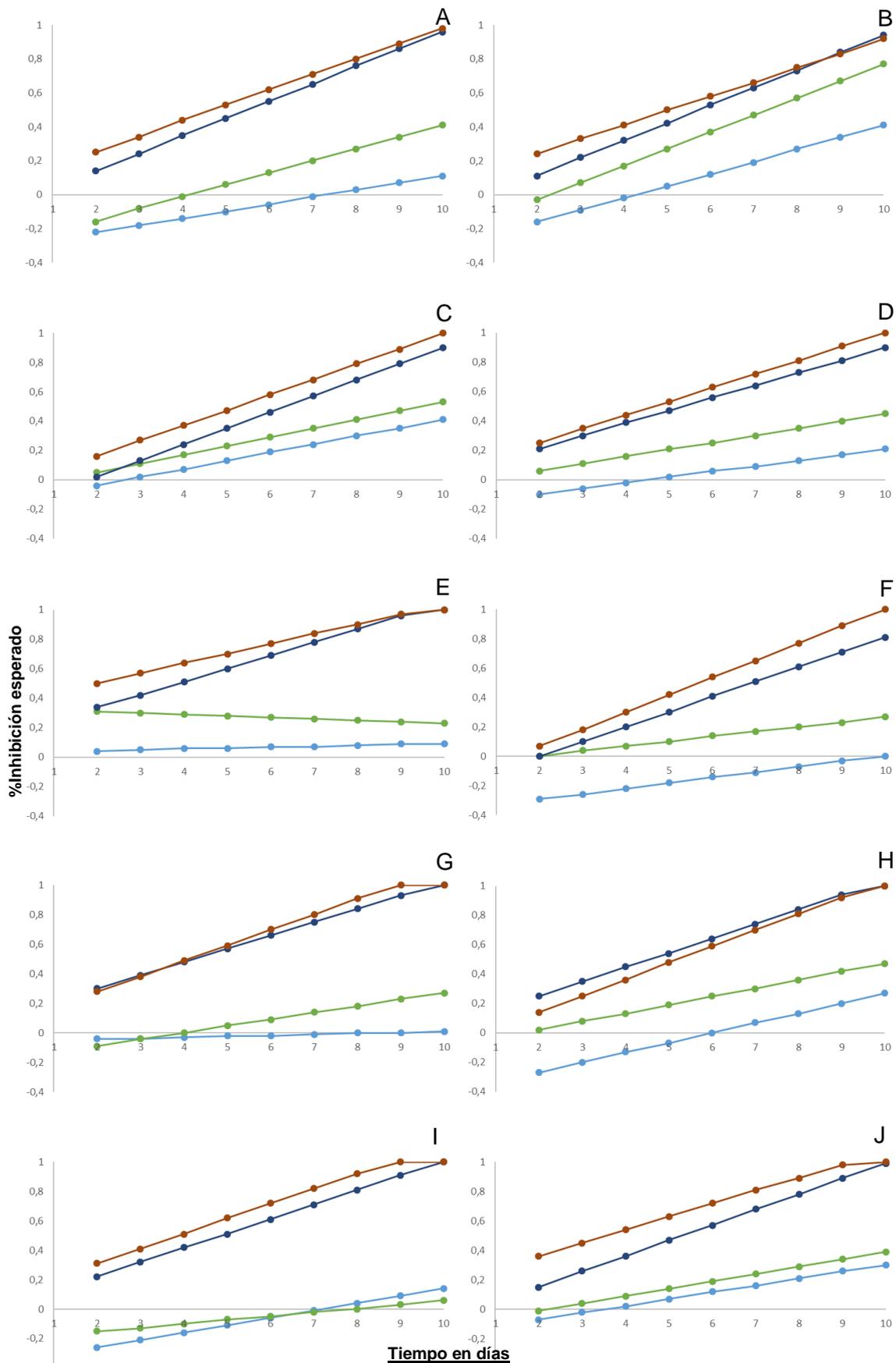


Figura 42: Gráficos de correlación entre el efecto de inhibición (%) y el tiempo (días) para cada tratamiento: Azulfre (celestes), Quinoxifen (azul), Oxicloruro de cobre (verde), Mancozeb (marrón). (A) MsoilAR16.3, (B) MsoilAR16.7, (C) MsoilAR16.8, (D) MsoilAR16.9, (E) MsoilAR16.10, (F) MsoilAR17.2, (G) MsoilAR17.4, (H) MsoilAR17.5, (I) MsoilAR17.7 y (J) MsoilAR17.9. Los valores de %I representan los valores estimados mediante el MLM ejecutado, valores negativos indican posibles efectos sinérgicos.

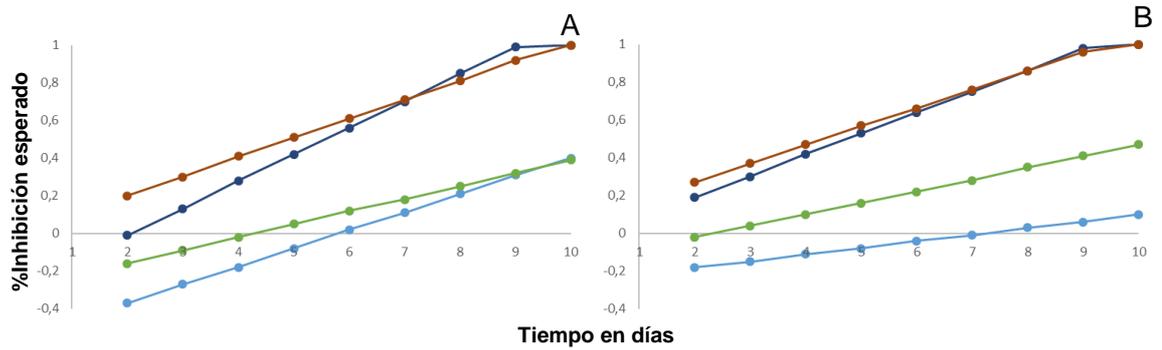


Figura 43: Gráficos de correlación entre el efecto de inhibición (%) y el tiempo (días) para cada tratamiento: Azufre (celeste), Quinoxifen (azúl), Oxicloruro de cobre (verde), Mancozeb (marrón). (A) MsoilAR18.5(2), (B) MsoilAR18.5(3). Los valores de %I representan los valores estimados mediante el MLM ejecutado, valores negativos indican posibles efectos sinérgicos.

En la Figura 44 se muestran los resultados obtenidos mediante el MLM Test DGC ($\alpha= 0,05$) para la interacción CEPA x TRATAMIENTO a lo largo de todo el ensayo.

CEPA:TRATAMIENTO

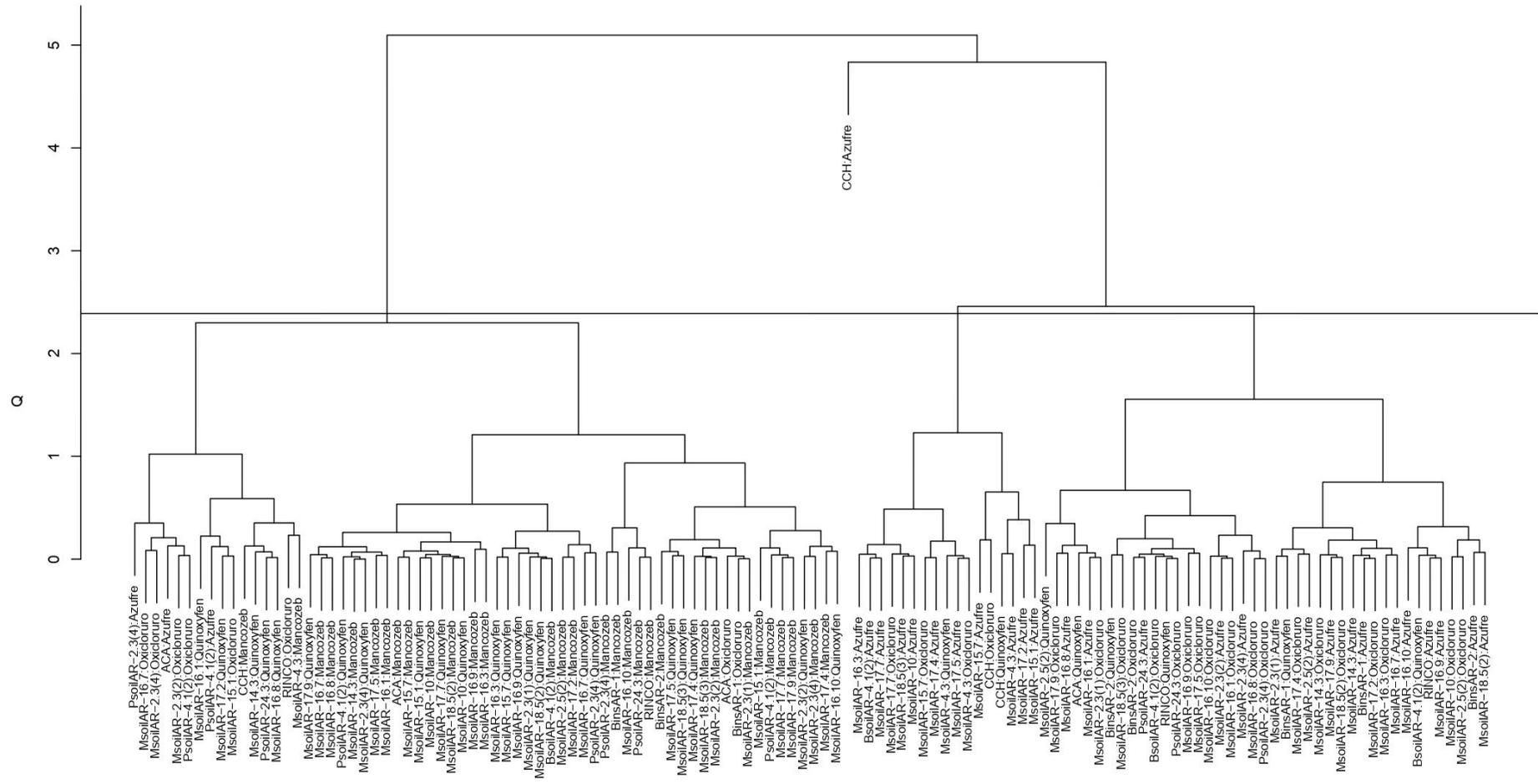


Figura 44: Dendrograma de los efectos de CEPA y TRATAMIENTO mediante el MLM y el Test DGC ($\alpha=0,05$). Ramificaciones superiores a la línea transversal indican diferencias significativas entre los clusters.

Los resultados obtenidos del análisis MLM Test GDC ($\alpha= 0,05$) para la interacción GENERO frente a todos los tratamientos ensayados, son presentados en la Figura 45.

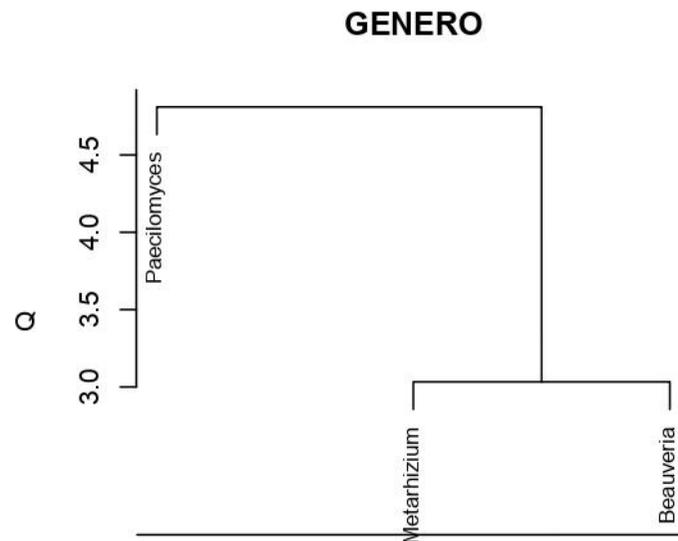


Figura 45: Dendrograma de los efectos de GENERO mediante el MLM y el Test DGC ($\alpha=0,05$). Ramificaciones superiores a la línea transversal indican diferencias significativas entre los géneros evaluados.

Los resultados obtenidos del análisis MLM Test GDC ($\alpha= 0,05$) para la interacción TRATAMIENTO frente a todas las cepas evaluadas, son presentados en la Figura 46.

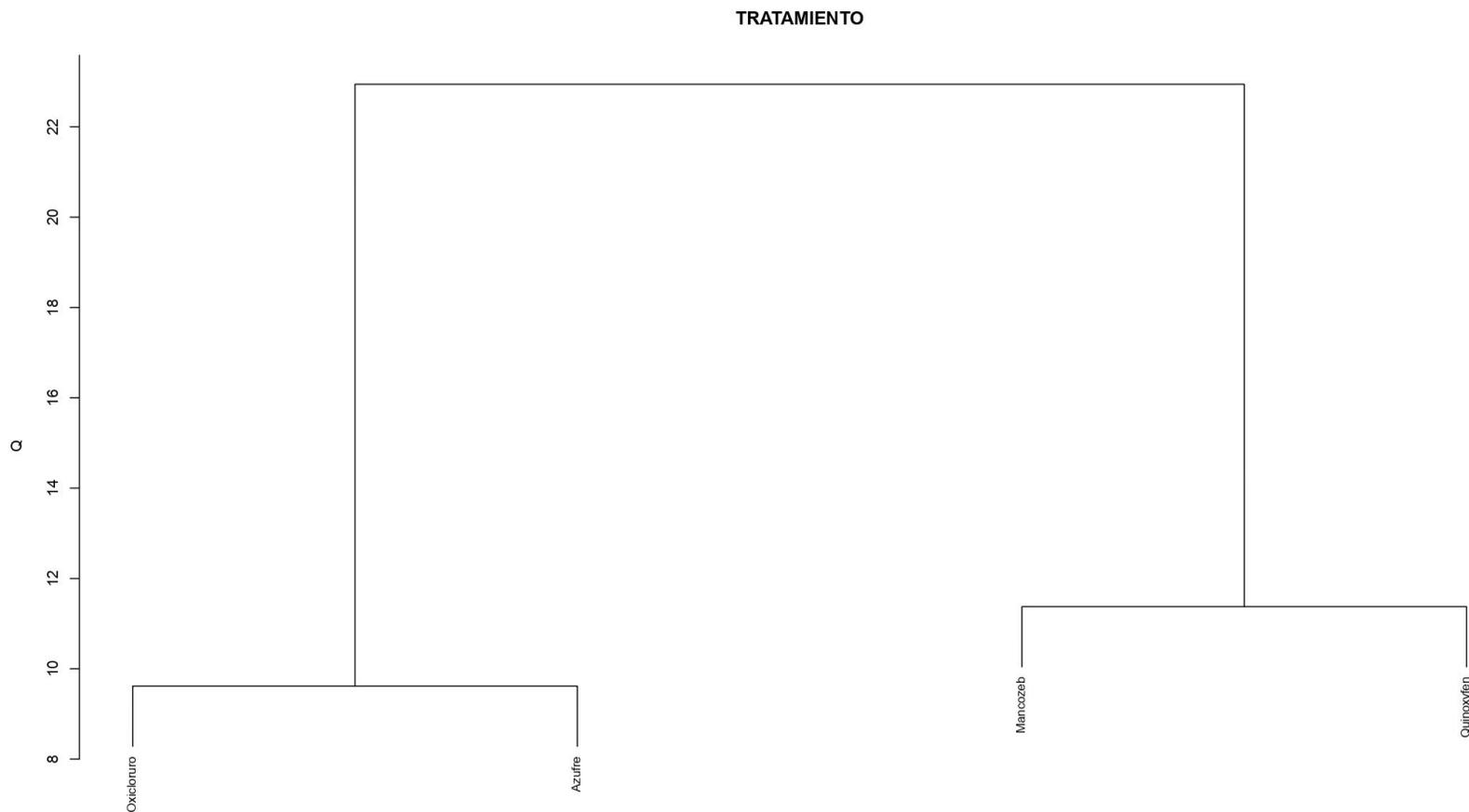


Figura 46: Dendrograma de los efectos de TRATAMIENTO mediante el MLM y el Test DGC ($\alpha=0,05$). La ausencia de una línea transversal indica la presencia de diferencia significativa entre e intra cluster.

2.4 Discusión

La utilización de microorganismos en el manejo de plagas agrícolas supone la realización de estudios previos que puedan, en cierta medida, generar los conocimientos necesarios para garantizar el éxito de la técnica. En este Capítulo de la Tesis, se estudiaron dos factores que poseen un rol considerable en el posible establecimiento de los HE como agentes de control biológico: el rango térmico de desarrollo y la acción de algunos fungicidas de síntesis utilizados en la viticultura argentina.

Los resultados obtenidos de los bioensayos de rangos térmicos mostraron que los tres géneros evaluados poseen un rango de crecimiento óptimo entre los 20 y 25°C, similar al de la mayoría de los hongos mesófilos. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Fargues *et al.* (1992) y Hallsworth y Magan (1999), quienes observaron asimismo variabilidad interespecífica a nivel de rangos y temperaturas de actividad entre las cepas por ellos evaluadas. En este sentido y a partir de las comparaciones realizadas entre cepas, el género que mayor variabilidad mostró fue *Metarhizium*, donde algunas cepas mostraron mayor crecimiento a temperaturas superiores a los 24°C (MsoilAR-18.5(2) y MsoilAR-16.10). Esta variabilidad interespecífica se revela en el trabajo de Klingen y Haukeland (2006), quienes establecen que la distribución geográfica de las especies/cepas de HE está sujeta a los requerimientos térmicos de las mismas, teoría mencionada también por Bidochka y Small (2005). Este planteo hace suponer que, si se considera, por ejemplo, el origen de cada una de las cepas evaluadas del género *Metarhizium* se podría sospechar que aquellas provenientes de las provincias de Salta y La Rioja son capaces de desarrollarse aún en temperaturas superiores a los 24°C, mientras que las cepas provenientes de Mendoza estarían más adaptadas a temperaturas próximas a los 21°C.

Esta misma hipótesis no resultaría correcta para el caso de las cepas del género *Paecilomyces* quienes, en comparación con los otros dos géneros estudiados, mostraron un mayor desarrollo en todas las temperaturas evaluadas sin importar el origen de las mismas. Ante esta dicotomía, Uma Devi *et al.* (2005) señalan que ellos no observaron correlación entre las zonas de origen y la habilidad de las cepas para desarrollarse a altas temperaturas, oponiéndose en cierto modo a los resultados de Fargues *et al.* (1992) quienes si mencionan una débil correlación. Del mismo modo, Rath *et al.* (1995) indican que algunos aislados no poseen su máximo crecimiento a la temperatura dominante de la región de origen, sino que su presencia y prevalencia se encontraría sujeta a la presencia de hospederos

susceptibles. Este último punto es contrastado por los trabajos de Bidochka *et al.* (2001) y Bidochka y Small (2005) quienes, para el caso de la especie *Metarhizium anisopliae*, establecen que su distribución si se encontraría ligada a las condiciones ambientales y no a la presencia de hospederos susceptibles, mencionando la posibilidad de encontrarse frente a una especie críptica.

A partir de la importancia de encontrar cepas de HE nativas capaces de tolerar las condiciones térmicas del agroecosistema vitícola argentino, los resultados obtenidos muestran dos grupos que comparten una temperatura óptima de crecimiento, pero que se pueden diferenciar por la amplitud de sus rangos. En un primer lugar se encontraría el género *Beauveria* con un rango (17-24°C) acotado a temperaturas inferiores a los rangos de los géneros *Metarhizium* y *Paecilomyces* (17-35°C), por lo cual, su utilización estaría recomendada para regiones templadas. En segundo lugar, se encuentran los géneros con capacidad de desarrollo en zonas cálidas, donde si bien tanto *Metarhizium* como *Paecilomyces* poseen un mismo rango de desarrollo, los análisis estadísticos realizados mostraron que el género *Paecilomyces* sería más plástico, con un desarrollo significativamente superior al resto tanto a temperaturas templadas (17 y 21°C), como en el caso de 24°C.

El otro factor evaluado para el establecimiento de los aislados nativos de HE como control biológico, fue la acción de algunos fungicidas de síntesis utilizados en la viticultura argentina. Se evaluaron cuatro fungicidas de uso corriente en los viñedos argentinos: Azufre, Quinoxifen, Mancozeb y Oxicloruro de Cobre. Los resultados obtenidos a partir de los bioensayos mostraron que, para las tres especies evaluadas, el Azufre resultaría inofensivo, el Oxicloruro de Cobre ligeramente tóxico, Quinoxifen moderadamente tóxico y Mancozeb tóxico (según la escala planteada por Viñuela *et al.* 1993).

Si bien sobre el total de cepas evaluadas, los tratamientos poseyeron interacciones estadísticamente diferentes entre sí, en ninguna de las cepas evaluadas se observó una acción del tipo fungicida sino más bien fungistática, dado que al transcurrir el tiempo (próximo a los 15 días de finalizado el ensayo), las cepas retomaban su crecimiento. Este parámetro es también citado por Rachappa *et al.* (2007) y por Martins *et al.* (2012).

La acción de los fungicidas evaluados concuerda con las observaciones realizadas por diversos autores. Majchrowicz y Poprawski (1993) mencionan que el azufre tendría un efecto promotor en el crecimiento de algunas cepas de *Beauveria bassiana*, tal como se observó en los resultados de las cepas BinsAR-1, RINCO y CCH y en la cepa MsoilAR15.1 de la especie *Metarhizium robertsii*. Asimismo, estos autores junto con Castellanos González *et al.* (2011) establecen que el Mancozeb

inhibe completamente a las cepas por ellos estudiadas y junto con Martins *et al.* (2012) que el Oxiclورو de Cobre tiene un efecto fuertemente fungistático. D'Alessandro *et al.* (2010) observaron que las cepas de *Isaria fumosorosea* Wize que el Oxiclورو de Cobre no afectaba la germinación de los conidios, pero que si poseía un efecto antagónico sobre la acción patogénica de esta especie sobre ninfas de *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae).

En cuanto a la interacción CEPA x TRATAMIENTO a lo largo de todo el ensayo, el Modelo Lineal Mixto efectuado permitió identificar 4 cluster estadísticamente diferentes. La composición de estos clusters fue variada, con representantes de los distintos géneros evaluados, mostrando por ejemplo que como reportan Castellanos González *et al.* (2011), la acción de Mancozeb para la mayoría de las cepas evaluadas es de una fuerte inhibición que aumenta a lo largo del tiempo (pudiendo alcanzar el 100%), aunque no llegue a tener acción fungicida *per se*.

El conocimiento de la compatibilidad entre el uso de microorganismos como agentes de control biológico y los plaguicidas de base sintética, es un punto clave en la técnica del MIP mediante HE (Meyling y Eilenberg, 2007). Los bioensayos realizados mostraron que existen productos de uso corriente en la viticultura argentina compatibles con las cepas nativas aisladas, al no mostrar acción fungicida sobre las mismas. En este sentido, la planificación de un correcto calendario fitosanitario dentro de un manejo integrado de plagas y enfermedades permitiría dilucidar que producto de base sintética es más recomendable a partir de los momentos oportunos de aplicación (enfermedad) y del desarrollo del agente de biocontrol. Asimismo, tanto Majchrowicz y Poprawski (1993) como Meyling y Eilenberg (2007) aclaran que los resultados obtenidos mediante estudios *in vitro* pueden no poseer el mismo resultado en ensayos a campo ni podrían extrapolarse directamente, dado que no necesariamente los principios tóxicos en laboratorio pueden serlo bajo otras condiciones. En este sentido, Meyling y Eilenberg (2007) enfatizan que las complejas interacciones entre los componentes de un agroecosistema permitirían realizar tratamientos conjuntos con fungicidas dentro de un plan de MIP.

Desde otra óptica, al considerar el tratamiento realizado con Oxiclورو de Cobre, se pudo observar que algunas cepas de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* (ver Figura 38 D y Figura 41 D) eran capaces de generar un halo incoloro en la zona de crecimiento (con grosor variable entre cepas). Dicha decoloración del medio (en un principio azul-verdoso), implicaría que existe una interacción entre el hongo y el medio ante la presencia de metales tóxicos. Fomina

et al. (2005) plantean que, durante el crecimiento del micelio, los hongos tienen la habilidad de producir exudados como ácidos orgánicos, protones y otros metabolitos capaces de erosionar minerales, rocas y otros materiales. Estos autores observaron que ciertas especies de *Beauveria* podían solubilizar y transformar cadmio, zinc, cobre en precipitados insolubles. Esta transformación, según los mismos autores, se debe a la excreción en el medio de ácido acético, ácido cítrico y ácido oxálico, entre otros, inducidos por la presencia de metales tóxicos.

Del mismo modo, Martins *et al.* (2012) observaron como cepas de *B. bassiana* fueron capaces de solubilizar fungicidas de base cúprica con la producción de halos incoloros, resultando estos mayores en medios con Oxidocloruro de Cobre e Hidróxido de Cobre que con la mezcla conocida como “caldo bordelés”. Estos autores mencionan, que de hecho la presencia de cobre en el medio resultaría en un elicitador liberador/disparador para la producción de ácidos orgánicos, aunque aún no se haya explicado bien la presencia de tolerancia al cobre, con posibles mecanismos de acción: la biosorción del metal en la superficie celular, la absorción activa del cobre, la quelación extracelular o precipitación mediante metabolitos secretados al medio y la complejización intracelular.

De hecho, estas observaciones en la solubilización de metales presente en el medio abrirían una puerta más a la utilización de los HE en los agroecosistemas, puesto que como bien mencionan Fomina *et al.* (2005) el uso de estos microorganismos podría ser otro que el control de plagas, en términos de biotecnología se podría estudiar su utilización en los procesos de biorremediación, estudio no realizado en esta Tesis.

2.5 Bibliografía

- Bidochka, M.J.; Kamp, A.M.; Lavender, T.M.; Dekoning, J.; Amritha De Cross, J.N. 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? *Applied Environmental Microbiology*, 67:1335-1342.
- Bidochka, M.J. y Small, C.L. 2005. Phylogeography of *Metarhizium*, an Insect Pathogenic Fungus. En *Insect-Fungal Associations Ecology and Evolution*, Vega, F.E. y Blackwell, M. (Eds.), University Press, Oxford, pp. 28-50.
- Castellanos González, L.; Muiño García, B. L.; Lorenzo Nicao, M.E.; Rodríguez Fernández, A.; Gómez Alvernal, M. 2011. Efecto *in vitro* de siete fungicidas químicos sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. *Fitosanidad* 15(1):31-38.
- D'Alessandro, C.P.; Padin, S.; Urrutia, M.I. and López Lastra, C.C. 2010. Interaction of fungicides with the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*. *Biocontrol Science and Technology* 21(2):189-197.
- Fargues, J.; Maniania, N.; Delmas, J.; Smits, N. 1992. Influence de la temperature sur la croissance *in vitro* d'hyphomycètes entomopathogènes. *Agronomie, EDP Sciences* 12(7) :557-564.
- Fargues, J.; Goettel, M.S.; Smits, N.; Ouedraogo, A.; Rougier, M. 1997. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia* 89(3):383-392.
- Fomina, M.; Hillier, S.; Charnock, J.M.; Melville, K.; Alexander, I.J.; Gadd, G.M. 2005. Role of Oxalic Acid overexcretion in transformations of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica*. *Applied and Environmental Microbiology*. DOI: 10.1128/AEM.71.1.371-381.2005.
- Hallsworth, J. E. and Magan, N. 1999. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 74:261-266
- Klingen, I. y Haukeland, S. 2006. The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. En: Eilenberg, J.; Hokkanen, H.M.T. (Eds.), *An Ecological and Societal Approach to Biological Control*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 145-211.
- Majchrowicz, I. y Poprawski, T. 1993. Effects *in vitro* of nine fungicides on growth of entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology* 3(3):321-336. DOI: 10.1080/09583159309355287
- Martins, F.; Soares, M.E. ; Oliveira, I.; Pereira, J.A.; Bastos, M.L.; Baptista, P. 2012. Tolerance and bioaccumulation of copper by the entomopathogen *Beauveria*

- bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. Exposed to various copper-based fungicides. *Bull Environ Contam Toxicol* 89:53-60. DOI 10.1007/s00128-012-0628-5
- McClatchie, G.V. ; Moore, D.; Bateman, R.P.; Prior, C. 1994. Effects of temperatures on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations. *Mycologia* 98(7):749-756.
- Meyling, N. V. y Eilenberg, J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control* 43:145-155.
- Mónaco, C.; Nico, A.; Rollán, M.; Urrutia, M. 2001. Efecto *in vitro* de dos fungicidas sobre la micoflora antagonista al tizón temprano del tomate. *Pord. Prot. Veg.* 16(3):325-332.
- Parker, B.L. ; Skinner, M.; Gouli, S.Y.; Gouli. V.V.; Tobi, D.; Kim, J.S. 2015. Persistence of *Beauveria bassiana* sensu lato and *Metarhizium anisopliae* sensu lato in Vermont (USA) forest soil. *Biocontrol Science and Technology*, 25(7):768-788.
- Rachappa, V.; Lingappa, S.; Patil, R.K. 2007. Effect of agrochemicals on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. *Karnata J. Agric. Sci.* 20(2):410-413.
- Rath, A.C.; Anderson, G.C.; Worledge, D.; Koen, T.B. 1995. The effect of low temperatures on the virulence of *Metarhizium anisopliae* (DAT F-001) to the subterranean scarab *Andoryphorus couloni*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 65:186-192.
- Uma Devi, K.; Sridevi, V. ; Murali Mohan, Ch. ; Padmavathi, J. 2005. Effect of high temperatura and wáter stress on *in vitro* germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. *Journal of Invertebrate Pathology* 88:151-189.
- Yáñez, M. y France, A. 2010. Effects of fungicides on the development of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70(3):390-398.
- Viñuela, E.; Jacas, J. A.; Marco, V.; Adrón, A.; Badia, F. 1993. Los efectos de los plaguicidas sobre los organismos beneficiosos en la agricultura y el grupo de trabajo de la OILB "Plaguicidas y organismos beneficiosos. I. Insecticidas y acaricidas". *Phytoma* 45:18-25.

Evaluación, bajo condiciones controladas, de la patogenicidad de las especies de hongos entomopatógenos nativos aislados y un producto comercial sobre las plagas *Lobesia botrana*, *Naupactus xanthographus* y *Brevipalpus* spp.

Resumen

La propuesta de utilización de microorganismos como agentes de biocontrol, requiere de la evaluación *in vitro* de patogenicidad sobre individuos que generen daños en los cultivos. Al igual que los efectos abióticos, existen efectos bióticos capaces de influenciar el proceso de infección, por ello el presente Capítulo presenta como objetivos: 1) Evaluar la acción de diferentes cepas de los hongos entomopatógenos aislados y un producto comercial nacional sobre distintos estadios larvales de *L. botrana*; 2) Evaluar la acción de diferentes cepas de los hongos entomopatógenos aislados y un producto comercial nacional sobre individuos adultos de *N. xanthographus*; y 3) Evaluar la acción de diferentes cepas de los hongos entomopatógenos aislados y un producto comercial nacional sobre estadios juveniles y adultos de *Brevipalpus* sp. Se realizaron bajo condiciones controladas, bioensayos de patogenicidad donde se utilizaron suspensiones de conidios del orden de 10^7 conidios.mL⁻¹ de las diferentes especies entomopatógenas aisladas y caracterizadas en el Capítulo. Para los bioensayos sobre larvas L4 y L5 de *L. botrana* y estadios juveniles/adultos de *Brevipalpus* spp., se realizaron las inoculaciones mediante la aspersion de la suspensión de conidios sobre los individuos. Para los bioensayos realizados sobre adultos de *N. xanthographus*, se realizaron inoculaciones mediante aspersion directa de la suspensión de conidios sobre los individuos y mediante contacto con una superficie previamente inoculada. Los resultados mostraron que existen cepas aisladas con capacidad infectiva sobre las especies *L. botrana* y *N. xanthographus*, con índices de mortalidad de hasta el 100% de individuos inoculados. Para el caso de la inoculación por contacto de adultos de *N. xanthographus*, este mecanismo fue menos eficiente que por aspersion. No fue posible evaluar la acción patogénica de las cepas utilizadas sobre los individuos de *Brevipalpus* spp.

3.1 Introducción

El estudio de la búsqueda de nuevas alternativas al control químico de plagas agrícolas implica evaluar la acción que poseen estos métodos sobre los individuos plaga. En el caso de los hongos entomopatógenos (HE) como microorganismos de manejo bioecológico de plagas, las evaluaciones que se deben efectuar se encuentran circunscriptas a estudios patológicos.

La patogenicidad de un microorganismo es definida por distintos autores como una habilidad cualitativa de producir infección en un organismo, en este caso artrópodos; diferenciándose de la virulencia, la cual resulta de una característica cuantitativa del grado de patogenicidad que posee el microorganismo en estudio (Vega *et al.*, 2012). En este sentido, los bioensayos en laboratorio para la selección de cepas de HE es un estudio tradicionalmente empleado, basado principalmente en ensayos de patogenicidad y no de virulencia, dado que las posibles diferencias que se podrían reportar en laboratorio se podrían ver afectadas por los cambios entre las condiciones *in vitro* y el pasaje *in vivo* (Vega *et al.*, 2012).

Como se estableció en el Capítulo II, la acción de los HE sobre otros organismos se encuentra sujeta a factores bióticos y abióticos que influyen en la regulación de los mecanismos de infección. Dentro de los factores bióticos, se encuentra la susceptibilidad del posible hospedero a ser infectado, y para ello entran en juego diversos factores como ser el estado de desarrollo del individuo, la etología de este (por ejemplo, la existencia de hábitos sociales), la presencia de estructuras de defensa en el exoesqueleto (pilosidad, etc.), y el sistema inmunitario del insecto, el cual aún no es del todo bien comprendido.

Araujo y Hughes (2016) describieron que para la mayoría de los individuos del Orden Coleoptera y Lepidoptera, el estado más susceptible es el de la larva. Estos mismos autores mencionan diferentes características que comparten ambos órdenes y que permiten comprender la susceptibilidad como larva: 1) al ser insectos holometábolos, existe una diferencia a nivel de nicho con los individuos adultos, 2) los estadios larvales poseen mayor tasa alimentaria que los adultos (en el caso de los Lepidopteros, muchas veces el régimen alimentario es diferente), y su movilidad es mucho más reducida encontrándose generalmente próximos a las fuentes de nutrición, y 3) las larvas como estados juveniles de los insectos, presentan constantes procesos de mudas, por lo cual requieren de la presencia de un exoesqueleto no muy rígido que les permita crecer de forma más rápida para evitar estar por largos periodos de tiempo bajo una forma susceptible de ser presa.

Estas características son fácilmente identificables en dos de los organismos plagas en estudio. En el caso de *Lobesia botrana*, los estadíos juveniles (larvas tipo polipoda, subtipo eruciforme) se encuentran próximos a las fuentes de nutrición (flores y racimos), para luego pasar a pupa; mientras que los adultos poseen movilidad y un régimen alimentario reducido (ver Introducción, pag. 8). Respecto a *Naupactus xanthographus*, al igual que otros coleopteros, sus larvas (tipo apoda, subtipo curculioniforme) desarrollan sus estadíos bajo tierra, alimentándose de las raíces de las plantas de vid y otros frutales, mientras que los adultos se alimentan de hojas en la canopia. Esta diferencia de nichos tan marcada obliga a que el estudio de microorganismos como posibles agentes de biocontrol se vea más enfocada a evaluaciones de patogenicidad sobre los adultos recién emergidos y adultos sin ganchos mandibulares (ver Introducción, pag. 12).

Para el caso de los ácaros, estos poseen una metamorfosis diferente a los ejemplos antes citados, pueden coexistir distintos estados en un mismo nicho, compartiendo incluso el régimen alimentario. Por ello, la bibliografía no discrimina en susceptibilidad entre larva, ninfa y adulto de estos arácnidos, sino más bien la posibilidad de infección de individuos y/o huevos u oocitos.

A partir de las cepas aisladas y descritas en el Capítulo I y debido a la importancia que posee la presencia de un producto comercial de origen nacional a base de la especie *B. bassiana*, que si bien no cuenta con el registro obligatorio requerido por el SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria), es de uso recurrente en la provincia de Mendoza por los productores vitivinícolas; el presente Capítulo presenta como objetivos: 1) Evaluar la acción de diferentes cepas de los hongos entomopatógenos aislados y un producto comercial nacional sobre distintos estadíos larvales de *L. botrana*; 2) Evaluar la acción de diferentes cepas de los hongos entomopatógenos aislados y un producto comercial nacional sobre individuos adultos de *N. xanthographus*; y 3) Evaluar la acción de diferentes cepas de los hongos entomopatógenos aislados y un producto comercial nacional sobre estadíos juveniles y adultos de *Brevipalpus* sp.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Estudio de la patogenicidad de cepas nativas sobre individuos juveniles de *L. botrana*

Se evaluó la acción patogénica de aislados nativos de HE aisladas en el Capítulo I (Tabla 38) y una cepa aislada del producto comercial nacional denominado en la presente Tesis como “ARG” (*Beauveria bassiana* cepa SP-B/04-42, WP, 10⁹ conidios.g⁻¹).

En todos los casos se evaluó la acción patogénica de una suspensión de 10⁷ conidios.mL⁻¹. Para ello, se asperjaron individuos de *L. botrana* en estadio L4 o L5 (Wraight *et al.*, 2010; Pires *et al.*, 2010; Safavi *et al.*, 2010; Sahayaraj *et al.*, 2010).

Se utilizaron cinco individuos adultos por repetición (3 repeticiones por tratamiento), a los cuales se los sometió a una aspersion dentro de una caja de Petri estéril con 2 mL con una suspensión de conidios del orden de 10⁷ conidios.mL⁻¹ (agua destilada estéril, Tween80® 0,01% v/v). Seguidamente, los individuos infectados se transfirieron a una caja de Petri de 9 cm de diámetro en la cual previamente se le incorporó un fondo de papel secante estéril, una fuente alimenticia estéril (un cubo de 1 cm³ de alimento artificial según Ferreira *et al.*, 2003).

Las cajas de Petri fueron conservadas bajo condiciones controladas de temperatura (24°C), humedad (>60% HR) y fotoperiodo (16:8) por un periodo de 7 días, en los cuales diariamente se observó la presencia de individuos muertos. Todo individuo que presentase sintomatologías de infección era retirado y conservado en cámara húmeda (HR >80%) para favorecer la emersión del micelio.

Se determinó el Índice de Mortalidad (IM) mediante la siguiente ecuación:

$$IM = \frac{SL_t - SL_T}{SL_t}$$

Donde (IM) Índice de Mortalidad, (SL_T) número de larvas sobrevivientes testigo, (SL_t) número de larvas sobrevivientes tratamiento

Tabla 38: Listado de cepas nativas utilizadas en el estudio de patogenicidad sobre individuos juveniles de *L. botrana*

Nº	CEPA	GÉNERO
1	ACA	<i>Beauveria</i>
2	BinsAR-1	<i>Beauveria</i>
3	BinsAR-2	<i>Beauveria</i>
4	BsoilAR-4.1(2)	<i>Beauveria</i>
5	PsoilAR2.3(4)	<i>Paecilomyces</i>
6	PsoilAR4.1(2)	<i>Paecilomyces</i>
7	PsoilAR24.3	<i>Paecilomyces</i>
8	MsoilAR2.3(1)	<i>Metarhizium</i>
9	MsoilAR2.3(2)	<i>Metarhizium</i>
10	MsoilAR2.3(4)	<i>Metarhizium</i>
11	MsoilAR2.5(2)	<i>Metarhizium</i>
12	MsoilAR4.3	<i>Metarhizium</i>
13	MsoilAR10	<i>Metarhizium</i>
14	MsoilAR14.3	<i>Metarhizium</i>
15	MsoilAR15.1	<i>Metarhizium</i>
16	MsoilAR15.3	<i>Metarhizium</i>
17	MsoilAR15.7	<i>Metarhizium</i>
18	MsoilAR16.1	<i>Metarhizium</i>
19	MsoilAR16.3	<i>Metarhizium</i>
20	MsoilAR16.7	<i>Metarhizium</i>
21	MsoilAR16.8	<i>Metarhizium</i>
22	MsoilAR16.9	<i>Metarhizium</i>
23	MsoilAR16.10	<i>Metarhizium</i>
24	MsoilAR17.2	<i>Metarhizium</i>
25	MsoilAR17.4	<i>Metarhizium</i>
26	MsoilAR17.5	<i>Metarhizium</i>
27	MsoilAR17.7	<i>Metarhizium</i>
28	MsoilAR17.9	<i>Metarhizium</i>
29	MsoilAR18.5(2)	<i>Metarhizium</i>
30	MsoilAR18.5(3)	<i>Metarhizium</i>

3.2.2 Estudio de la patogenicidad de cepas nativas sobre individuos adultos de *N. xanthographus*

Se evaluó la acción patogénica de aislados nativos de HE aisladas en el Capítulo I (Tabla 39), y una cepa aislada de un producto comercial nacional denominado en la presente Tesis como “ARG” (*Beauveria bassiana* cepa SP-B/04-42, WP, 10^9 conidios.g⁻¹), sobre individuos adultos de *N. xanthographus*

Tabla 39: Listado de cepas nativas utilizadas en el estudio de patogenicidad sobre adultos de *N. xanthographus*

Nº	CEPA	GÉNERO
1	BsoilAR-4.1(2)	<i>Beauveria</i>
2	BinsAR-2	<i>Beauveria</i>
3	PsoilAR-24.3	<i>Paecilomyces</i>
4	PsoilAR-4.1(2)	<i>Paecilomyces</i>
5	MsoilAR-4.3	<i>Metarhizium</i>
6	MsoilAR-10	<i>Metarhizium</i>
7	MsoilAR-14.3	<i>Metarhizium</i>
8	MsoilAR-15.1	<i>Metarhizium</i>
9	MsoilAR-15.3	<i>Metarhizium</i>
10	MsoilAR-16.3	<i>Metarhizium</i>

En todos los casos se evaluó la acción patogénica de una suspensión de 10^7 conidios.mL⁻¹. Se utilizaron dos metodologías de infección diferentes: aspersión y contacto.

Para la infección por aspersión directa (Ihara *et al.*, 2009; Speranza *et al.*, 2009; Gindin *et al.*, 2006; Pizzuolo *et al.*, 2002; Ripa y Rodríguez, 1989), se utilizaron cinco individuos adultos por repetición (3 repeticiones por tratamiento), a los cuales se los asperjó dentro de una caja de Petri estéril con 2 mL de una suspensión del orden de conidios de 10^7 conidios.mL⁻¹ (agua destilada estéril, Tween80® 0,01% v/v). Seguidamente, los individuos adultos infectados se transfirieron a una caja de Petri de 9 cm de diámetro en la cual previamente se le incorporó un fondo de papel secante estéril, junto con un algodón estéril embebido con una fuente alimenticia (solución saturada de glucosa).

El segundo método de infección utilizado fue por, donde se utilizaron 5 individuos adultos por repetición (3 repeticiones por tratamiento), los cuales fueron

transferidos a una caja de Petri de 9 cm de diámetro que poseía un fondo de papel secante previamente infectado por aspersión de 2 mL de una suspensión del orden de conidios de 10^7 conidios.mL⁻¹ (agua destilada estéril, Tween80® 0,01% v/v) y secados a temperatura ambiente por al menos 20 minutos. Dentro de cada unidad de muestreo (caja de Petri) se colocó un algodón estéril embebido con una fuente alimenticia (solución saturada de glucosa).

Las cajas de Petri fueron conservadas bajo condiciones controladas de temperatura (24°C), humedad (>60% HR) y fotoperiodo (16:8) por un periodo de 7 días, en los cuales diariamente se observó la presencia de individuos muertos. Se colocó en cada caja de Petri un algodón estéril embebido en una solución saturada de glucosa con el objeto de brindar alimento a los adultos durante el periodo del bioensayo. Todo individuo que presentase sintomatologías de infección era retirado y conservado en cámara húmeda (HR >80%) para favorecer la emergencia micelial. Se determinó el Índice de Mortalidad (IM).

Se analizaron los resultados de las diferentes metodologías de inoculación obtenidos con el software InfoStat 2017p® mediante un ANOVA y un análisis de las medias por el test LSD Fisher con $\alpha=0,05$.

3.2.3 Estudio de la patogenicidad de cepas nativas sobre individuos adultos de *Brevipalpus* spp.

Se evaluó la patogenicidad de aislados nativos de HE aisladas en el Capítulo I (Tabla 40), y una cepa aislada del producto comercial nacional denominado en la presente Tesis como “ARG” (*Beauveria bassiana* cepa SP-B/04-42, WP, 10^9 conidios.g⁻¹), sobre individuos adultos de *Brevipalpus* spp.

En todos los casos se evaluó la acción patogénica de una suspensión de 10^7 conidios.mL⁻¹. Para ello, se asperjaron individuos de *Brevipalpus* sp. (Amjad *et al.*, 2012; Draganova y Simova, 2010; Cavalcanti *et al.*, 2008; Shi y Feng, 2004).

Se recolectaron a campo hojas de vid (*Vitis vinífera* L.) con alto grado de infestación de la plaga *Brevipalpus* sp. En el laboratorio se observó bajo microscopio estereoscópico Carl Zeiss® la presencia de adultos y se determinó la densidad de posibles acarófagos presentes. Se seleccionaron aquellas hojas que presentaban la particularidad de poseer alta densidad poblacional de *Brevipalpus* sp. y baja densidad poblacional de acarófagos.

Tabla 40: Listado de cepas nativas utilizadas en el estudio de patogenicidad sobre adultos de *Brevipalpus* spp.

Nº	CEPA	GÉNERO
1	BsoilAR-4.1(2)	<i>Beauveria</i>
2	BinsAR-2	<i>Beauveria</i>
3	PsoilAR-24.3	<i>Paecilomyces</i>
4	PsoilAR-4.1(2)	<i>Paecilomyces</i>
5	MsoilAR-4.3	<i>Metarhizium</i>
6	MsoilAR-10	<i>Metarhizium</i>
7	MsoilAR-14.3	<i>Metarhizium</i>
8	MsoilAR-15.1	<i>Metarhizium</i>
9	MsoilAR-15.3	<i>Metarhizium</i>
10	MsoilAR-16.3	<i>Metarhizium</i>

Las hojas seleccionadas fueron recortadas de forma que cupiesen en cajas de Petri de 9 cm. Seguidamente, las mismas fueron asperjadas con 1 mL de una suspensión de 10^7 conidios.mL⁻¹ en agua destilada estéril y Tween80® (0,01% v/v). Se utilizó como testigo una solución de agua destilada estéril y Tween80® (0,01% v/v). Se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

Los cultivos en cajas de Petri fueron conservados bajo condiciones controladas de temperatura (24°C), humedad (>60% HR) y fotoperiodo (16:8) por un periodo de 7 días (incubadora construida por el CONICET), en los cuales diariamente se observó la presencia de individuos muertos. Pasado el periodo de incubación, se retiraron las hojas y se las colocó en cajas de Petri de 15 cm de diámetro junto con un algodón estéril embebido en agua destilada estéril, de modo de generar un ambiente con HR alta y favorecer la emersión del micelio. Se determinó el Índice de Mortalidad (IM).

3.3 Resultados

3.3.1 Estudio de la patogenicidad de cepas nativas sobre individuos juveniles de *L. botrana*

La Tabla 41 muestra los resultados obtenidos de IM para cada cepa evaluada. La Figura 47 muestra un ejemplo de larva de *L. botrana* afectada por cepas nativas de *Beauveria bassiana*.

Tabla 41: Valores de media de IM sobre *L. botrana* clasificados por cepa

CEPA	IM
ACA	0,67
BinsAR-1	0,67
BinsAR-2	0,56
BsoilAR-4.1(2)	0,56
PsoilAR2.3(4)	0,56
PsoilAR4.1(2)	0,56
PsoilAR24.3	0,44
MsoilAR2.3(1)	0,56
MsoilAR2.3(2)	0,00
MsoilAR2.3(4)	0,22
MsoilAR2.5(2)	0,89
MsoilAR4.3	0,56
MsoilAR10	0,33
MsoilAR14.3	0,67
MsoilAR15.1	0,44
MsoilAR15.3	0,33
MsoilAR15.7	0,33
MsoilAR16.1	0,44
MsoilAR16.3	0,56
MsoilAR16.7	0,44
MsoilAR16.8	0,67
MsoilAR16.9	0,33
MsoilAR16.10	0,67
MsoilAR17.2	0,33
MsoilAR17.4	0,00
MsoilAR17.5	0,22
MsoilAR17.7	0,33
MsoilAR17.9	0,33
MsoilAR18.5(2)	0,44
MsoilAR18.5(3)	0,67
ARG	0,00

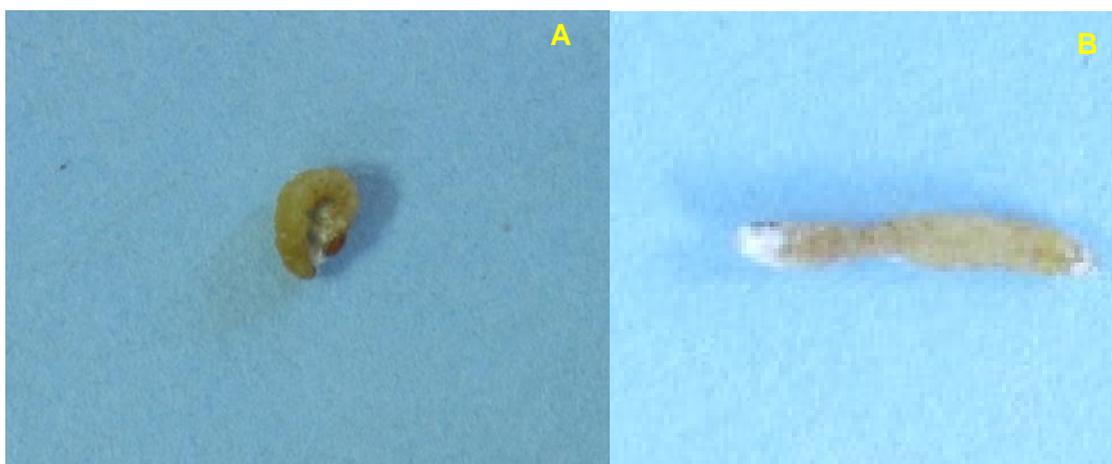


Figura 47: ejemplos de larvas de *L. botrana* infectadas con cepas de *Beauveria* (A) ACA, (B) BsoilAR4.1(2)

3.3.2 Estudio de la patogenicidad de cepas nativas sobre individuos adultos de *N. xanthographus*

La Tabla 42 muestra los resultados obtenidos de IM para cada cepa evaluada mediante el tratamiento por aspersión. La Tabla 43 muestra los resultados obtenidos de IM para cada cepa evaluada mediante el tratamiento por contacto

Tabla 42: Valores de media de IM por aspersión sobre *N. xanthographus* clasificados por cepa

CEPA	IM
BsoilAR-4.1(2)	0,00
BinsAR-2	0,00
PsoilAR-24.3	0,20
PsoilAR-4.1(2)	0,07
MsoilAR-4.3	0,00
MsoilAR-10	0,07
MsoilAR-14.3	0,00
MsoilAR-15.1	0,00
MsoilAR-15.3	0,13
MsoilAR-16.3	0,27
ARG	0,00

Tabla 43: Valores de media de IM por contacto sobre *N. xanthographus* clasificados por cepa ($p = 0,0311$)

CEPA	IM
BsoilAR-4.1(2)	0,00 A
BinsAR-2	0,00 A
PsoilAR-24.3	0,07 A
PsoilAR-4.1(2)	1,00 B
MsoilAR-4.3	0,00 A
MsoilAR-10	0,00 A
MsoilAR-14.3	0,00 A
MsoilAR-15.1	0,00 A
MsoilAR-15.3	0,00 A
MsoilAR-16.3	0,00 A
ARG	0,00

Si se analizan los IM por tratamiento sin discriminar a las cepas existen diferencias significativas (Tabla 44).

Tabla 44 : Análisis ANOVA con Test de Fisher ($\alpha=0,05$) para los tratamientos "Aspersión" y "Contacto" ($p=0,0409$) sobre *N. xanthographus*.

TRATAMIENTO	MEDIA IM	LSD FISHER ($\alpha=0,05$)
Contacto	0,02	A
Aspersión	0,08	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

La Figura 48 y 49 muestran, a modo de ejemplo, adultos de *N. xanthographus* afectados por cepas de *M. robertsii* y *P. lilacinus* respectivamente.



Figura 48: ejemplos de individuos adultos de *N. xanthographus* infectados con cepas de *Metarhizium robertsii*. (A) MsoilAR-10; (B) MsoilAR-15.3



Figura 49: ejemplos de individuos adultos de *N. xanthographus* infectados con cepas de *Paecilomyces lilacinus*. (A) PsoilAR-4.1(2); (B) PsoilAR-24.3.

3.3.3 Estudio de la patogenicidad de cepas nativas sobre individuos adultos de *Brevipalpus* spp.

La Tabla 45 muestra los resultados obtenidos de IM para cada cepa evaluado sobre adultos de *Brevipalpus* spp.

Tabla 45: Valores de media de IM sobre *Brevipalpus* spp. clasificados por cepa

CEPA	IM
BsoilAR-4.1(2)	0,00
BinsAR-2	0,00
PsoilAR-24.3	0,00
PsoilAR-4.1(2)	0,00
MsoilAR-4.3	0,00
MsoilAR-10	0,00
MsoilAR-14.3	0,00
MsoilAR-15.1	0,00
MsoilAR-15.3	0,00
MsoilAR-16.3	0,00

3.4 Discusión

En el presente Capítulo se realizó la evaluación de la acción patogénica de las diferentes cepas aisladas en el Capítulo I y un producto comercial de origen nacional sobre individuos juveniles de *Lobesia botrana*, adultos de *Naupactus xanthographus* y juveniles/adultos de *Brevipalpus* spp., a fin de poder determinar su posible uso como agentes de biocontrol.

Para el caso de la “polilla europea de los racimos” los resultados obtenidos mostraron que la cepa comercial de origen nacional y dos cepas de *Metarhizium robertsii* no presentaron patogenicidad alguna sobre los estadíos L4 y L5. El resto de las cepas mostraron ser capaces de infectar a las larvas de *L. botrana*, hasta un máximo de mortalidad del 67%. Estos resultados coinciden en cierta medida con lo reportado por Aguilera Sammaritano *et al.* (2018), quienes también realizaron estudios sobre larvas de *L. botrana* con una mortalidad de 81 a 98% para cepas de *Metarhizium anisopliae*.

Otros estudios mencionan la posibilidad de utilizar a los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* como agentes de biocontrol sobre lepidópteros. Sahayaraj y Borgio (2010) observaron cepas de la especie *Metarhizium anisopliae* afectando noctuidos, quienes resultan una plaga de importancia económica para la agricultura extensiva. Ioriatti *et al.* (2011) mencionan a los géneros *Beauveria* y *Paecilomyces* como enemigos naturales de pupas invernales de *L. botrana*, sin referirse al estado larval.

Para nuestro entorno vitícola, la presencia de cepas nativas capaces de infectar larvas de una plaga introducida como es *L. botrana* es un dato prometedor en la búsqueda de alternativas complementarias en el Manejo Integrado de Plagas vitícolas; sobre todo por la importancia que conlleva el control de una plaga cuarentenaria con presencia de un comensalismo con microorganismos saprófitos como *Botrytis cinerea* (ver Introducción, pag. 10). Como mencionan Wraight *et al.* (2010), los daños ocasionados en los cultivos por las plagas no resultan de la actividad de una sola especie en particular, sino más bien de un complejo de especies plagas, por lo cual se podría pensar en utilizar más de una cepa de hongo entomopatógenos como agente de biocontrol.

En cuanto a los adultos del coleóptero *N. xanthographus*, ambos tratamientos evaluados (aspersión y contacto) mostraron la presencia de algunos aislados capaces de producir infección, hasta llegar a mortalidad del 100% de los individuos inoculados, como también fue reportado por Gindin *et al.* (2006) para el caso de cepas de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. Asimismo, fue posible observar que los resultados fueron significativamente diferentes para los dos

tratamientos evaluados, presentándose un mayor número de infecciones en los individuos que fueron inoculados mediante aspersion directa. Sin embargo, se puede destacar a la cepa PsoilAR4.1(2), que presentó un IM de 1 mediante el tratamiento por contacto. Este tipo de cepas, pueden ser seleccionadas para complementar los tratamientos que se realizan sobre el tronco principal de las cepas de Vid, por ejemplo, en los anillos de retención que se colocan como manejo cultural, a fin de alcanzar al adulto recién emergido que se traslada mecánicamente desde el suelo hasta la canopia. Tanto Pieres *et al.* (2010) como Wraight *et al.* (2010) concluyen que es necesario incorporar a los HE escogidos, con otras herramientas o prácticas de manejo de plagas, con el objetivo de un efecto sinérgico entre los métodos empleados.

Un apartado interesante podría ser preguntarse por qué si tanto *Naupactus xanthographus* como los hongos evaluados poseen un origen geográfico común, no se observan epizootias naturales en los viñedos argentinos. Para ello, hay que remitirse en la etología que posee esta especie, con una fase edáfica en su ciclo de vida. Por lo cual, si los individuos susceptibles (larvas) se encuentran enterradas en la rizosfera de la vid, su afección es poco detectable a simple vista. Esto requerirá de estudios más específicos en la temática, a fin de poder determinar el valor del posible servicio ecosistémico que estarían, naturalmente, proporcionando los HE.

Finalmente, en esta Tesis no fue posible medir la patogenicidad de los hongos aislados sobre individuos juveniles y adultos de *Brevipalpus* spp. Se realizaron diferentes ensayos para poder llevar a cabo los bioensayos, pero no se observaron muertes debida a infecciones fúngicas. Amjad *et al.* (2012) comentan que el tamaño de estos individuos dificulta el diagnóstico de enfermedades, sin embargo, existen estudios que citan a las especies *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *P. fumosoroseus* como agentes de control del ácaro *Tetranychus cinnabarinus* (Shi y Feng, 2004). Estos autores observaron patogenicidad sobre huevos, pero mencionan que les fue también dificultoso de analizar los resultados debido al tamaño de los individuos objetivos. Nuevos bioensayos son necesarios de efectuar, readecuando las técnicas de cría e inoculación, a fin de evitar la deshidratación de las hojas que actúan como soporte, y con el mínimo manipuleo posible.

3.5 Bibliografía

- Aguilera Sammaritano, J.; Deymié, M.; Herrera, M.; Vazquez, F.; Cuthbertson, A.G.S.; López Lastra, C.C.; Lechner, B. 2018. The entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* for the European grapevine moth, *Lobesia botrana* Den. & Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae) and its effect to the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. DOI: 10.1186/s41938-018-0086-4.
- Amjad, M.; Bashir, M.H.; Afzal, M.; Sabri, M.A.; Javed, N. 2012. Synergistic effect of some entomopathogenic fungi and synthetic pesticides, against two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Pakistan J. Zool.*, 44(4):977-984.
- Araújo, J.P.M. y Hughes, D.P. 2016. Diversity of Entomopathogenic Fungi: Which Groups Conquered the Insect Body? *Advances in Genetics*, 94:1-39. DOI: 10.1016/bs.adgen.2016.01.001
- Cavalcanti, R.S.; Rebelles Reis, P. ; Moino Junior, A.; Falqueto Altoé, B.; Franco, R.A.; Mansur Botelho de Carvalho, T. 2008. Pathogenicity of entomopathogenic fungi on three species of coffee plant mites. *Coffee Science*, 3(1):68-75.
- Draganova, S.A. y Simova, S.A. 2010. Susceptibility of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) to isolates of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Pestic. Phytomed. (Belgrade)*, 25(1):51-57.
- Ferreira, A. ; Bastos, M.M.S.M. ; Aguiar, A. 2003. Criação de traça da uva *Lobesia botrana*. En *Actas do VI Encontro Nacional de Proteção Integrada*, pp. 83-88, Castelo Branco (Portugal) 14-16 de Mayo de 2003.
- Gingin, G.; Levski, S.; Glazer, I.; Soroker, V. 2006. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against the Red Palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*. *Phytoparasitica*, 34(4):370-379.
- Ihara, F.; Toyama, M.; Higaki, M.; Mishiro, K.; Yaginuma, K. 2009. Comparison of pathogenicities of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to chestnut pests. *Applied Entomology*, 44(1) :127-132-
- Ioriatti, C.; Anfora, G.; Tasin, M.; De Cristofaro, A.; Witzgall, P.; Lucchi, A. (2011) Chemical Ecology and Management of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*, 104(4):1125-1137.
- Pizzuolo, P.H.; Speranza, S.; Pucci, C. 2002. Evaluación de la virulencia de dos cepas autóctonas y una comercial del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) en larvas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) *Revista PHYTOMA*, 144:184-186.

- Ripa, R. y Rodríguez, F. 1989. Susceptibilidad de larvas de *Naupactus xanthographus* (Coleoptera: Curculionidae) a ocho aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Agricultura Técnica (Chile)* 49(4):336-340.
- Safavi, S.A.; Kharrazi, A.; Rasouljan, Gh. R.; Bandani, A.R. 2010. Virulence of some isolates of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on *Ostrina nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *J. Agr. Sci. Tech.* 12:13-21.
- Sahayaraj, K. y Borgio, F. 2010. Virulence of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin on seven insect pests. *Indian J. Agric. Res.* 44(3):195-200.
- Shi, W. y Feng, M. 2004. Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) with a description of mite egg bioassay system. *Biological Control*, 30:165-173.
- Speranza, S.; Pizzuolo, P.H.; Lucero, G.S.; Mazzaglia, A. 2009. Descubrimiento del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. Sobre *Rhynchophorus ferrugineus* (Oliver), en Lazio, y pruebas de patogenicidad. En: *Actas XXII Congreso Nacional Italiano de Entomología*, Ancona (Italia).
- Vega, F. E.; Meyling, N. V.; Luangsa-ard, J.J.; Blackwell, M. 2012. En: Capítulo 6, Insect Pathology, Fernando E. Vega y Harry K. Kaya (Eds.), *Elsevier Inc.*, pp. 171-206.
- Wraight, S.P.; Ramos, M.E.; Avery, P.B.; Jaronsky, S.T.; Vandenberg, J.D. 2010. Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetables crops. *Journal on Invertebrate Pathology* 103:186-199.

Evaluación, *in vitro*, de la patogenicidad de las cepas nativas de hongos entomopatógenos sobre organismos benéficos: *Apis mellifera* y *Harmonia axydiris*

Resumen

Previa a la propuesta de una nueva herramienta para el manejo de plagas agrícolas, se deben llevar a cabo estudios precisos que evalúen el posible impacto que esta estrategia tendrá en el agroecosistema. En el caso de microorganismos entomopatógenos como agentes de control biológico es importante evaluar su accionar hacia organismos “no-objetivo” que pudieran llegar a poseer acciones benéficas reflejadas como servicios agroecosistémicos. *Apis mellifera* es el polinizador por excelencia con altas implicancias en la industria agrícola y que junto a sus características etológicas hacen de esta especie un caso de estudio del impacto de hongos entomopatógenos para el control biológico. Asimismo, los depredadores presentes en un agroecosistema ofrecen servicios en el manejo de plagas. *Harmonia axydiris* es un voraz coccinélido presente en los viñedos de Argentina, cuya susceptibilidad a los bioplaguicidas deber también ser estudiada. El objetivo del presente capítulo fue evaluar la acción de un conjunto de cepas aisladas de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces* sobre individuos benéficos: enemigos naturales (*H. axydiris*) y polinizadores (*A. mellifera*). Se realizaron bioensayos con cepas nativas aisladas de viñedos del Oeste Argentino. Se utilizaron suspensiones conocidas de conidios de las cepas evaluadas en tratamientos de aspersión y contacto para ambas especies, y tratamientos por ingesta y transferencia en *A. mellifera* al ser una especie social. Los resultados obtenidos muestran que ciertas cepas poseen acción patogénica sobre individuos adultos de *A. mellifera* en los tratamientos por aspersión y contacto, no arrojando resultados positivos por ingesta y transferencia. En el caso de *H. axydiris* ninguna de las cepas mostró acción patogénica sobre individuos adultos de esta especie, sin importar el tratamiento efectuado, posiblemente debido a su robusto sistema inmunitario. Los resultados obtenidos no invalidan al uso de las cepas nativas dentro de un plan de manejo de plagas de la vid, por el contrario, estudios más detallados *in planta* son necesarios previa su propuesta como agentes de biocontrol.

5.1 Introducción

En un programa de Manejo Integrado de Plagas (MIP) existen varias herramientas que pueden ser usadas a fin de intervenir en las poblaciones de artrópodos perjudiciales para la agricultura. Dentro de estos instrumentos se encuentra el Control Biológico (CB), que desde 1980 ha sido valorado por la población debido a la concientización del uso desproporcionado de insecticidas de síntesis que provocan daños a la salud humana y ambiental. Por ello, desde esa década, las investigaciones han sido enfocadas hacia el desarrollo de métodos alternativos de control de plagas, seguros y capaces de sustituir a las moléculas de síntesis, consideradas altamente tóxicas por la Organización Mundial de la Salud.

Todos estos planteos sobre la imperiosa necesidad de producir alimentos inocuos al ser humano, compatibles con el desarrollo de una agricultura sustentable, motiva la continua búsqueda de estrategias de control que cumplan con los actuales estándares de calidad. Por ello, la utilización de hongos entomopatógenos (HE) en el control biológico de plagas representa una alternativa viable (Badilla, 1990; Ferron *et al.*, 1991; García García *et al.*, 2008; Marques, 2012; García García *et al.*, 2015). Además, en el imaginario colectivo de la población, la palabra “Control Biológico” lleva consigo una imagen positiva de “inocuidad” (James *et al.*, 1998). Sin embargo, el uso de microorganismos nativos y más aún introducidos a un agroecosistema, no representa una ausencia de riesgo hacia los actores presentes en el ambiente. Flexner *et al.* (1986) plantea muy claramente esta dicotomía en el pensamiento de la inocuidad en términos del uso de microorganismos entomopatógenos, haciendo mención a que mismo dentro del mundo académico los pensares son divergentes y hasta a veces laxistas [...] *“algunos científicos sostienen que varios microorganismos tienen acción propia en la naturaleza sin presentar efectos dañinos a las especies no-objetivo, por tanto para ellos no sería necesario realizar una evaluación exhaustiva en el registro previa a su autorización”* [...].

Comprendiendo que el agroecosistema es un ambiente complejo, donde las interacciones entre sus actores no están aún del todo definidas, pensar que el uso de HE pudieran afectar a organismos benéficos es del todo descabellado (Ball *et al.*, 1994). Dentro de este planteo, Roy y Pell (2000) califican a los posibles efectos sobre organismos benéficos en: sinérgicos y antagonistas.

Los efectos sinérgicos se presentarían cuando hay un incremento en la mortalidad del o los insectos plagas respecto a la suma de las mortalidades individuales resultantes de la acción de los enemigos naturales y los HE.

El efecto antagónico se entendería como un resultado antagónico a la disminución en la mortalidad del o los insectos plagas respecto a la adición de las mortalidades individuales de los artrópodos benéficos y el agente de CB.

Fuera de toda divergencia ideológica, dentro de los requisitos que se exigen para el registro de un plaguicida, es demostrar la falta o baja afección en organismos benéficos o no-objetivo (Vandenberg, 1990). La Organización Internacional para el Control Biológico desarrolló protocolos de evaluación teniendo como primer paso los estudios *in vitro*, y a *posteriori* en aquellos productos que presentasen posibles efectos adversos, realizar exhaustivos estudios *in vivo* (Smith y Krischik, 2000).

Como organismos no-objetivos se entiende a todo individuo que no forma parte de un plan e MIP y, por ende, su presencia no sería perjudicial para la práctica agrícola que se realizará. Los organismos benéficos son organismos no-objetivos que prestan servicios agroecosistémicos al cultivo a partir de su diversidad funcional (Martín López *et al.*, 2007). Dentro de este grupo encontramos a los depredadores, parasitoides y polinizadores. Los depredadores son aquellos individuos que poseen un accionar de depredación *per se*, como aquellos que realizan una depredación indiscriminada. La mayoría de las especies de la familia Coccinellidae (Coleoptera), es un ejemplo claro de depredador benéfico, al punto tal de que se incluya su imagen en los planes de MIP. Dentro de los polinizadores en la agricultura, la “abeja europea”, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), es la especie por excelencia (Goerzen *et al.*, 1990). En el caso de los parasitoides, se describen individuos especializados que presentan una acción directa sobre un grupo de artrópodos plaga. El accionar de los parasitoides es un servicio agroecosistémico de excelencia donde su estudio es complejo y escapa a los objetivos de la presente Tesis.

La acción de los HE varía en función del grupo de organismos benéficos en el cual actúan. En el caso de los depredadores, la posible afección de los HE tendría una doble acción. Por un lado, actuando directamente sobre el individuo y por otro disminuyendo la disponibilidad de presas. Sobre las abejas, su accionar es más complejo, debido a que son organismos sociales y existen mayores riesgos debido a que afecciones individuales pueden dar lugar a enfermedades en la colonia (Cantwell *et al.*, 1966). Sin embargo, dicha complejidad no impide la selección de HE capaces de ser utilizados como agentes de biocontrol sobre organismos ectoparásitos de las abejas, como ser *Varroa destructor* Oudemans (Acari: Varroidae), donde trabajos como los de Rodríguez *et al.* (2009) o Hamiduzzaman *et al.* (2012) muestran que el potencial de uso de diferentes cepas entomopatógenas.

Por todo lo expuesto, el presente Capítulo de Tesis posee como objetivo evaluar la acción de un conjunto de cepas aisladas de los géneros *Beauveria*,

Metarhizium y *Paecilomyces* sobre individuos benéficos: depredadores (*Harmonia axydiris* Pallas) y polinizadores (*Apis mellifera* L.).

5.2 Materiales y Métodos

5.2.1 Estudio de la patogenicidad de cepas aisladas sobre individuos adultos de *Apis mellifera*

Se evaluó la patogenicidad de 20 aislamientos nativos de HE de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces* (Tabla 46).

Tabla 46: Listado y nomenclatura de cepas de hongos entomopatógenos nativos evaluados sobre adultos de *A. mellifera*

Nº	CEPA	GÉNERO
1	ACA	<i>Beauveria</i>
2	BinsAR-1	<i>Beauveria</i>
3	BinsAR-2	<i>Beauveria</i>
4	BsoilAR-4.1(2)	<i>Beauveria</i>
5	PsoilAR-4.1(2)	<i>Paecilomyces</i>
6	PsoilAR-2.3(4)	<i>Paecilomyces</i>
7	PsoilAR-24.3	<i>Paecilomyces</i>
8	MsoilAR-2.5(2)	<i>Metarhizium</i>
9	MsoilAR-4.3	<i>Metarhizium</i>
10	MsoilAR-18.5(3)	<i>Metarhizium</i>
11	MsoilAR-10	<i>Metarhizium</i>
12	MsoilAR-15.1	<i>Metarhizium</i>
13	MsoilAR-15.3	<i>Metarhizium</i>
14	MsoilAR-16.3	<i>Metarhizium</i>
15	MsoilAR-2.4(2)	<i>Metarhizium</i>
16	MsoilAR-2.3(1)	<i>Metarhizium</i>
17	MsoilAR-2.3(3)	<i>Metarhizium</i>
18	MsoilAR-2.3(2)	<i>Metarhizium</i>
19	MsoilAR-2.3(4)	<i>Metarhizium</i>
20	MsoilAR-17.9	<i>Metarhizium</i>

Al ser la “abeja europea” individuos sociales, los bioensayos se diseñaron de manera tal de poder representar todos los medios posibles de infección tanto *in vivo* como *in vivo*. En post de ello, se confeccionaron cuatro diferentes formas de inoculación: directa, por contacto, por ingesta y por transferencia. Estas metodologías fueron publicadas en conjunto con otros autores para el himenóptero *Vespa velutina* (Hymenoptera: Vespidae) (Poidatz *et al.*, 2018).

Se recolectaron individuos adultos de *A. mellifera* dentro de las colmenas ubicadas en la Facultad de Ciencias Agrarias (Mendoza, Argentina). Los mismos fueron llevados al laboratorio para su infección. La manipulación de los adultos

requirió del uso de hielo seco para generar una atmósfera pobre en O₂ y así bajar su actividad y resguardar la seguridad durante todo el bioensayo. Los tiempos de exposición al hielo seco se determinaron previamente para no causar daños letales a los individuos.

Para la infección directa (Figura 50 ejemplo 1), se utilizaron cinco individuos adultos por repetición (3 repeticiones por tratamiento), a los cuales se los sometió a una aspersión dentro de una caja de Petri estéril, con 2 mL de una suspensión de conidios del orden de 10⁷ conidios.mL⁻¹ (agua destilada estéril, Tween80® 0,01% v/v). Seguidamente, los individuos adultos infectados se transfirieron a una caja de Petri de 9 cm de diámetro en la cual previamente se le incorporó un fondo de papel secante estéril, junto con un algodón estéril embebido con una fuente alimenticia (solución saturada de hidromiel) y un algodón estéril embebido con una fuente de hidratación (agua destilada estéril).

Para la infección por contacto (Figura 50, ejemplo 2), se utilizaron 5 individuos adultos por repetición (3 repeticiones por tratamiento), los cuales fueron transferidos a una caja de Petri de 9 cm de diámetro que poseía en el fondo un disco de papel secante (del diámetro de la caja) previamente asperjado con 2 mL de una suspensión de conidios del orden de 10⁷ conidios.mL⁻¹ (agua destilada estéril, Tween80® 0,01% v/v) y secados a temperatura ambiente por al menos 20 minutos. Dentro de cada unidad de muestreo (caja de Petri), se colocó un algodón estéril embebido con una fuente alimenticia (solución saturada de hidromiel) y un algodón estéril embebido con una fuente de hidratación (agua destilada estéril).

La infección por ingesta (Figura 50, ejemplo 3), se realizó sobre 5 individuos adultos por repetición (3 repeticiones por tratamiento), los cuales fueron transferidos a cajas de Petri de 9 cm de diámetro en la cual previamente se le incorporó un fondo de papel secante estéril, junto con un algodón estéril embebido con una fuente de hidratación (agua destilada estéril). Como fuente alimenticia se incorporó un algodón estéril embebido con 2 mL de una solución saturada de hidromiel la cual contenía una concentración del orden de 10⁷ conidios.mL⁻¹.

Finalmente, en el método de infección por transferencia (Figura 50, ejemplo 4), se asperjó un individuo adulto de *A. millifera* (previamente marcado en el mesonoto (tórax) con pintura apta para apicultura), con 400 µL de una suspensión de conidios del orden de 10⁷ conidios.mL⁻¹ (agua destilada estéril, Tween80® 0,01% v/v). Inmediatamente la abeja inoculada fue transferida a un recipiente plástico de 10 cm de alto y 10 cm de diámetro en cuyo interior se encontraban 4 individuos adultos no tratados, un cartón estéril como soporte de los mismos, un algodón estéril

embebido con una fuente alimenticia (solución saturada de hidromiel) y un algodón estéril embebido con una fuente de hidratación (agua destilada estéril).

En todos los métodos de inoculación se realizaron tratamientos controles, los cuales se ejecutaron de la misma forma explicada utilizando sólo agua estéril con Tween80® (0,001%*v/v*).

Los individuos utilizados en los bioensayos fueron supervisados previamente que no manifestasen síntomas de intoxicación por CO₂.

Todas las unidades de muestreo se conservaron por 7 días consecutivos en condiciones controladas de temperatura (24°C), humedad (>60% HR) y fotoperíodo (16:8). Diariamente se determinaba la presencia de individuos muertos, los cuales fueron transferidos a cámara húmeda (HR >80%) para favorecer la emergencia de las fructificaciones del hongo.

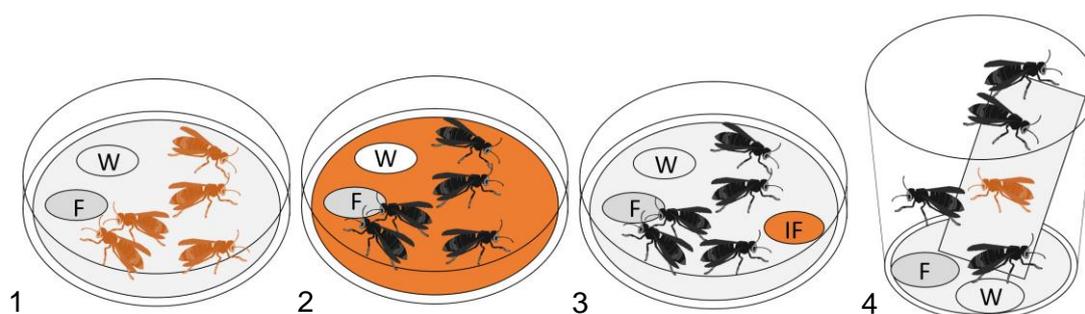


Figura 50: Representación de los diferentes métodos de infección de adultos de *V. velutina* donde: 1. Infección por aspersión directa; 2. Infección por contacto; 3. Infección por ingesta y 4. Infección por transferencia (F) alimento; (W) agua. Fuente: Poidatz *et al.* (2018).

Con el número de insectos muertos, se determinó el Índice de Mortalidad (IM) para cada tratamiento mediante la siguiente ecuación:

$$IM = \frac{SL_C - SL_T}{SL_C}$$

Donde (IM) Índice de Mortalidad, (SL_C) número de adultos sobrevivientes en el control, (SL_T) número de adultos sobrevivientes tratamiento

Se analizaron los resultados obtenidos para cada modo de tratamiento con el software InfoStat 2017p® mediante un ANOVA y se diferenciaron las medias por el test LSD Fisher con α=0,05.

La metodología empleada en esta sección fue objeto de una publicación Poidatz *et al.* (2018, 2019) las cuales se adjuntan a los anexos del presente capítulo.

5.2.2 Estudio de la patogenicidad de cepas aisladas sobre individuos adultos de *H. axydiris*

Se evaluó la patogenicidad de 10 aislados nativos de HE de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces* (Tabla 47).

Tabla 47: Listado y nomenclatura de cepas de hongos entomopatógenos nativos evaluados sobre adultos de *H. axydiris*

Nº	CEPA	GÉNERO
1	BsoilAR-4.1(2)	<i>Beauveria</i>
2	PsoilAR-24.3	<i>Paecilomyces</i>
3	MsoilAR-2.5(2)	<i>Metarhizium</i>
4	MsoilAR-4.3	<i>Metarhizium</i>
5	MsoilAR-18.5(3)	<i>Metarhizium</i>
6	MsoilAR-14.3	<i>Metarhizium</i>
7	MsoilAR-18.5(2)	<i>Metarhizium</i>
8	MsoilAR-2.3(2)	<i>Metarhizium</i>
9	MsoilAR-2.3(4)	<i>Metarhizium</i>
10	MsoilAR-16.3	<i>Metarhizium</i>

En todos los casos se evaluó la acción patogénica de una suspensión de conidios del orden de 10^7 .mL⁻¹. Para ello, se asperjaron individuos de la familia Coccinellidae (Coleoptera) en estado adulto (Roy *et al.*, 2008; Smith y Krischik, 2000).

En cajas de Petri de 15 cm de diámetro se colocaron 5 adultos los cuales fueron asperjados con 2 mL de una suspensión de 10^7 conidios.mL⁻¹ en agua destilada estéril y Tween80® (0,01% v/v). Se utilizó como testigo una solución de agua destilada estéril y Tween80® (0,01% v/v). Se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

Las cajas de Petri fueron conservadas bajo condiciones controladas de temperatura (24°C), humedad (>60% HR) y fotoperiodo (16:8) por un periodo de 7 días, en los cuales diariamente se observó la presencia de individuos muertos. Se colocó en cada caja de Petri un algodón estéril embebido en una solución saturada de glucosa con el objeto de brindar alimento a los adultos durante el periodo del bioensayo. Todo individuo que presentase sintomatologías de infección era retirado

y conservado en cámara húmeda (HR >80%) para favorecer la emergencia micelial. Se determinó el Índice de Mortalidad (IM).

Se analizaron los resultados obtenidos con el software InfoStat 2017p® mediante un ANOVA y se diferenciaron las medias por el test LSD Fisher con $\alpha=0,05$.

5.3 Resultados

5.3.1 Estudio de la patogenicidad de cepas aisladas sobre individuos adultos de *Apis mellifera*

Del análisis de los datos obtenidos de IM se observa a simple vista que existe una diferencia en la acción patogénica de los tratamientos por aspersión ($\bar{x} = 0,45$) y contacto ($\bar{x} = 0,39$), respecto a los tratamientos por ingesta ($\bar{x} = 0$) y transferencia ($\bar{x} = 0$) ($p < 0,0001$), no poseyendo estos últimos acción alguna para ninguna de las cepas evaluadas (Tabla 48). Las Figuras 51 y 52 muestran, a modo de ejemplo; adultos de *A. mellifera* afectados por cepas de *B. bassiana* y *P. lilacinus*.

Tabla 48: Valores de media de IM sobre *A. mellifera* clasificados por cepa y tratamiento

CEPA	ÍNDICE DE MORTALIDAD			
	ASPERSIÓN	CONTACTO	INGESTA	TRANSFERENCIA
ACA	0,00	0,00	0,00	0,00*
BinsAR-1	0,00	0,00	0,00	0,00*
BinsAR-2	0,00	0,00	0,00	0,00*
BsoilAR-4.1(2)	0,33	0,30	0,00	0,00*
PsoilAR-4.1(2)	1,00	1,00	0,00	0,00*
PsoilAR-2.3(4)	0,67	0,33	0,00	0,00*
PsoilAR-24.3	0,27	0,67	0,00	0,00*
MsoilAR-2.5(2)	1,00	1,00	0,00	0,00*
MsoilAR-4.3	1,00	0,00	0,00	0,00*
MsoilAR-18.5(3)	0,67	0,67	0,00	0,00*
MsoilAR-10	0,20	0,33	0,00	0,00*
MsoilAR-15.1	0,13	0,00	0,00	0,00*
MsoilAR-15.3	0,47	0,67	0,00	0,00*
MsoilAR-16.3	0,67	0,33	0,00	0,00*
MsoilAR-2.4(2)	0,00	0,00	0,00	0,00*
MsoilAR-2.3(1)	0,67	1,00	0,00	0,00*
MsoilAR-2.3(3)	0,00	0,00	0,00	0,00*
MsoilAR-2.3(2)	1,00	1,00	0,00	0,00*
MsoilAR-2.3(4)	1,00	1,00	0,00	0,00*
MsoilAR-17.9	0,00	0,00	0,00	0,00*
TESTIGO	0,00	0,00	0,00	0,00*

* No se tuvo en cuenta para el cálculo del IM al individuo infectado y marcado

** Tratamiento con $1,99 \times 10^5$ conidios.g⁻¹ de muestra

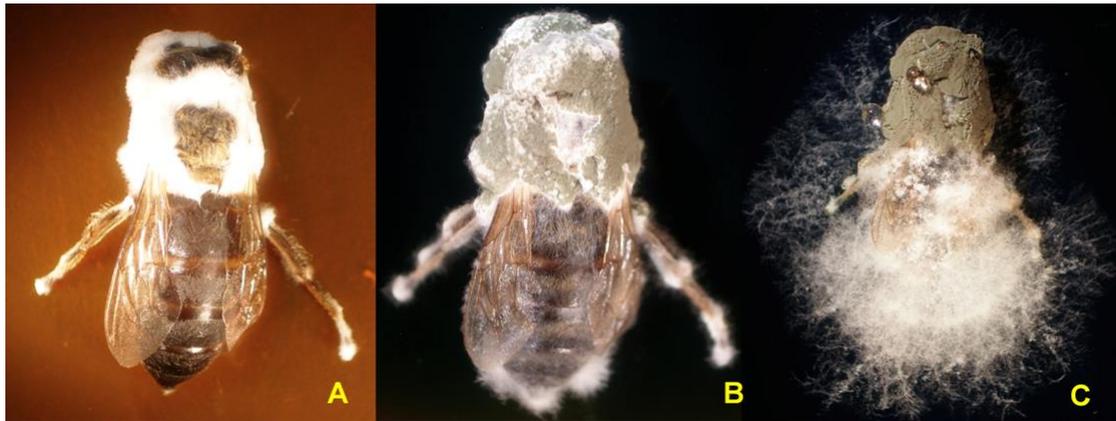


Figura 51: ejemplo de la evolución post mortem de la afección del hongo *M. robertsii* cepa MsoilAR-2.5(2) sobre un individuo adulto de *A. mellifera*. (A) 72 h, (B) 120 h, y (C) 168 h.

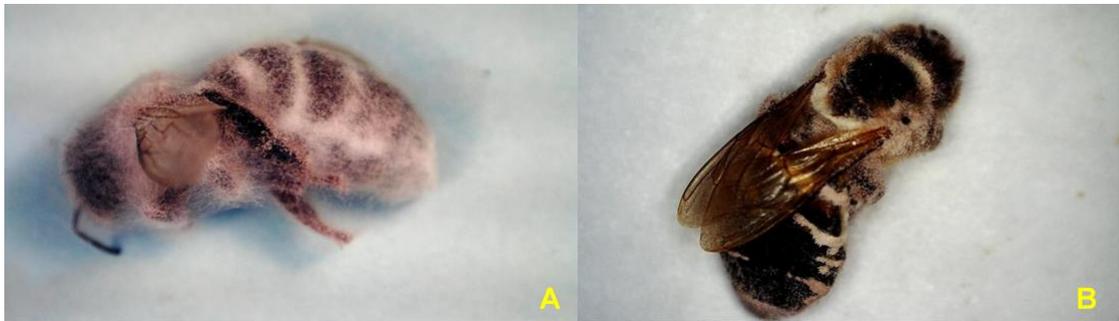


Figura 52: ejemplo de adultos de *A. mellifera* infectados por el hongo *Paecilomyces lilacinus* (A) cepa PsoilAR-24.3 (B) cepa PsoilAR-4.1(2).

Por el contrario, si no se discrimina entre las metodologías de inoculación, las cepas BinsAR-1, BinsAR-2, ACA, ARG, MsoilAR-2.4(2), MsoilAR-17.9 y MsoilAR-2.3(3) no presentaron acción alguna sobre los adultos de *A. mellifera* ($\bar{x} = 0$) ($p < 0,0001$).

Considerando solamente a las inoculaciones por “Aspersión” y “Contacto” para aquellas cepas que mostraron actividad patogénica surgen las tablas 49 y 50:

Tabla 49: Análisis ANOVA de las cepas para el tratamiento “Aspersión” ($p = 0,0004$) sobre *A. mellifera*

ASPERSIÓN	
CEPA	MEDIA
MsoilAR-15.1	0,13
MsoilAR-10	0,20
BsoilAR-4.1(2)	0,27
PsoilAR-24.3	0,27
CCH	0,33
MsoilAR-14.3	0,40
MsoilAR-15.3	0,47
PsoilAR-2.3(4)	0,67
MsoilAR-2.3(1)	0,67
MsoilAR-18.5(3)	0,67
MsoilAR-16.3	0,67
PsoilAR-4.1(2)	1,00
RINCO	1,00
MsoilAR-2.3(2)	1,00
MsoilAR-2.3(4)	1,00
MsoilAR-2.5(2)	1,00
MsoilAR-4.3	1,00

Tabla 50: Análisis ANOVA de las cepas para el tratamiento “Contacto” ($p = 0,0026$) sobre *A. mellifera*

CONTACTO	
CEPA	MEDIA
MsoilAR-4.3	0,00
MsoilAR-15.1	0,00
MsoilAR-10	0,33
BsoilAR-4.1(2)	0,33
CCH	0,33
PsoilAR-2.3(4)	0,33
MsoilAR-16.3	0,33
RINCO	0,33
MsoilAR-14.3	0,47
MsoilAR-15.3	0,67
PsoilAR-24.3	0,67
MsoilAR-18.5(3)	0,67
PsoilAR-4.1(2)	1,00
MsoilAR-2.3(1)	1,00
MsoilAR-2.3(2)	1,00
MsoilAR-2.3(4)	1,00
MsoilAR-2.5(2)	1,00

Del análisis ANOVA de las metodologías de inoculación discriminados por las cepas, surge que de todos los aislamientos evaluados que presentaron acción patogénica en alguna de las inoculaciones no mostraron diferencias significativas entre las metodologías de inoculación ($p > 0,05$).

5.3.2 Estudio de la patogenicidad de cepas aisladas sobre individuos adultos de la familia Coccinellidae

En ninguna de las metodologías de inoculación utilizadas para los diferentes tratamientos, se observó acción patogénica alguna (Tabla 51).

Tabla 51: Valores de media de IM sobre *H. axydiris* clasificados por cepa

CEPA	IM
BsoilAR-4.1(2)	0,00
PsoilAR-24.3	0,00
MsoilAR-2.5(2)	0,00
MsoilAR-4.3	0,00
MsoilAR-18.5(3)	0,00
MsoilAR-14.3	0,00
MsoilAR-18.5(2)	0,00
MsoilAR-2.3(2)	0,00
MsoilAR-2.3(4)	0,00
MsoilAR-16.3	0,00

5.4 Discusión

Las posibles interacciones entre los HE y los organismos “no-objetivo” o benéficos pueden tener resultados positivos (sinergismo) o negativos (antagonismos) (Roy y Pell, 2000). En el caso de darse resultados sinérgicos, se representaría un contexto idílico en todo plan de manejo de plagas, favoreciendo al desarrollo de bioplaguicidas como alternativas viables al uso de plaguicidas de síntesis, tema que se discutirá más adelante.

En el presente capítulo de Tesis se evaluó la acción patogénica que pudieran presentar aislados nativos de HE propuestos para el manejo de plagas de la vid, sobre dos especies benéficas que brindan servicios agroecosistémicos de importancia: la “abeja europea”, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) como polinizador por excelencia y clave en la producción apícola; y un coccinélido “vaquita asiática”, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) como individuo depredador de plagas.

El comportamiento social que posee la especie *A. mellifera* requiere de un diseño experimental diferente al de un depredador, que no responde a esa característica etológica. En organismos sociales existen mayores riesgos debido a que afecciones individuales pueden dar lugar a enfermedades en la colonia (Cantwell *et al.*, 1966). Esta posible mayor susceptibilidad se debe a un aumento en las fuentes de inoculación, que como organismos sociales poseen.

La trofalaxis es un comportamiento muy estudiado en las especies sociales del orden Hymenoptera, donde los individuos adultos se alimentan directamente unos a otros como así también a individuos juveniles. La misma reina es alimentada mediante esta forma (Webster, 2008). Este contacto íntimo entre insectos favorecería a la transferencia horizontal y vertical de enfermedades dentro de la colonia (Baverstock *et al.*, 2010). Asimismo, la acción de colecta de polen y posterior alimentación de la colonia es otra posible puerta de entrada directa al nido social, al mejor estilo “caballo de Troya” (Poidatz *et al.*, 2018).

Esta complejidad del comportamiento requiere que se estudien diversas fuentes de inóculo para poder determinar la posible acción patogénica de las cepas. Por ello, en el caso de la “abeja europea”, se decidió evaluar las posibles fuentes de infección por aspersion (directa), ingesta, contacto y transferencia (trofalaxia). Los resultados obtenidos con adultos de *A. mellifera* concuerdan con muchas de las bibliografías consultadas, donde algunas experiencias registraron efectos patogénicos de cepas de los géneros de *Beauveria* y *Metarhizium* por aspersion directa (Vandenberg, 1990; Ball *et al.*, 1994) tanto en individuos de “abeja europea”

como sobre otros himenópteros polinizadores (Goerzen *et al.*, 1990). Asimismo, se citan infecciones por contacto en himenópteros sociales rudimentarios (Poidatz *et al.*, 2018).

Por el contrario, Mommaerts *et al.* (2009) mencionan que no observaron infección por ingesta en *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae), aún en altas concentraciones. Este resultado es similar a los obtenidos en los ensayos realizados, donde el tratamiento por “ingesta” como fuente de inoculación no arrojó acción patogénica alguna en todos los tratamientos.

Montenegro *et al.* (2009) hacen referencia a la acción antibacteriana y antifúngica que presentan las mieles, debido a su alta riqueza concentración en compuestos fenólicos. De la misma manera, es conocida la acción antiséptica que posee la miel como consecuencia directa, entre otros, de: el bajo pH que presenta, la hipertonidad que disminuye el potencial de agua disponible para el desarrollo de los microorganismos (Mengarelli, 2012). Estas características de la miel hacen suponer que la carga infecciosa que se suministró a los adultos de *A. mellifera* no resulto viable para generar un ciclo de infección y que, por tal motivo, no representaría un riesgo de enfermedad como fuente de inoculación.

Respecto al contacto íntimo entre individuos y la higienización entre ellos (trofalaxis), se midió el riesgo de inoculación mediante la metodología “transferencia”. Meikle *et al.* (2009) plantea que este proceso de higienización es de suma importancia para la colonia, puesto que disminuye considerablemente la carga del inóculo. Considerando esta observación, se podría decir que el individuo marcado e inoculado pudo haber bajado considerablemente la carga de inóculo que poseía, y por ende no haber “transferido” o “contagiado” a los individuos sanos. Esta hipótesis cobra fuerza, al observar que en ninguno de los tratamientos analizados en todas las metodologías, se observó acción patogénica, con la salvedad del individuo inoculado. De este modo, la “transferencia” como fuente de infección en la colonia sería de bajo impacto.

Los otros métodos de inoculación evaluados, “aspersión” y “contacto”, si mostraron acción patogénica sobre individuos adultos de *A. mellifera*. Algunos de los tratamientos fueron 100% efectivos.

Caso contrario ocurrió con el depredador *H. axydiris*, donde los tratamientos evaluados no arrojaron resultados positivos. Esta falta de patogenicidad sobre el coccinélido es coincidente con los resultados obtenidos por otros investigadores, tanto en esta especie como con otros coccinélidos (Roy *et al.*, 2008). James *et al.* (1998), por ejemplo, mencionan que aún exponiendo a los adultos de *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae) a altas concentraciones, no fueron capaces

de mostrar diferencias significativas en los tratamientos, todos ellos con baja mortandad.

Por su parte, Vilcinskas *et al.* (2012) expone cual sería la posible razón por la cual los individuos de *H. axydiris* presentarían cierta resistencia a la acción de los agentes entomopatógenos. Estos autores citan que los individuos de esta especie muy esporádicamente se ven afectados en la naturaleza, y esto se debería al robusto sistema inmunitario que poseen. Esta defensa natural otorga la ventaja de poder sobrevivir en diferentes ambientes, logrando ser un insecto invasor y voraz, lo cual perjudica al nuevo ecosistema colonizado (Holgado *et al.*, 2014).

El mecanismo de defensa descrito para *H. axydiris*, incluye una gran presencia de péptidos con acción antimicrobiana en la hemolinfa, lo cual sería detonado como respuesta inmunitaria al ataque de entomopatógenos (Schmidtberg *et al.*, 2013). El principal componente químico presente sería la harmonina que posee actividad antimicrobiana. Asimismo, Vilcinskas *et al.* (2012) citan a otros péptidos presentes en el mecanismo de defensa, como ser: attacinas, coleopterinas, defensinas, thaumatinas y lisozimas.

Este sistema inmunitario de *H. axydiris* plantea otra dimensión en la discusión: la acción de depredadores como “vectores” de agentes de control biológico. Los coccinélidos son depredadores de pulgones, y su voracidad hace que sean capaces de trasladarse de una colonia de áfidos a otra para saciar su apetito. Este pasaje podría resultar óptimo para el control plagas que son su presa (James *et al.*, 1998; Roy y Pell, 2000; Baverstock *et al.*, 2010).

Hasta este punto, los resultados obtenidos mostraron fuentes de infecciones efectivas y otras descartadas por no presentar un riesgo importante. Del mismo modo, se observaron cepas fúngicas que no poseían acción patogénica sobre ningún individuo evaluado en ninguna de las metodologías. Por el contrario, si hubo cepas con fuerte acción patogénica sobre adultos de *A. mellifera* en los tratamientos por “aspersión” y “contacto”, donde los valores de IM variaban no sólo entre los géneros vistos, sino también entre cepas.

Ahora bien, ¿qué sucede con aquellas cepas que poseen actividad patogénica sobre las plagas de interés agrícola y mostraron también actividad sobre organismos benéficos, más precisamente sobre las abejas? Roy y Pell (2000), plantean muy bien este paradigma en el uso de bioplaguicidas. Las autoras remarcan la diferencia que existe entre hablar de patogenicidad “ecológica” y patogenicidad “fisiológica”, con especial hincapié en que muchos de los HE presentan acción antagónica sólo bajo condiciones ambientales óptimas para el hongo. En el mismo sentido, Jaronski *et al.* (1998) discuten sobre la efectividad de

los bioensayos en condiciones controladas, observando que un hongo entomopatógeno puede presentar una fuerte actividad sobre depredadores, parasitoides o polinizadores, pero que bajo condiciones de campo los efectos son mínimos.

Esta teoría de la diferencia entre condiciones *in vivo versus in vivo* es defendida por varios autores. James *et al.* (1998) sostiene que es importante considerar que los factores ambientales como temperatura y humedad juegan un rol muy grande en la generación de epizootias. Por ejemplo, la temperatura influye directamente sobre la germinación de los conidios y la presión del patógeno en el ambiente, constatación que también plantean Mommaerts *et al.* (2009). En sí, los insectos pueden presentar respuestas a campo que no son posibles de emular bajo condiciones controladas, dando como resultado susceptibilidades diferentes (Roy y Pell, 2000).

Para algunos autores como Ball *et al.* (1994), las condiciones de humedad presentes en los viñedos del Oeste argentino no serían propicias para generar grandes riesgos sobre organismos benéficos. Estos autores mencionan que la ausencia de epizootias en abejas y otros polinizadores, a pesar de la presencia en campo de los HE, refleja el bajo riesgo que representa para estos organismos “no-objetivo”.

Este planteo puede ser discutido ampliamente, donde los tratamientos con bioplaguicidas a base de HE (en este caso nativos), aumentaría la presión en el agroecosistema y con ello se vería aumentado también el riesgo de infección de artrópodos benéficos. Para estos casos, se puede plantear la posibilidad de realizar planes de manejo de plagas donde exista una separación *temporo espacial* entre los tratamientos y los momentos de mayor susceptibilidad de los organismos benéficos (Roy y Pell, 2000). En el caso de la vid, sería posible de visualizar tratamientos fuera de los periodos de mayor concurrencia de polinizadores: floración y invierno.

En todos los casos los resultados obtenidos fueron bajo condiciones controladas, lo cual no implica que a campo posean la misma respuesta esperada. Por tal motivo es necesario recurrir a ensayos *in planta* que permitan reevaluar cada una de las cepas estudiadas, primeramente en invernáculo y si la situación lo requiriese a campo.

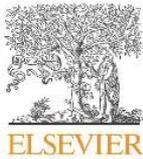
5.5 Bibliografía

- Badilla, F. 1990. Utilización de hongos entomopatógenos en el control de insectos. *Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA)* n°94.
- Ball, B.V.; Pye, B.J.; Carreck, N.L.; Moore, D.; Bateman, R.P. 1994. Laboratory testing of a mycopesticide on non-target organisms: the effects of an oil formulation of *Metarhizium flavoviride* applied to *Apis mellifera*. *Biocontrol Science and Technology*, 4(3):289-296.
- Baverstock, J.; Roy, H.E.; Pell, J.K. 2010. Entomopathogenic fungi and insect behaviour: from unsuspecting hosts to targeted vectors. *BioControl*. DOI 10.1007/s10526-009-9238-5.
- Cantwell, G.E.; Knox, D.A.; Lehnert, T.; Michael, A.S. 1966. Mortality of the honey bee, *Apis mellifera*, in colonies treated with certain biological insecticides. *Journal of Invertebrate Pathology* [http://doi.or./10.1016/0022-2011\(66\)90133-9](http://doi.or./10.1016/0022-2011(66)90133-9)
- Ferron, P.; Fargues, J.; Riba, G. 1991. Les champignons agents de lutte microbiologique contre les ravageurs. *Dost. Cell. Env.*, 5:55-76.
- Flexner, J.L.; Lighthart, B.; Croft, B.A. 1986. The effects of microbial pesticides on non-target, beneficial arthropods. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 16:203-254.
- García García, M.A.; Cappello García, S.; Leshner Gordillo, J.M.; Molina Martínez, R.F. 2008. Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* a partir de insectos silvestres en el estado de Tabasco. *Semana de Divulgación y Video Científico*, México, pp. 261-267.
- García García, M.A.; Cappello García, S.; Leshner Gordillo, J.M.; Molina Martínez, R.F. 2015. Hongos entomopatógenos como una alternativa en el control Biológico. *Kuxulkab´* 15:25-28.
- Goerzen, D.W.; Erlanson, M.A. ; Moore, K.C. 1990. Effect of two insect viruses and two entomopathogenic fungi on larval and pupal development in the alfalfa leafcutting bee, *Megachile rotundata* (Fab.) (Hymenoptera: Megachilidae). *The Canadian Entomologist*, Septiembre/Octubre, pp. 1039-1040.
- Hamiduzzaman, M.M.; Sinia, A.; Guzman-Novoa, E.; Goodwin, P.H. 2012. Entomopathogenic fungi as potential biocontrol agents of the ecto-parasitic mite, *Varroa destructor*, and their effect on the immune response of honey bees (*Apis*

- mellifera* L.). *Journal of Invertebrate Pathology*, DOI: 10.1016/j.jip.2012.09.001
- Holgado, M.; López Plantey, R.; Quiroga, V.; Rabinovich, D.; Molina, M. 2014. Impacto que ocasiona la presencia de *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) sobre otras especies de coccinélidos en duraznero, Mendoza, Argentina. En libro de resúmenes: *XXXVII Congreso Argentino de Horticultura*, Mendoza, 23 al 26 de septiembre 2014.
- James, R.R.; Croft, B.A.; Shaffer, B.T.; Lighthart, B. 1998. Impact of temperature and humidity on host-pathogen interactions between *Beauveria bassiana* and a Coccinellid. *Biological control* 27(6):1506-1513.
- Jaronski, S.T.; Lord, J.; Rosinska, J.; Bradley, C.; Hoelmer, K.; Simmons, G.; Osterlind, R.; Brown, C.; Staten, R. y Antilla, L. 1998. Effect of *Beauveria bassiana* based mycoinsecticide on beneficial insects under field conditions. *The 1998 Brighton Conference – Pests and Diseases*. 651-656.
- Marques, G. 2012. Biodiversidade funcional do solo: qual o papel dos fungos entomopatogénicos na protecção da vinha? Disponible en: *CITAB*, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal, 28 de Mayo 2012.
- Martin López, B.; González, J.A.; Díaz, S.; Castro, I.; García Llorente, M. 2007. Biodiversidad y bienestar humano: el papel de la diversidad funcional. *Ecosistemas* 16(3):69-80.
- Meikle, W.G.; Mercadier, G.; Annas, F.; Holst, N. 2009. Effects of multiple application of a *Beauveria* based biopesticide on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) densities in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Journal of Apicultural Research*, DOI:10.3896/IBRA.1.48.3.13
- Mengarelli, R.H. 2012. Bases científicas de agentes tradicionales utilizados para la cura local de heridas. *FORUM*, 14(1):26-29.
- Mommaerts, V.; Sterk, G.; Hoffmann, L.; Smagghe, G. 2009. A laboratory evaluation to determine the compatibility of microbiological control agents with the pollinator *Bombus terrestris*. *Pest Manag. Sci.* <http://doi.org/10.1002/ps.1778>
- Montenegro, G.; Salas, F.; Peña, R.C.; Pizarro, R. 2009. Actividad antibacteriana y antifúngica de mieles monoflorales de *Quillaja saponaria*, especie endémica en Chile. *Revista Internacional de Botánica Experimental (φ YTON)*, 78:141-146.
- Poidatz, J.; López Plantey, R.; Thiéry, D. 2018. Indigenous strains of *Beauveria* and *Metarhizium* as potential biological control agents against the invasive hornet

- Rodríguez, M.; Gerding, M.; France, A. 2009. Selection of entomopathogenic fungi to control *Varroa destructor* (Acari: Varroae). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 69(4):534-540.
- Roy, H.E. and Pell, J.K. 2000. Interactions between entomopathogenic fungi and other natural enemies: implications for Biological Control. *Biocontrol Science and Technology* <http://doi.org/10.1080/09583150020011708>
- Roy, H.E.; Brown, P.M.J.; Rothery, P.; Ware, R. L.; Majerus, M.E.N. 2008. Interactions between the fungal pathogen *Beauveria bassiana* and three of coccinellid: *Harmonia axyridis*, *Coccinella septempunctata* and *Adalia bipunctata*. *BioControl* <https://doi.org/10.1007/s10526-007-9122-0>
- Schmidtber, H.; Röhrich, C.; Vogel, H.; Vilcinskas, A. 2013. A switch from constitutive chemical defence to inducible innate immune responses in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Biol Lett* 9: 20130006. <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2013.0006>
- Smith, S.F. and Krischik, V. A. 2000. Effects of biorational pesticides on four Coccinellid species (Coleoptera: Coccinellidae) having potential as biological control agents in interiorscapes. *Entomological Society of America* <http://dx.doi.org/10.1603/0022-0493-93.3.732>
- Vandenberg, J. 1990. Safety of four entomopathogens for caged adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 83(3):755-759.
- Vilcinskas, A.; Mukherjee, K.; Vogel, H. 2013. Expansion of the antimicrobial peptide repertoire in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Proc R Soc B* 280: 20122113. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2012.2113>
- Webster, T.C. 2008. Honey Bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). En: Capinera, J.L. (Ed.) *Encyclopedia of Entomology* (2nd Edition), Springer Science+Business Media B.V., pp. 1835-1840.

5.6 Anexos



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Invertebrate Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jip

Indigenous strains of *Beauveria* and *Metharizium* as potential biological control agents against the invasive hornet *Vespa velutina*

J. Poidatz^a, R. López Plantey^b, D. Thiéry^{a,*}^a UMR 1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, INRA, ISVV, Villenave d'Ornon, France^b Laboratory of Phytopathology, Institute of Agricultural Biology of Mendoza (IBAM), Mendoza, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:

Asian hornet
Beauveria bassiana
Metharizium robertsii
 Biological control

ABSTRACT

Alien species often miss parasites in their invaded area, and this is the case in *Vespa velutina*. This invasive hornet predator of bees was accidentally introduced in Europe from East China in 2004. The control of this species is still problematic. Indeed to destroy nests, applicators currently use large spectrum insecticides, which is too costly or dangerous to applicators and also to the environment, affecting non-targeted arthropods (one period). Studying the potential interest of biological control methods may help to propose alternatives in *V. velutina* control. We present here the bioassays in which we assessed the potential control efficiency of different indigenous French isolates of entomopathogenic fungi. We inoculated adults *V. velutina* by different ways: being directly, by walking on a contaminated surface, in the food, or by inter-individual transfers. We tested differences between the isolates and the application methods using two parameters mortality and LT50. The direct inoculation method was the most efficient modality, then the contact, transfer and food. Considering all contamination methods, there was no difference on susceptibility or mortality among different isolates. Still the LT50 was quite short in all isolates (average 5.8 ± 0.44 d), and their virulence was quite high: we conclude that there is high potential in using such entomopathogens as a biological control agent against *V. velutina*.

1. Introduction

During the invasion process, alien species often miss parasites in invaded areas, because of reduced probability of their transport with the host and the unsuitability (climatic or biologic) of the invaded area for those parasites (Torchin et al., 2003). This reduced parasitism allows them, the alien species, to expand quickly and reach high population levels, which often results in damages (Torchin et al., 2002). Social insects are particularly good invaders, thanks to the adaptability provided by their life in society (Moller, 1996). Social insects are characterized by their group integration, the division of labor and the generation overlap; these characteristics are in favor of multiplied interactions, in particular in their nests. Indeed, members of the colony have to supply the nest with food, water and construction material foraged in the outside (Spradbery, 1973; Richter, 2000), and this enhances contamination transmission risks. Some ants developed prophylactic strategies to limit this risk (Cremer et al., 2007), like an ultra-specialization of the tasks to limit the interactions between extra and intra colony individuals, and limit direct queen and court interactions with the outside (Ugelvig and Cremer, 2007). For some bees, the use of chemicals to disinfect the colony structure from mandibular glands has been demonstrated (Cane et al., 1983), while for ants the use of formic acid is more

favored (Stow and Beattie, 2008). However, the sociality level of Vespids is lower than for these bees or ants, the colonies being much smaller and less complex (Jeanson et al., 2007), and they might thus be more susceptible to infections.

Vespa velutina var. *nigrithorax* (Lepelletier, 1835) (Hymenopteran: Vespidae), native from East Asia, is an invasive predator of arthropods that was accidentally introduced in France around 2004. Since then, the “yellow legged hornet” spread in Europe: Spain, Portugal, Italy, Germany, Belgium, recently in England and in Scotland (Monceau and Thiéry, 2017). This species is a very efficient predator of pollinators, especially of honeybees, thus impacting both the apiculture and the global biodiversity directly and indirectly (Matsuura, 1988; Monceau et al., 2014). *V. velutina* has an annual development cycle: a foundress initiates the nest in spring, the colony grows until the end of autumn when the new sexed (males and gynes) are produced. The colonies reach easily 4 000 individuals at this stage, and an estimation of the global population produced annually by a nest can reach 15 000 individuals (Rome et al., 2015). The nest is made by mixing plant fibres with water and saliva (Spradbery, 1973) and closed with one entrance hole in its side. The nests are located mostly in open spaces (trees, bushes, under frames), and more rarely in closed places like roofs, holes, etc. (Monceau et al., 2014). The density of nests in invaded area can be

* Corresponding author at: UMR 1065 SAVE, INRA de Bordeaux, 71 rue Edouard Bourlaux, 33882 Villenave d'Ornon Cedex, France.
 E-mail address: denis.thiery@inra.fr (D. Thiéry).

<https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.021>

Received 30 May 2017; Received in revised form 13 February 2018; Accepted 28 February 2018

Available online 01 March 2018

0022-2011/ © 2018 Published by Elsevier Inc.

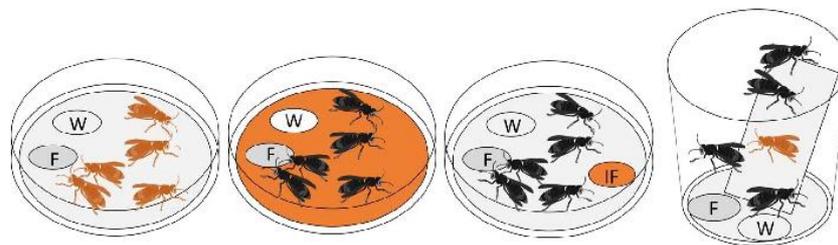


Fig. 1. The different inoculation methods used in the experimentation. Direct: direct inoculation of the hornets (orange), Contact: inoculated filter paper, Food: inoculated food (IF, orange), and Transfer: one inoculated individual (orange) with four uncontaminated individuals. In each box there are food (F) and water (W).

impressive given the observed area (Monceau and Thiéry, 2016), and their destruction implies both material and qualified people. The methods that are currently used to limit the impact of *V. velutina* are (a) trapping (for now nutrition-traps), in spring for foundresses, and in summer-autumn for apiaries protection by capturing hunters, (b) physically protecting the apiaries by using nests, grills, and (c) nest destruction, using chemical insecticides (powders of liquids) or Sulphur dioxide (gas). A significant impact of traps on non-target insects was already reported as well as their inefficiency (Beggs et al., 2011; Monceau et al., 2012; Monceau et al., 2013). The direct nest destruction methods by insecticide or gaseous Sulphur injection in the nest are efficient, but can have side effects on the environment if the nests are left in place after chemical treatment through food chain, and also for the applicator, with irritations and respiratory problems (H. Guisnel, Association Anti Frelon Asiatique, personal communication). Nevertheless, whatever the technique of nest control, locating the nests early in season, i.e. before predation on hives, remains the major unsolved limit, the colonies being discrete, numerous, often not accessible and well-hidden mostly in the trees foliage (Monceau et al., 2014).

Biological control is a long known methods in which microbial organisms control pest population by predation or parasitism in many countries (Lacey et al., 2015). Biological control, however, has not yet been examined with *V. velutina* about its risk on non-target species, dispersion capacities nor non-adapted development cycle (Beggs et al., 2011; Monceau et al., 2014; Villemant et al., 2015). The possibility to use entomopathogenic fungi as an alternative method to the control with synthetic products has taken on some importance, emphasizing that practically all orders of the Insecta class are susceptible to be affected by entomopathogenic fungi (Alean, 2003; Rehner, 2005). On the other hand, a few studies on hymenopterans biocontrol by fungus exist: on micro-hymenopterans (Lord, 2001 (Bethyridae), Potrich et al., 2009 (Trichogrammatidae), Rossoni et al., 2014 (Braconidae), Agüero and Neves, 2014 (Scelionidae), Kpindou et al., 2007 (Encyrtidae), ants (Jaccoud et al., 1999; Tragust et al., 2013; Loreto and Hughes, 2016), and bees (most of the time for varroa treatment (Kanga et al., 2003; García-Fernández et al., 2008), or susceptibility (Conceição et al., 2014)); also Rose et al., 1999 and Harris et al. (2000) explored the potential control of such generalist entomopathogens on an invasive Vespidae, *Vespa vulgaris* (Vespidae), in New-Zealand.

Thirteen years after the introduction of *V. velutina* in France, the potential entomopathogenic fauna for this invasive hornet has not yet been studied, while we urgently need development of different biological control methods. This study aims to provide knowledge that could contribute to enlarge the panel of tools that can be used to control directly or indirectly the Asian hornet and limit its impact on bees, and also to reduce the risks on applicators.

The risks of contamination by infectious agents are significant in social insects and thus in hornets: they can be in contact with fungus in different ways, which inspired the modalities of inoculations and transfers of spores for us to complete this study: by direct contact with spores (rain, water), by walking on contaminated surfaces (ground, trees, preys, etc.), by eating contaminated food, and by trophallaxis or grooming with a contaminated individual from its colony. In this study we assessed the potential control efficiency of different indigenous French isolates of entomopathogenic fungi that we inoculated to *V. velutina* by these different ways.

2. Material and methods

2.1. Insects collection

We collected individuals of *V. velutina* workers hunting in front of hives and in untreated nests. Before the experiment, the insects were maintained in groups in meshed boxes (10 × 20 × 10 cm) inside a climatic chamber at 23 °C ± 1 °C, 12 h/12 h light. They had *ad libitum* access to water and honey like in previous studies (Poidatz et al., 2017).

2.2. Fungus collection and multiplication

In the spring of 2015 a composite sampling of the first layer of the soil (20 cm) was made in the interrows of our experimental INRA vineyard (Villeneuve-d'Ornon, South West of France, 44°11'84"30.4"N 0°34'36.9"W). This sampling consisted in the collection of 4 sub-samples per hectare, which were sieved up to 45 mesh and preserved at 4 °C until use (Quesada-Moraga et al., 2007; Marques, 2012). A total of 20 sub-samples were collected for a surface of 5 ha.

Afterwards, the bait insect technique (Asensio et al., 2003; Meyling, 2007; Tuininga et al., 2009) was carried out using L4 and L5 larvae instar of *Lobesia botrana* (Denis & Schiffmüller) (Lepidoptera: Tortricidae) which were placed in groups of 5 in Petri dishes with soil samples (3 replicates per one soil sample). The larvae were from the INRA laboratory colony isolate reared on artificial medium as described in Thiéry and Moreau (2005) (22 °C, 60%RH, 16:8 lum.). The Petri dishes were placed at controlled temperature, humidity and photoperiod (24 °C, >60% RH and 16:8). The dishes were observed daily and the individuals who manifested symptoms were transferred to a humid chamber in order to favor the development and possible fructification of the entomopathogenic fungi. After isolating the fungi on this first bait, we screened them to see possible action on a hymenopteran, by inoculating them on adults of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). By this technique were obtained the isolates of *Metarhizium robertsii* EF2.5 (2), EF3.5 (1), EF3.5 (2) and EF3.5 (4), that all had pathogenic action on hymenopterans. The growing and multiplication of all fungi took place in Petri dishes with OAC media (Oat 40 g, Agar (PDA, BK095HA, Biokar) 20 g, Chloramphenicol (SIGMA Aldrich, Germany) 50 mg, QSP 1L) (Cañedo and Ames, 2004; Moino et al., 2011; Marques, 2012) (darkness, room temperature).

The isolate of *Beauveria bassiana* BB came from Bretagne (North West of France). It was found directly in a foundress of *V. velutina* in spring 2016 (Poidatz et al., in prep). After a rapid cleaning of the extern cuticle of the infected individual using a hypochlorite bath of 10 s, we cut the hornet in 3 parts that we placed in different Petri dishes on growing media OAC as described before. All isolates were purified by multi-passaging, i.e. multiple subculture of the fungi in Petri dishes for minimum 5 generations.

2.3. Inoculation methods

For assessing the potential control efficiency of the different isolates, we did different inoculation methods: direct contact: Direct, by contact with an inoculated surface: Contact, in the food: Food or inter-individual transfer: Transfer (Fig. 1).

All the petri dishes roofs were pierced with a thin needle for aeration (15 holes) a day before the experiment. The day of the experiment, maximum two hours before application, the spore suspensions were prepared under sterile conditions, and fixed at a concentration around 10^7 spores/ml of pure sterile water. As we treated very quickly the hornets after making the spore suspension, we didn't add any solvent in the suspension. For the control hornets in each modality, we used distilled water instead of spore suspension.

The hornets were cooled 20 min in falcon tubes that were put in ice, so they can be manageable during the fungus inoculation. The hornet workers don't survive very long when they were isolated (personal observation), probably because of social grooming lacks. We thus decided to leave them in groups after inoculation. For the three first treatment methods, the hornets were put in groups of five in each Petri dishes of 10 cm diameter, that contained a thick filter paper on the ground, a cup with water in cotton, and a cup with food (candi sugar (glucose, fructose and saccharose) purchased from NutriBee propolis (Vétopharma)). For the fourth treatment method, c.a. contamination by transfer, we chose bigger pots (plastic honey pots, 9 cm diam × 10 cm diam × 12 cm high) with a strip of embossed paper allowing the hornets to climb on it thus to avoid forced contacts. After placing the hornets in the different arenas, we waited 5–10 min for hornets wake up.

After inoculation, the boxes containing the hornets contaminated by the different modalities were all placed in a climatic chamber at $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, photoperiod of 12 h.

Four repetitions of the bioassay were made: in October 2015 (10 individuals/modalities ((*Metarhizium r.* 4 isolates + control) × 4 inoculation methods); Nb individuals = 200, N = 2), in August 2016 (10 individuals/modalities (all 5 isolates + control) × 4 inoculation methods); Nb individuals = 240; N = 2), the same in September 2016 (Nb individuals = 240, N = 2) and in October 2016 (Nb individuals = 240, N = 2).

• Direct inoculation

The hornets were contaminated by immersion (< 1 s) in a spore suspension. The forceps used to manipulate the hornets for this method were first disinfected with ethanol (90%) then washed with water before switching from one isolate to another.

• Inoculation by contact

In this modality, 3 ml of spore suspension was poured uniformly on the filter paper in the Petri dish using a pipette. The paper dried five minutes before the candy, the water and the hornets were put inside the box.

• Inoculated food

In this modality, 1 ml of spore suspension was poured in 10 mg of cooked tuna (from the market). The fish was left in the boxes only 24 h to avoid hornet intoxication by potential bacterial development.

• Inter hornets contamination, transfer

Four hornets were placed in a pot as described above in 1.3. One extra individual was directly inoculated as described in "direct inoculation" paragraph, then placed on the opposite side of the box from the other hornets before reanimation.

2.4. Measured parameters

• Mortality Index (MI)

Each day after the inoculation, we removed the dead hornets from the different boxes and placed them individually in labeled hemolysis tubes closed by a cotton copper. We maintained the humidity of the

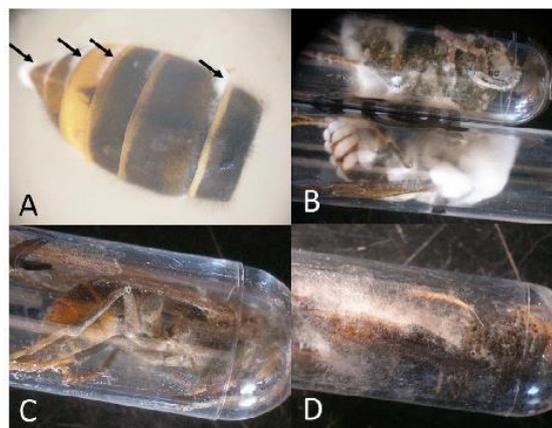


Fig. 2. *V. velutina* workers infected by entomopathogens. A. An entomopathogenic fungus is making its way between the cuticle's segments of the abdomen of a hornet. B. Two contaminated hornets by *Metarhizium robertsii* (white mycelium, olive green spores)(top) and *Beauveria bassiana* sp. (white mycelium, cream spores)(bottom). A dead hornet with opportunistic fungus that is growing on its surface (*Penicillium* sp. C, *Aspergillus* sp. D).

tubes by adding distilled water in the copper using a pipette.

The isolated dead individuals were then observed each day for the fungus to emerge from the cuticle's intersections (Fig. 2A and B). The death of the hornets could be due to multiple factors (Fig. 2C and D, or bacterial infection, stress, etc.). Each death caused by entomo-pathogen infection was then counted, to correct the number of dead by treatment and obtain the number of dead by entomo-pathogenic infection per treatment.

$$MI = \frac{\text{Control alive insect} - \text{Treatment alive insect}}{\text{Control alive insect}}$$

• Lethal time 50 (LT50)

The LT50 is the moment after inoculation when 30% of the hornets died by infection.

• Statistical analysis

All results have been analyzed in ANOVA with a test LSD Fisher (alpha = 0.05) using the software Infostat update 2016.

3. Results

No death of hornets due to entomopathogenic fungi was observed in the control.

3.1. Comparisons of the inoculation methods

For all the isolates, the most efficient modality concerning mortality was the direct inoculation, statistically more efficient than all inoculation modalities. The contact method was not different from the transfer method, and the transfer method was not different from the

Table 1
Average mortality and compared mortality in function of inoculation methods. Values with the same letter are not significantly different (p > 0.05) after parametric LSD Fisher test (alpha = 0.05; DMS = 0.12264; Error: 00746; gl: 151).

Treatment	Average	N	SD	
Food	0.14	38	0.04	A
Transfer	0.26	38	0.04	A B
Contact	0.35	38	0.04	B
Direct	0.60	41	0.04	C

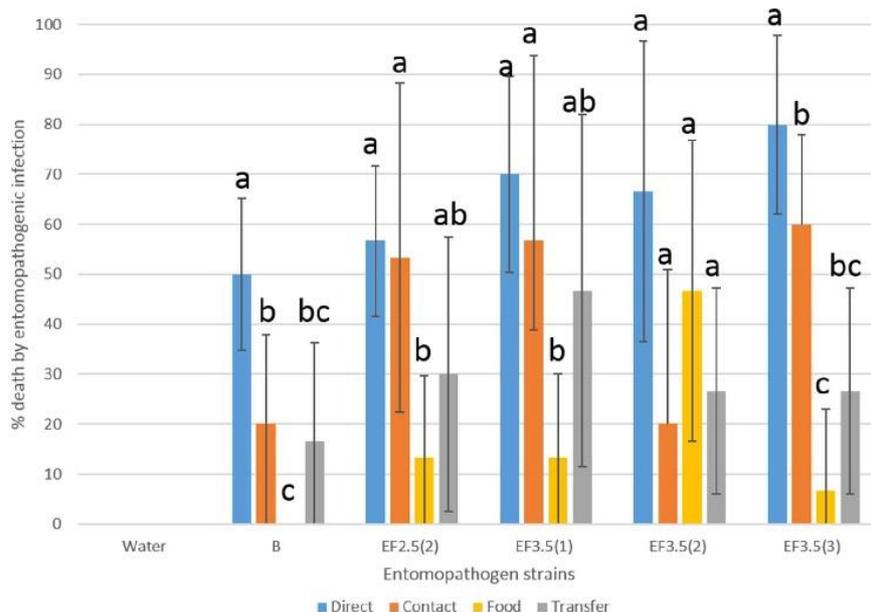


Fig. 3. Lethality of entomopathogens isolates in function of the inoculation methods, i.e. percentage of dead hornets by entomopathogen infection. (ANOVA tests). The vertical bar over the column represent standard deviation (SD).

food method. This last treatment (food) was less efficient than the contact modality (LSD Fisher test) (Table 1).

3.2. Comparison on methods and isolates

For all strains the direct application method was the most efficient, and except in EF3.5(2), the contact method appeared to have mild effect. In EF2.5(2) and EF3.5(1) the transfer between individuals was also quite efficient, when in EF3.5(2) no differences between inoculation method could be assessed (Fig. 3).

No significant difference was observed between the different application methods in function of isolates and fungi in their LT50 (ANOVA).

• Mortality

Considering all the inoculation methods, no difference could be found amongst the isolates virulence (ANOVA, $p = 0.31$). No difference could be found amongst the isolates for the direct inoculation method (ANOVA, $p = 0.14$), neither for the contact (ANOVA, $p = 0.24$) nor the transfer (ANOVA, $p = 0.47$) inoculation method, however, for the food inoculation method there was a difference (ANOVA, $p = 0.009$): the isolate EF3.5(2) was significantly more efficient (LSD Fisher test).

• Lethal Time 50 (LT50)

No significant difference was observed between the different isolates and fungi in their LT50 (Table 2).

Table 2
Lethal time 50 of entomopathogenic isolates, i.e. time to kill 50% of the hornets, in function of the inoculation methods.

Isolate	LT50 (Days, Average ± SD)
EF2.5(2)	5.68 ± 1.08
EF3.5(1)	5.86 ± 1.17
EF3.5(2)	5.49 ± 1.38
EF3.5(3)	5.41 ± 1.18
B	6.25 ± 0.67

3.3. Comparisons of each method for each isolate

4. Discussion

This study offers two subjects, the first in the primary knowledge about the mode of infection of entomopathogenic fungi over *Vespa* species, and the second is the prospective of future control of *V. velutina*. We demonstrated that French indigenous entomopathogenic fungi could be developed for *Vespa* control by assessing their efficiency with different inoculation approach.

Microbial agents must be rigorously evaluated for reducing the potential environmental impact by its prescribed use. The main properties attributed to the use of entomopathogenic fungi are: strong specificity between pathogen-host, almost no presence of toxic residues, persistence in time after application, a lower cost than synthesis products, respect for biodiversity, but also a high potential as a source of metabolites for the creation of alternative phytosanitary products, etc... (Franco et al., 2012).

Among the diversity of entomopathogenic fungi, the literature cites two gender as the most described and used in biological control: *Metarhizium* spp. and *Beauveria* spp. (both Ascomycota: Hypocreales) (Bidochka et al., 1998; Bidochka and Small, 2005; Rehner, 2005). Both genders can have host specificity given the isolates and climatic conditions (Ignoffo, 1992; Rangel et al. 2015). The infection mechanism is quite similar in these two fungi, being first a phase of recognition and fixation of the spore to the insect host, its penetration in the insect tegument, then the evasion of the host immune defenses, the proliferation in the host body (provoking the host death), and finally the reemergence from the host and sporulation (Boucias and Pendland, 1991; Bidochka and Small, 2005; Ortiz-Urquiza and Keyhani, 2013). Isolates of *Metarhizium* are already on the market for biological control of pests, mostly lepidopteran and dipteran control (Appendix A). *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. has yet no host specificity connected to genetic described in the European clade (Rehner, 2005).

The reduction of adult hornet longevity by the application of the different isolates observed in the study is coherent with the study of Harris et al., 2000 on the same type of pathogens (2.1–5.6 days). The quite high variability in the mortality intra/inter sessions could be explained here by the fact that the hornets used in this study to be contaminated were savage individuals collected in the field, with unknown

variation in their age, past, and therefore in their immune system and sensitivity to infection (Franceschi et al., 2000; Moret and Schmid-Hempel, 2000; Rolff, 2001; Doums et al., 2002). In the direct contamination treatment we observed the cumulated effect of both direct contamination and transfer between the adults.

The applied possibilities of these biocontrol methods of inoculation are numerous, but given our results, the one that seems best suited for *V. velutina* control is direct application of spore suspensions on and in the hornet colony. A direct treatment of nests could cumulate the effects of the “direct”, the “contact” and the “transfer” application modalities. Tests on nests have to be made to assess the isolates efficiency and to monitor the inoculum quantity needed given the nest size, as done in Harris et al. 2000 (effect on emergence rate and adult survival).

The “contaminated food” modality was not very efficient on the adults for all the tested isolates, but we have to note that the workers may be interested in not eating but collecting it for further use, i.e. mostly nutrition of the larvae as the prepared food was protein-made. Adult hornets don't need proteins for their survival, they depend only on carbohydrates consumption (Spradbery, 1973; Richter, 2000). Monceau et al. 2014 showed that the roles concerning nest defense of *V. velutina* seem to develop with their age, and we can thus hypothesize that the attraction to protein food could also depend on age. To assess the control potential of this modality at the nest scale, further studies on the impact of contaminated food on hornet's larvae should be investigated, using different kinds of food.

We observed different responses of entomopathogenic fungal isolates according to the application methods to examine Trojan horse strategy. Trojan horse strategy is the method to use workers to bring a disturbing bait into their colonies, in our case using entomopathogens. It is the strategy after having fungal spray on nest. It could be envisaged as two different ways. First, by actively trapping and directly contaminating *V. velutina* workers with a spore suspension before releasing them so that they can return to their colony. Second, by using food bait contaminated with the fungi, that will be brought back to the larvae: but to do this, a selective “trap” must be fabricated, that will capture and let go hornet workers with the contaminated food, but not other species.

For potential biocontrol solution, a combination of several fungi isolates could thus be investigated. Moreover, the climatic requirements and adaption of isolates (García-Fernández et al., 2008) were not evaluated in our study for the experimental purpose: a combination of several isolates adapted to different climatic conditions could thus overcome such eventual limits and enhance the biocontrol efficiency (Inglis et al., 1995). Two risks could however be considered in the case of isolate combinations: the possibility of competition between fungal and possible decrease of efficiency, and the panel enlargement of non-

target insects that could be contaminated.

The risk of transmission of such biological agents to other insects has not been measured yet but should be considered low, however the existence of the risk to infect non-targeted sources (e.g. foraging sites of the hornets) must be kept in mind. The UV deactivation of spores potentially transported by the hornets may be very efficient (Ignoffo, 1992; Inglis et al., 1995; Fernandes et al., 2015), and added with dehydration it could impact significantly the spore survival on non-targeted sources. Another point to check is the mobility and behavior of infected hornets which will determine any possible dispersion of the contamination.

From an applied point of view, the efficiency of these isolates could be enhanced by adapted formulations, which could improve their infection efficiency, pathogenicity duration, climatic resistance, most of the time using carrier, natural or synthetic oils (Inglis et al., 1995; Thompson et al., 2006; Fernandes et al., 2015; Hicks, 2016). All these factors make the formulation play an important role at the persistency of entomopathogenic fungi in the environment (Borges, 1998; Parker et al. 2015), where a good composition of additives could give a better way to hold the fungus species during time, even months after treatment.

To conclude, this is the first study exploring the potential efficiency of indigenous entomopathogens to biologically control the invasive Asian hornet *Vespa velutina*. We tested five isolates with different inoculation methods on workers, and found that they are efficient when applied directly. Some future work should be done on larvae and on whole nests, in different climatic conditions, to conclude about the potential treatment efficiency.

5. Author contributions statement

JP, RLP and DT conceived the ideas and designed methodology; JP and RLP collected the data; JP and RLP analyzed the data; JP, RLP and DT wrote the manuscript.

Acknowledgements

This work was done during the PhD thesis of the first and the second author. We thank Olivier Bonnard and Salomé Gotreau for helping us capture the hornets used in the experiment. We thank Bayer Crop Science, represented by Dr. Bénédicte Laborie, for the first author financial support. We thank Mrs Avril Welwood for English revising.

Conflict of interest

The authors declare no conflicting interest in this research.

Appendix A. Examples of biological control agent formulations in the market, for *Metarhizium* sp. and *Beauveria bassiana*

Fungi	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Beauveria bassiana</i>
Commercial appellation	AGO BIOCONTROL METARHIZIUM 50 [®] , BioGreen [®] , GREEN GARD [®] , BIO 1020 [®] , Green Muscles [®] (Bidochka and Small, 2005)	BioPower [®] , Naturalis [®] , Biosoft [®] , Ostrinil [®]

Appendix B. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.021>.

References

- Agüero, F.M.A., Neves, O.J., 2014. Selectivity of *Metarhizium anisopliae* to *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Scelionidae). *Investigación Agraria* 16, 21–28.
- Alean, I.R.I.N.A., 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Grade work presented as final project for the Agricultural Microbiology and Veterinary Grade, Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas Microbiología Agrícola y Veterinaria, Colombia.
- Asensio, L., Carbonell, T., López-Jimenez, J.A., López-Iborra, L.V., 2003. Entomopathogenic fungi in soils from Alicante province. *Span. J. Agri. Res.* 1, 37–45.
- Beggs, J.R., Brockerhoff, E.G., Corley, J.C., Kenis, M., Masciocchi, M., Muller, F., Rome, Q., Villemant, C., 2011. Ecological effects and management of invasive alien Vespidae. *Biocontrol* 56, 505–526. <http://dx.doi.org/10.1007/s10526-011-9389-z>.
- Bidochka, M.J., Kasperski, J.E., Wild, G.A., 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and

- near-northern habitats. *Can. J. Bot.* 76, 1198–1204.
- Bidochka, M.J., Small, C., 2005. Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. In: Vega, Fernando E., Blackwell, Meredith (Eds.), *Insect-Fungal associations: Ecology and evolution*, Oxford University Press, London.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C., 1991. Chapter 5: Attachment of Mycopathogens to cuticle. In: Cole, G.T. et al. (Ed.), *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. Springer Science + Business Media, New York. pp. 101–127.
- Burges, H.D., 1998. Formulation of myoinsecticides. In: Burges, H.S. (Ed.), *Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 131–185.
- Cane, J.H., Gerdin, S., Wife, G., 1983. Mandibular gland secretions of solitary bees (Hymenoptera: Apoidea): potential for nest cell disinfection. *J. Kansas Entomol. Soc.* 199–204.
- Cañedo, V., Ames, T., 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. In: Cañedo, V., Ames, T. (Eds.), *Internacional Center of Potato*, Lima, Peru: CIP. <http://doi.org/cip/cgiar.org>, www.cipotato.org.
- Conceição, P.de J., Neves, C.M.de L., Sodré, G.da S., Carvalho, C.A.L.de, Souza, A.V., Ribeiro, G.S., Pereira, R.de C., 2014. Susceptibility of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) worker bees to *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Sociobiology* 61, 184–188.
- Cremer, S., Amittage, S.A.O., Schmid-Hempel, P., 2007. Social immunity. *Curr. Biol.* 17, R693–R702. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.008>.
- Doums, C., Moret, Y., Benelli, E., Schmid-Hempel, P., 2002. Senescence of immune defence in *Bombus* workers. *Ecol. Entomol.* 27, 138–144.
- Fernandes, E.K.K., Rangel, D.E.N., Braga, G.U.L., Roberts, D.W., 2015. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Current Genetics*, 19 May 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s00294-015-0492-z>.
- Franceschi, C., Bonafé, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., De Benedictis, G., 2000. Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 908, 244–254.
- Franco, K., Rodríguez, S., Cervantes, J., Barranco, J., 2012. Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente*, Mexico 12, 143–160.
- García-Fernández, P., Santiago-Álvarez, C., Quesada-Moraga, E., 2008. Pathogenicity and thermal biology of mitospicid fungi as potential microbial control agents of *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasitic mite of honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* 39, 662–673. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2008049>.
- Harris, R., Harcourt, S.J., Glare, T.R., Rose, E.A.F., Nelson, T.J., 2000. Susceptibility of *Vespaula vulgaris* (Hymenoptera: Vespidae) to Generalist Entomopathogenic Fungi and their potential for wasp control. *J. Invertebrate Pathology* 75, 251–258. <http://dx.doi.org/10.1006/jipa.2000.4928>.
- Hicks, B.J., 2016. Optimization of *Beauveria bassiana* in a spray formulation against *Choristoneura fumiferana*. *Can. J. For. Res.* 46, 543–547. <http://dx.doi.org/10.1139/cjfr-2015-0435>.
- Ignoffo, C.M., 1992. Environmental Factors Affecting Persistence of Entomopathogens. *Fla. Entomol.* 75 (4), 516–525.
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Johnson, D.L., 1995. Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Biological Control* 5 (4), 581–590.
- Jaccoud, D.B., Hughes, W.O.H., Jackson, C.W., 1999. The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Entomol. Exp. Appl.* 93, 51–61. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1570-7458.1999.00561.x>.
- Jeanson, R., Fewell, J.H., Gorelick, R., 2007. Emergence of increased division of labor as a function of group size. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 62, 289–298.
- Kanga, L.H.B., Jones, W.A., James, R.R., 2003. Field trials using the fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) to control the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies. *J. Econ. Entomol.* 96, 1091–1099.
- Kpindou, O.K.D., Sinsin, B., Kooyman, C., 2007. Impact de *metarhizium anisopliae* var *acidum*, sur les hyménoptères: cas de *Anagrus lopezi* (De Santis) et de *Cotesia plutellae* (Kurdjumov). *Annales des Sciences Agronomiques* 9. <http://dx.doi.org/10.4314/asab.v9i1.43221>.
- 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.
- Lord, J.C., 2001. Response of the Wasp *Cephalonomia tarsalis* (Hymenoptera: Bethyloidea) to *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) as Free Conidia or Infection in Its Host, the Sawtoothed Grain Beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae). *Biol. Control* 21, 300–304. <http://dx.doi.org/10.1006/bcon.2001.0942>.
- Loreto, R.G., Hughes, D.P., 2016. Disease Dynamics in Ants. *Advances in Genetics* 287–306.
- Marques, G., 2012. Biodiversidade funcional do solo: qual o papel dos fungos entomopatógenos na proteção da vinha? CITAB Presentation, University of Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal 28th October.
- Matsuura, M., 1988. Ecological study on vespine wasps (Hymenoptera: Vespidae) attacking honeybee colonies. I. Seasonal changes in the frequency of visits to apiaries by vespine wasps and damage inflicted, especially in the absence of artificial protection. *Appl. Ent. Zool.* 23, 428–440.
- Meyling, N.V., 2007. Methods for Isolation of Entomopathogenic Fungi From Soil Environment. Laboratory manual, Department of Ecology, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen.
- Moller, H., 1996. Lessons for invasion theory from social insects. *Biol. Conserv.* 78, 125–142.
- Monceau, K., Bonnard, O., Thiéry, D., 2012. Chasing the queens of the alien predator of honeybees: a water drop in the invasiveness ocean. *Open J. Ecol.* 02, 183–191. <http://dx.doi.org/10.4236/oje.2012.24022>.
- Monceau, K., Arca, M., Leprière, L., Mougel, F., Bonnard, O., Silvain, J.-F., Maher, N., Arnold, G., Thiéry, D., 2013. Native prey and invasive predator patterns of foraging activity: the case of the yellow-legged hornet predation at European honeybee hives. *PLoS ONE* 8, e66492. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0066492>.
- Monceau, K., Bonnard, O., Thiéry, D., 2014. *Vespa velutina*: a new invasive predator of honeybees in Europe. *J. Pest. Sci.* 87, 1–16. <http://dx.doi.org/10.1007/s10340-013-0537-3>.
- Monceau, K., Thiéry, D., 2016. *Vespa velutina* nest distribution at a local scale: an eight-year survey of the invasive honeybee predator. *Insect Sci.* <http://dx.doi.org/10.1111/1744-7917.12331>.
- Monceau, K., Thiéry, D., 2017. *Vespa velutina*: current situation and perspectives. *Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia Anno LXIV* 137–142.
- Moret, Y., Schmid-Hempel, P., 2000. Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers. *Science* 290, 1166–1168.
- Ortiz-Urquiza, A., Keyhani, N.O., 2013. Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus Insect Cuticle. *Insects* 4, 357–374. <http://dx.doi.org/10.3390/insects4030357>.
- Parker, B.L., Skinner, M., Gouli, S.Y., Gouli, V.V., Tobi, D., Kim, J.S., 2015. Persistence of *Beauveria bassiana sensu lato* and *Metarhizium anisopliae sensu lato* in Vermont (USA) forest soil. *Biocontrol Sci. Tech.* 25, 768–788. <http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2015.1016895>.
- Poidatz, J., Bressac, C., Bonnard, O., Thiéry, D., 2017. Delayed sexual maturation in males of *Vespa velutina*. *Insect Sci.* <http://dx.doi.org/10.1111/1744-7917.12452>.
- Potrich, M., Alves, L.F.A., Haas, J., da Silva, E.R.L., Daros, A., Pietrowski, V., Neves, P.M.O.J., 2009. Selectivity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Neotropical Entomology* 38, 822–826. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X200900600016>.
- Quesada-Moraga, E., Navas-Cortés, J.A., Maranhão, E.A., Ortiz-Urquiza, A., Santiago-Álvarez, C., 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soil. *Mycol. Res.* 111, 947–966.
- Rangel, D.E.N., Braga, G.U.L., Fernandes, E.K.K., Keyser, C.A., Hallsworth, J.E., Roberts, D.W., 2015. Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during colonial formation. *Curr. Genet.* <http://dx.doi.org/10.1007/s00294-015-0477-y>.
- Rehner, S.A., 2005. Phylogenetics of the genus *Beauveria*. In: Fernando, E. (Ed.), *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution*. Oxford University Press, Vega & Meredith Blackwell, pp. 3–27.
- Richter, M.R., 2000. Social wasp (Hymenoptera: Vespidae) foraging behavior. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 121–150.
- Rolf, J., 2001. Effects of age and gender on immune function of dragonflies (Odonata, Libellulidae) from a wild population. *Can. J. Zool.* 79, 2176–2180. <http://dx.doi.org/10.1139/cjz-79-12-2176>.
- Rome, Q., Muller, F.J., Touret-Alby, A., Darrouzet, E., Perrard, A., Villemant, C., 2015. Caste differentiation and seasonal changes in *Vespa velutina* (Hym.: Vespidae) colonies in its introduced range. *J. Appl. Entomol.* 139, 771–782. <http://dx.doi.org/10.1111/jen.12210>.
- Rose, E.A.F., Harris, R.J., Glare, T.R., 1999. Possible pathogens of social wasps (Hymenoptera: Vespidae) and their potential as biological control agents. *NZ J. Zool.* 26, 179–190.
- Rossoni, C., Kassab, S.O., Loureiro, E.D.S., Pereira, F.F., Costa, D.P., Barbosa, R.H., Zanuncio, J.C., 2014. *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) are Compatible with *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Florida Entomol.* 97, 1794–1804. <http://dx.doi.org/10.1653/024.097.0455>.
- Spradbery, J.P., 1973. Chap 6: Feeding and Foraging. In: Sidgwick & Jackson (Eds.), *Wasps. An account of the biology and natural history of solitary and social wasps*, London. pp. 128–157.
- Thiéry, D., Moreau, J., 2005. Relative performance of European grapevine moth (*Lobesia botrana*) on grapes and other hosts. *Oecologia* 143, 548–557.
- Thompson, S.R., Brandenburg, R.L., Arends, J.J., 2006. Impact of moisture and UV degradation on *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin conidial viability in turfgrass. *Biol. Control* 39, 401–407.
- Torchin, M.E., Lafferty, K.D., Kuris, A.M., 2002. Parasites and marine invasions. *Parasitology* 124. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182002001506>.
- Torchin, M.E., Lafferty, K.D., Dobson, A.P., McKenzie, V.J., Kuris, A.M., 2003. Introduced species and their missing parasites. *Nature* 421, 628–630.
- Tragust, S., Ugelvig, L.V., Chapuisat, M., Heinze, J., Cremer, S., 2013. Pupal cocoons affect sanitary brood care and limit fungal infections in ant colonies. *BMC Evol. Biol.* 13, 1.
- Tuininga, A., Miller, J., Morath, S., Daniels, T., Falco, R., Machese, M., Sahabi, S., Rosa, D., Stafford, K., 2009. Isolation of entomopathogenic fungi from soils and *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) ticks: prevalence and methods. *J. Med. Entomol.* 46, 557–565.
- Ugelvig, L.V., Cremer, S., 2007. Social prophylaxis: group interaction promotes collective immunity in ant colonies. *Curr. Biol.* 17, 1967–1971. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.029>.
- Villemant, C., Zuccon, D., Rome, Q., Muller, F., Poinar Jr., G.O., Justine, J.L., 2015. Can parasites halt the invader? Mermithid nematodes parasitizing the yellow-legged Asian hornet in France. *PeerJ* 3, e947. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.947>.
- Stow, A., Beattie, A., 2008. Chemical and genetic defenses against disease in insect societies. *Brain Behav. Immun.* 22, 1009–1013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2008.03.008>.



A *Beauveria bassiana* strain naturally parasitizing the bee predator *Vespa velutina* in France

Juliette Poidatz¹, Rodrigo Javier Lopez Plantey² and Denis Thiéry^{1,*}

¹ UMR 1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, INRA, Villenave d'Ormon, France

² Laboratorio de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina

* Corresponding author: Denis Thiéry, denis.thiery@inra.fr

With 4 figures and 1 table

Abstract: *Vespa velutina* is a hornet predator of bees that was accidentally introduced in Europe from China in 2004. Since its arrival, it expanded through Europe, impacting both biodiversity and beekeeping. As there are currently no biological alternatives to chemical treatment of *V. velutina* nests, we need more studies on the development of potential biological control methods. We present here a further description of an indigenous strain of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* that was discovered naturally parasitizing a foundresses of *V. velutina* in France. The genus was identified by its macro and micro morphological characteristics and the specie by molecular techniques. Its growing preferences were described according temperature conditions, and the potential in using such entomopathogens as a biological control agent against *V. velutina* was also discussed here, first at least to replace currently occurring direct chemical treatments, and then potentially to be integrated in future Trojan horse strategies.

Keywords: Asian hornet, Hymenoptera, *Beauveria bassiana*, biological control, entomopathology, fungus physiology

1 Introduction

Insects can be parasitized by many different fungi but most frequently by species classified in the hypocrealean genera *Beauveria* (Cordycipitaceae) and *Metarhizium* (Clavicipitaceae). These entomopathogenic fungi are characterized by a common infection mode, e.g. spore attachment to the insect cuticle (adherence and penetration (Shahid et al. 2012)), penetration of the mycelium in the insect, fungus development, and after the host death, sporulation outside the host's body (Meyling & Eilenberg 2007). The pathogenicity of a fungus strain depends on several different parameters, including (1) growth speed, (2) lethality, e.g. the probability to kill the host, and (3) ultimate climatic conditions (e.g. temperature, humidity); some strains being more or less specified to some insect orders. All these parameters are keys to describe pathogenic fungi.

Vespidae are generalist predators, which alimentary bolus can vary depending on their prey abundance, given season cycle (Spradbery 1973, Harris 1991). Therefore, they are capable to adapt to most environments (Richter 2000). Besides, vespids are social insects, they have an annual development cycle, and are very prolific: all this parameters make them very good candidates for biological invasions

(Moller 1996, Beggs 2001). Moreover, when arriving in a new area, invasive species often miss their parasites, making their population development rate even more high (Torchin et al. 2003).

The yellow legged hornet *Vespa velutina* is an invasive predator of bees accidentally introduced to France from East China in 2004 (see Monceau et al. 2014 for a review). Since its introduction, *V. velutina*'s range has rapidly expanded to include Portugal, Spain, Italy, England and Germany (Keeling et al. 2017, Monceau & Thiéry 2017). This hornet is characterized by its strong predation on pollinators, especially honeybee, which it hunts in large amount (Monceau et al. 2013a, b). Although *V. velutina*'s predatory attacks may destroy honeybee colonies outright (Tan et al. 2007), its attacks more often stress honeybee colony by reducing honeybee colony defences and their ability to acquire resources sufficient for hibernation survival (Matsuura 1988, Monceau et al. 2014). *V. velutina* has large colonies that may grow to include thousands of workers before their collapse at the end of fall and the new queens entering hibernation, but their colonies are difficult to locate as they are often hidden in tree canopies, shrubs or buildings (Monceau et al. 2014). Mass trapping, hives protection (using nets, entrance grids etc.), foundresses trapping and nest destruction using chemical

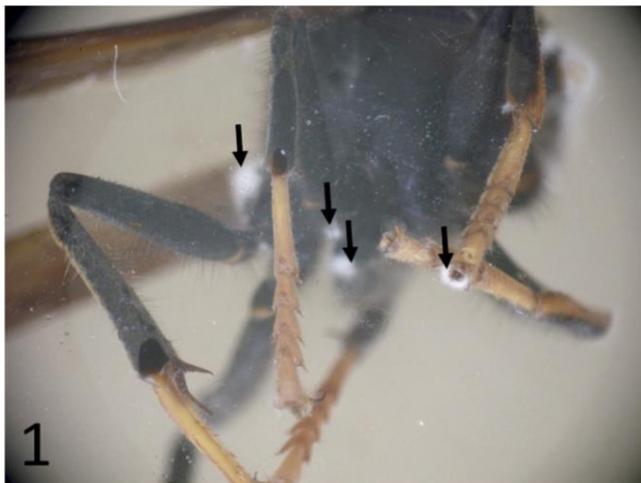


Fig. 1. White mycelium of *Beauveria bassiana* emerging from the hornet's cuticles intersections in the thorax of the *Vespa velutina* queen (black arrows) (Picture J. Poidatz).

pesticides are the current control methods used to limit *V. velutina* impact on beehives, but these are costly and insufficient for effective control (Monceau et al. 2012; D. Decante pers. com. 2015). Moreover, methods of chemical control classically used for nest destruction (insecticides powders, sulphur dioxide) are dangerous for both the environment and the applicator. More ecologic and safer control methods are needed. Biological control of invasive species with native organisms, which are well therefore adapted to the invaded area (Vega et al. 2009), could be a good solution here.

A few natural occurring organisms that attack *V. velutina* have already been described in France, including other insects such as the endoparasitic fly *Conops vesicularis* (Conopidae) (Darrouzet et al. 2015), the nematode *Pheromermis vesparum* (Villemant et al. 2015), or viruses such as the IAPV (Manley et al. 2015) and the DWV (A. Dalmon et al. unpublished). No application in biological control could however be yet envisaged with such species on *V. velutina*, because of low efficiency, and potential but not yet evaluated risks on non-target species and dispersion capacities or non-adapted development cycle (Beggs et al. 2011, Monceau et al. 2014, Villemant et al. 2015). Entomopathogenic fungus could be very interesting to study and promising in this context (Poidatz et al. 2018a), being more adapted to biological control programs than macro-organisms (Butt et al. 2001).

A first study on the inoculation methods of entomopathogenic fungi to *V. velutina* was recently published, and one of the French native strains used in this study (Poidatz et al. 2018a), the *Beauveria bassiana* isolated from a queen of *V. velutina* caught in Bretagne that was found naturally para-

sitized, is described here. After a morphological and genetic description, its growth in function of temperature was also studied.

2 Materials and methods

2.1 Fungus isolation

A foundress of *V. velutina* naturally parasitized by a fungus was captured alive in a trap baited with sirop and beer at the end of May 2016 in Brest (Britann, North-West France), and sent to the INRA laboratory (Bordeaux, France). After its death, the insect was externally disinfected by using paper towel imbibed with Calcium hypochlorite (50g/L). The insect was then cut in pieces, and the different parts were distributed amongst 3 Petri dishes on OAC medium ((Oat 40g, Agar (PDA, BK095HA, Biokar) 20g, Chloramphenicol (SIGMA Aldrich, Germany) 50mg, QSP 1L)), so the fungus could grow. White mycelium began to emerge from the hornet cuticle's intersections (Fig. 1).

The fungus was purified by multi-passaging on OAC media for two months. The fungus was then put in culture on top of cellophane paper on OAC medium Petri dishes, so the mycelium could be easily extracted by gently scraping the surface of the cellophane for DNA extraction.

2.2 Macroscopic and Microscopic characterization

Macroscopic observation was performed at naked eye on SDAY medium and discriminating the colony colour, shape

and type of edge. Colonies growth for 7 days at 21 °C and obscurity.

For microscopic characterization, a fungus preparation coloured by methylene blue was obtained on a microscopic lamella, then we observed the fungus structure ($\times 40$) to make a further diagnostic of the genus. Conidia's size was assessed by measuring 100 conidia's diameter using a Nikon SMZ 1000 microscope for the observation and the software Image J v1.50i for the analysis (Fig. 2A).

2.3 Molecular identification

After the lyophilisation of the mycelium samples (12h), their DNA was extracted using the technique described by Zolan and Pukkila (1986) without Proteinase K. We used two different concentrations of DNA for the PCR: 20 and 50 $\mu\text{L}/\mu\text{l}$. Concentration of DNA was measured by a DeNovix[®] DS-11 spectrophotometer[®].

DNA amplification was performed by primers for a partial sequence of the nuclear protein-encoding gene, the translation elongation factor 1-alpha, named TEF-exon: 983F and 2218R (Rehner et al. 2011). Touchdown PCR conditions were fixed by the instructions of Rehner (2005); we used Taq DNA Polymerase (Silverstar[®]). The PCR products were validated by an electrophoresis migration (Agarose 2%).

Forward and reverse DNA sequencing were made by the company Genewiz (Takeley, Essex CM22 6TA United Kingdom). The phylogenetic analysis was carried by using the sequence from this study and additional sequences from NCBI GenBank[®] with a similarity degree over 99% and different species of the genus. We then built a phylogram by two methods, Maximum Likelihood (Tamura-Nei Model) and Maximum Parsimony (Subtree-Pruning-Regrafting Model) with Mega7[®]. All branch support was estimated by bootstrapping with 2000 replications and cut-off of at list 50% of probability.

2.4 Mycelium growth at different temperatures

We collected fungus plugs from similar age areas of the mycelium, and placed them in the centre of new Petri dishes on a MAC culture medium (Malt + Agar (PDA, BK095HA, Biokar) (2%) + Chloramphenicol (SIGMA Aldrich, Germany). Six growth temperatures were evaluated: 12 °C, 16 °C, 20 °C, 22.6 °C, 28 °C in different climate chambers (LMS cooled incubators LMS 610XAP) and room temperature (21–25 °C). For sixteen days, all Petri dishes were placed at conditioned temperature and obscurity (dark boxes). For each temperature, ten replicates were done. The growth of the fungus was measured once each day by taking pictures of the Petri dishes. We thus assessed the mycelium area through image analysis using ImageJ v1.5 software. We then calculated the AUDPC (Area Under Disease Progress Curve) for each temperature and each replicate as described in Campbel & Madden (1990) using the R package "agricolae". After verifying for data normality by doing a Shapiro

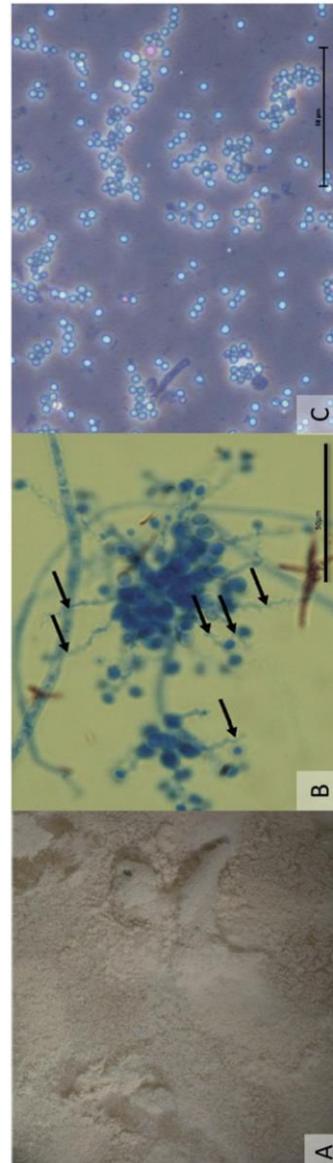


Fig. 2. A. *Beauveria bassiana* mycelium growing on agar ($\times 1.5$). (Picture J. Poidatz). B. Microscopic observation of the *B. bassiana* structures coloured with Methylene blue. The black arrows indicate the position of the conidiophores as symptomulospores ($\times 1500$) (Picture R. Lopez Plantey). C. Microscopic observation of our *B. bassiana* conidia coloured with Methylene blue, grown on PDA media, used for conidia size measurement ($\times 1000$).

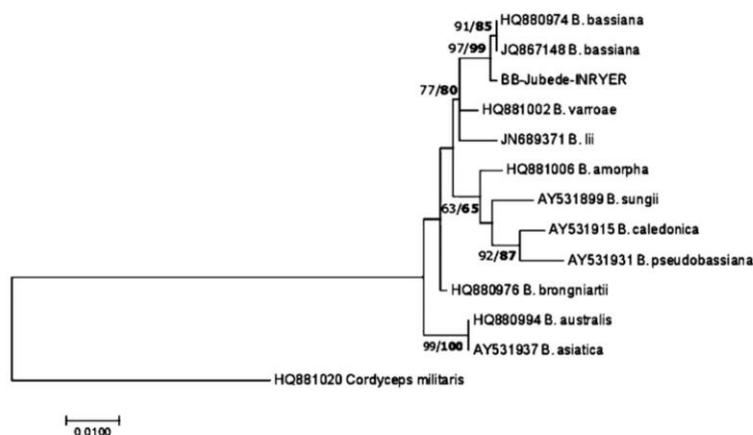


Fig. 3. Phylogeny of *Beauveria* spp. and isolated BB from joint Maximum Likelihood analysis of Translation Elongation Factor 1- α . Values above internal branches correspond to Maximum Likelihood and Maximum Parsimony (indicated in bold) (≥ 50).

test, we made an ANOVA and then a Tuckey HSD test for comparing each growing modality.

3 Results

3.1 Morphological description and genetic characterization

The colony shape is regular round, colony aspect is white cottony compact; colony edges are well-defined; and conidia are colourless. Macroscopic observations show round white colonies with defined edges and cottony aspect. Under microscope, these colonies presented uncoloured conidiophore and conidia disposed in zig-zag (symptomulospores) (Fig. 2b). Thanks to microscopic observations, conidia's diameter was assessed to be 2.91 ± 0.29 micrometers.

A BLAST® analysis of the TEF-exon fragments shows a match with the specimen *B. bassiana* over a 99%, confirming previous observations. Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood and Maximum Parsimony methods (Fig. 3) shows the strain BB-Jubede-INRYER close to the genotype of other evaluated strains of *B. bassiana* and on a different genotype than other *Beauveria* species listed below (Table 1).

3.2 Fungal growth in function of temperature

For the temperature 12 °C, one Petri dish was found contaminated by mites and was not kept in the analysis.

The *B. bassiana* strain growth was faster between 20 and 28 °C (Fig. 4), and significantly slower between 12 and

16 °C. The growing at 28 °C and at room temperature were very variable. The optimal growth temperatures seemed to be positioned between 20 °C and 22.6 °C.

4 Discussion

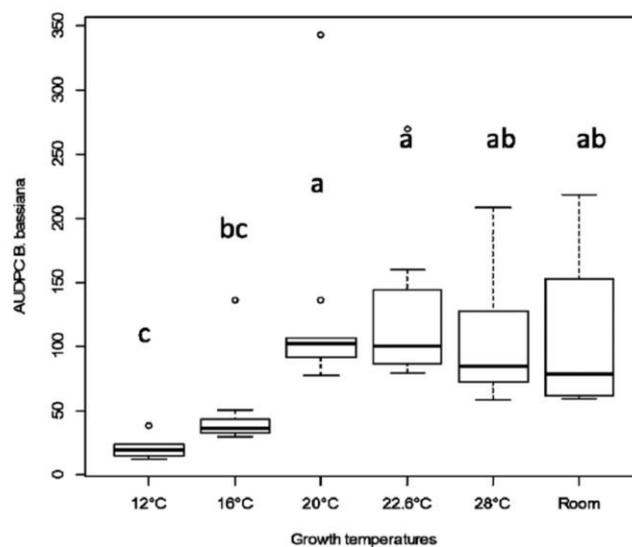
This is the first time that a native pathogen naturally parasitizing the invasive yellow legged hornet *V. velutina* is described. The infected foundress found in Britain probably contaminated itself during its hibernal diapause in ground or wood, or maybe during wood pulp collection for its nest construction, such pathogen's spores being present naturally in soil and wood for conservation (Meyling & Eilenberg 2007). The strain described here seems to be more adapted to intermediate temperature than fresh ones, what seems logical given that it was found in an oceanic temperate climate. The application of this strain for treatments using various methods (see Poidatz et al. 2018a), shall better take place when the temperatures are higher than 20 °C for a better fungal installation and dispersion.

Given this results, it could be interesting to associate several fungus strains with diverse optimal development temperature, in order to provide a more adapted biological control solutions for different ecological contexts.

Entomopathogenic fungus could be used to control *V. velutina* by several ways, once the suitable mode of application has been screened out by several assays. First, we have observed a good capacity of the spores of this fungus in liquid suspension to infect adults of *V. velutina*, such suspen-

Table 1. List of the fungal species used in this study for the genetic tree building.

GENBANK	SPECIES	ARSEF
HQ881006	<i>B. amorpha</i>	2641
AY531937	<i>B. asiatica</i>	4850
HQ880994 *HQ880995	<i>B. australis</i>	4598
HQ880974 * JQ867149	<i>B. bassiana</i>	1564
HQ880976 *HQ880991	<i>B. brongniartii</i>	617
AY531915	<i>B. caledonica</i>	2567
KC339709	<i>B. hoplocheli</i>	Bt 96
HQ881005	<i>B. kipuka</i>	7032
JN689371	<i>B. lii</i>	5500
HQ881015	<i>B. malawiensis</i>	4755
KU994833	<i>B. medogensis</i>	2898
AY531931	<i>B. pseudobassiana</i>	3405
AY531899	<i>B. sungii</i>	1685
HQ881002	<i>B. varroae</i>	8257
AY531920	<i>B. vermiconia</i>	2922
HQ881020	<i>Cordyceps militaris</i>	NC

**Fig. 4.** Evolution of the AUDPC (Area Under Disease Progress Curve, Campbell & Madden (1990)) of the *B. bassiana* strain given the temperature.

sions could thus be sprayed on/inside the nests. As shown in Poidatz et al. (2018a) infection of workers through a short passage in an aqueous spore suspension could be an issue in using it as a “Trojan horse” method, meaning the parasite is hidden in an attractive and selective bait and bring back to

the colony by the workers that have feed on the bait. This however must be assayed in field conditions to evaluate the suitable doses to be used. To do so, one needs to evaluate the potential impact of this strain on hornet larvae and their development (Rose et al. 1999).

In order to develop a control method based on such entomopathogenic fungal strains, the foraging behaviour of early infected workers should be carefully investigated to evaluate the potential dissemination of the spores to the preys (e.g. honeybees, bumble bees) and in the environment (Baverstock et al. 2010). Analysis of activity rhythm and foraging tracks durations by different tracking techniques or cartographic techniques as recently developed for *V. velutina* could be very instructive for this purpose (Kennedy et al. 2018, Poidatz et al. 2018b). An improvement of the potential of this strain as a control method for *V. velutina* could be done through its formulation, by making the spore more persistent, virulent or less sensitive to UV radiations (Burges 1998, Fernandes et al. 2015, Inglis et al. 1995).

Of course, several consistent tests for risks assessment must be done: indeed, given the chose inoculation method (spray, bait), the environmental risks for other insect species have to be evaluated. The choice of treatment localization, application method and application timing are clue. Unlike chemical insecticides that could accumulate in soil, water and other organisms by trophic network, infected insects could be eaten by mammals and birds without risks, this kind of pathogens being specific arthropod parasites, and are easily degraded by the local micro fauna.

Acknowledgements: This work was done during the PhD thesis of the first and the second author. We thank Leslie Daraigne for making the PCR. We thank Olivier Bonnard for helping us capture the hornets used in the experiment. We thank Jessica Wallace (UMR 1065 SAVE, BSA) for her advices on PCR analysis. We thank Bayer Crop Science, represented by Bénédicte Laborie, for the first author financial support. The *Beauveria bassiana* strain was deposited at the CNCM (Pasteur Institute), under the reference BB-Jubede-INRYER, with the registration code CNCMI-5254.

Conflicting interest

The authors declare no conflicting interest in this research

References

- Baverstock, J., Roy, H. E., & Pell, J. K. (2010). Entomopathogenic fungi and insect behaviour from unsuspecting hosts to targeted vectors. *BioControl*, 55(1), 89–102. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9238-5>
- Beggs, J. R. (2001). The ecological consequences of social wasps (*Vespula spp.*) invading an ecosystem that has an abundant carbohydrate resource. *Biological Conservation*, 99(1), 17–28. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(00\)00185-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(00)00185-3)
- Beggs, J. R., Brockerhoff, E. G., Corley, J. C., Kenis, M., Masciocchi, M., Muller, F., Rome, Q., & Villemant, C. (2011). Ecological effects and management of invasive alien Vespidae. *BioControl*, 56, 505–526. doi:10.1007/s10526-011-9389-z
- Burges, H. D. (1998). *Formulation of Microbial Biopesticides. Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments*. Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-4926-6>
- Butt, T. M., Jackson, C., & Magan, N. (2001). *Fungi as biocontrol agents. Progress, Problems and potential*. Oxon, UK, New York: CABI Pub. <https://doi.org/10.1079/9780851993560.0000>
- Campbell, C. L., & Madden, L. V. (1990). *Introduction to plant disease epidemiology, CABI pubs*. Eds John Wiley & Sons.
- Darrouzet, E., Gévar, J., & Dupont, S. (2015). A scientific note about a parasitoid that can parasitize the yellow-legged hornet, *Vespa velutina nigrithorax*, in Europe. *Apidologie*, 46(1), 130–132. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0297-y>
- Fernandes, E. K. K., Rangel, D. E. N., Braga, G. U. L., & Roberts, D. W. (2015). Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: A review on screening of strains and their formulation. *Current Genetics*, 61(3), 427–440. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0492-z> PMID:25986971
- Harris, R. J. (1991). Diet of the wasps *Vespula vulgaris* and *V. germanica* in honeydew beech forest of the South Island, New Zealand. *New Zealand journal of zoology* 18(2), 159–169. <https://doi.org/10.1080/03014223.1991.10757963>
- Harris, R. J., Harcourt, S. J., Glare, T. R., Rose, E. A. F., & Nelson, T. J. (2000). Susceptibility of *Vespula vulgaris* (Hymenoptera: Vespidae) to generalist entomopathogenic fungi and their potential for wasp control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 75(4), 251–258. <https://doi.org/10.1006/jipa.2000.4928> PMID:10843831
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., & Johnson, D. L. (1995). Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Biological Control*, 5(4), 581–590. <https://doi.org/10.1006/bcon.1995.1069>
- Keeling, M. J., Franklin, D. N., Datta, S., Brown, M. A., & Budge, G. E. (2017). Predicting the spread of the Asian hornet (*Vespa velutina*) following its incursion into Great Britain. *Scientific Reports*, 7(1), 6240. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06212-0> PMID:28740240
- Kennedy, P. J., Ford, S. M., Poidatz, J., Thiéry, D., & Osborne, J. L. (2018). In search of the invader tracking Asian hornets (*Vespa velutina*) to their nests with radio telemetry. *Communications Biology*, 2018(July). <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0092-9> PMID:30271969
- Manley, R., Boots, M., & Wilfert, L. (2015). Emerging viral disease risk to pollinating insects: Ecological, evolutionary and anthropogenic factors. *Journal of Applied Ecology*, 52(2), 331–340. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12385> PMID:25954053
- Matsuura, M. (1988). Ecological study on vespine wasps (Hymenoptera: Vespidae) attacking honeybee colonies. 1. Seasonal changes in the frequency of visits to apiaries by vespine wasps and damage inflicted, especially in the absence of artificial protection. *Applied Entomology and Zoology*, 23(4), 428–440. <https://doi.org/10.1303/aez.23.428>
- Mburu, D. M., Maniania, N. K., & Hassanali, A. (2013). Comparison of volatile blends and nucleotide sequences of two *Beauveria bassiana* isolates of different virulence and repellency towards the termite *Macrotermes michelseni*. *Journal of Chemical Ecology*, 39(1), 101–108. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0207-6> PMID:23111683
- Meyling, N. V., & Eilenberg, J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems. Potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43(2), 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.07.007>

- Moller, H. (1996). Lessons for invasion theory from social insects. *Biological Conservation*, 78(1–2), 125–142. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(96\)00022-5](https://doi.org/10.1016/0006-3207(96)00022-5)
- Monceau, K., Bonnard, O., & Thiéry, D. (2012). Chasing the queens of the alien predator of honeybee. a water drop in the invasiveness ocean. *Open Journal of Ecology*, 2(4), 183–191. <https://doi.org/10.4236/oje.2012.24022>
- Monceau, K., Maher, N., Bonnard, O., & Thiéry, D. (2013a). Predation dynamics study of the recently introduced honeybee killer *Vespa velutina*. learning from the enemy. *Apidologie*, 44(2), 209–221. <https://doi.org/10.1007/s13592-012-0172-7>
- Monceau, K., Arca, M., Leprêtre, L., Mougel, F., Bonnard, O., Silvain, J.-F., ... Thiéry, D. (2013b). Native prey and invasive predator patterns of foraging activity. The case of the yellow-legged hornet predation at European honeybee hives. *PLoS One*, 8(6), e66492. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066492> PMID:23823754
- Monceau, K., Bonnard, O., & Thiéry, D. (2014). *Vespa velutina* – a new invasive predator of honeybees in Europe. *Journal of Pest Science*, 87(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s10340-013-0537-3>
- Monceau, K., & Thiéry, D. (2017). *Vespa velutina* nest distribution at a local scale: An 8-year survey of the invasive honeybee predator. *Insect science* 24(4), 663–674. doi: 10.1111/1744-7917.12331
- Poidatz, J., López Plantey, R., & Thiéry, D. (2018a). Indigenous strains of *Beauveria* and *Metharizium* as potential biological control agents against the invasive hornet *Vespa velutina*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 153, 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.021> PMID:29501664
- Poidatz, J., Monceau, K., Bonnard, O., & Thiéry, D. (2018b). Activity rhythm and action range of workers of the invasive hornet predator of honeybees *Vespa velutina*, measured by radio frequency identification tags. *Ecology and Evolution*, 8(15), 7588–7598. <https://doi.org/10.1002/ece3.4182> PMID:30151173
- Rehner, S. A. (2005). Phylogenetics of the insect pathogenic genus *Beauveria*. Insect-fungal associations. *Ecology and Evolution*, Oxford University Press, 22–46.
- 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. <https://doi.org/10.3852/10-302> PMID:21482632
- Richter, M. R. (2000). Social wasp (Hymenoptera: Vespidae) foraging behavior. *Annual Review of Entomology*, 45(1), 121–150. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.121> PMID:10761573
- Rose, E. A. F., Harris, R. J., & Glare, T. R. (1999). Possible pathogens of social wasps (Hymenoptera: Vespidae) and their potential as biological control agents. *New Zealand Journal of Zoology*, 26(3), 179–190. <https://doi.org/10.1080/03014223.1999.9518188>
- Shahid, A., Rao, Q., Bakhsh, A., & Husnain, T. (2012). Entomopathogenic fungi as biological controllers. New insights into their virulence and pathogenicity. *Archives of Biological Sciences*, 64(1), 21–42. <https://doi.org/10.2298/ABS1201021S>
- Spradbery, J. P. (1973). Wasps. An account of the biology and natural history of social and solitary wasps. University of Washington Press, 408 pp., Seattle.
- Tan, K., Radloff, S. E., Li, J. J., Hepburn, H. R., Yang, M. X., Zhang, L. J., & Neumann, P. (2007). Bee-hawking by the wasp, *Vespa velutina*, on the honeybees *Apis cerana* and *A. mellifera*. *Naturwissenschaften*, 94(6), 469–472. <https://doi.org/10.1007/s00114-006-0210-2> PMID:17235596
- Torchin, M. E., Lafferty, K. D., Dobson, A. P., McKenzie, V. J., & Kuris, A. M. (2003). Introduced species and their missing parasites. *Nature*, 421(6923), 628–630. <https://doi.org/10.1038/nature01346> PMID:12571595
- Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., ... Roy, H. E. (2009). Fungal entomopathogens. new insights on their ecology. *Fungal Ecology*, 2(4), 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2009.05.001>
- Villemant, C., Zuccon, D., Rome, Q., Muller, F., Poinar, G. O., Jr., & Justine, J. L. (2015). Can parasites halt the invader? Mermithid nematodes parasitizing the yellow-legged Asian hornet in France. *PeerJ*, 3, e947. <https://doi.org/10.7717/peerj.947> PMID:26038716
- Zolan, M. E., & Pukkila, P. J. (1986). Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Molecular and Cellular Biology*, 6(1), 195–200. <https://doi.org/10.1128/MCB.6.1.195> PMID:3785146

Manuscript received: 18 May 2018
 Revisions required: 14 February 2019
 Accepted: 20 February 2019

CONCLUSIONES FINALES

A lo largo de la Tesis se presentaron los diferentes capítulos de manera concatenada, a fin de poder, dentro de un aspecto holístico y cronológico, exponer la búsqueda, identificación y selección de cepas de hongos entomopatógenos (HE) nativos del oeste argentino para su potencial uso en un plan de Manejo Integrado de Plagas de la vid.

De los muestreos realizados en las principales zonas productoras de vid del oeste argentino, fue posible aislar en la mayoría de ellas, diversas cepas de HE. Estos aislados fueron todos caracterizados e identificados morfológica y molecularmente, incluyéndolos en las especies *Beauveria bassiana*, *Metarhizium robertsii* y *Paecilomyces lilacinus*. En la caracterización fue posible ver cómo estas especies eran capaces de desarrollarse en rangos térmicos propios de la región vitícola de dónde fueron aisladas, generalmente con cepas capaces de crecer a temperaturas superiores a los 24°C. Asimismo, se pudo determinar que estas especies podrían ser utilizadas en estas regiones perfectamente, en primer lugar, por su adaptación natural a la zona y segundo lugar debido a que, en los estudios de compatibilidad con los principales fungicidas utilizados en esta zona, revelaron que sólo provocan una acción fungistática. Esta información es muy útil a la hora de plantear el uso agente de control biológico con los fungicidas tradicionales de estas regiones. Más aún, el comportamiento de algunas cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium robertsii* que en contacto con fungicidas de base cúprica generaban sustancias que provocaban la precipitación del principio activo, lo cual abre la posibilidad de plantear a estos organismos como agentes de biorremediación. Esta última hipótesis debería ser probada con estudios específicos futuros.

Los ensayos de parasitismo de los HE nativos recolectados, sobre tres de las plagas de importancia agrícola de la viticultura del oeste, blancos de esta tesis,

mostraron la presencia de varios aislados de las tres especies encontradas que manifestaron muy buena acción patogénica. Asimismo, fue posible constatar que algunas de estas cepas, no mostraron acción patogénica sobre uno de los enemigos naturales más presente en nuestros viñedos como es *Harmonia axydiris*. Al mismo tiempo se observó también que sobre especies benéficas como son las abejas, algunos aislados de las especies de HE no mostraron acción patogénica sobre ellas. Estos resultados nos permiten suponer que existen aislados de las tres especies, capaces de ser utilizados en planteos de Manejo Integrado de Plagas, previamente realizando los estudios in planta necesarios, que permitan reevaluar el comportamiento de estas cepas in natura.