Universidad de la República

Selección y caracterización de hongos entomopatógenos para controlar a *Thaumastocoris peregrinus* en *Eucalyptus* spp.

Lic. Belén Corallo

Maestría en Biotecnología

Facultad de Ciencias

Tutor: Dra. Sandra Lupo

Responsable Académico: Dra. Lina Bettucci

Montevideo, 2016

Índice i

Resumen iii

Agradecimientos iv

I. Introducción 1

I.1. *Eucalyptus* spp. 1

I.2. *Thaumastocoris peregrinus* 2

I.3. Control biológico: hongos entomopatógenos 3

I.4. Ciclo de vida de los hongos entomopatógenos 7

I.5. Enzimas como factores de virulencia 8

I.6. Factores ambientales 9

I.7. Manejo de *Thaumastocoris peregrinus*: antecedentes 10

II. Hipótesis 12

III. Objetivos 12

IV. Metodología 13

IV. 1. Colecta de insectos 13

IV. 2. Aislamiento de hongos entomopatógenos 14

IV. 3. Identificación de los hongos 15

IV. 4. Evaluación de la patogenicidad y virulencia de los hongos entomopatógenos sobre T. peregrinus 17

IV. 5. Caracterización ecofisiológica de las cepas seleccionadas 19

IV. 5.1 *Efecto de la temperatura sobre la germinación de las esporas* 20

IV. 5.2 *Efecto de la actividad hídrica sobre la germinación de las esporas y la velocidad de crecimiento micelial* 20

IV. 5.3 *Evaluación de la producción enzimática de los hogos entomopatógenos* 21

IV. 6. Evaluación de la concentración y el tiempo letal 50 de la cepa seleccionada 23

IV. 7. Análisis de los datos 23

V. Resultados 25

V.1. Aislamiento e identificación morfológica de los hongos 25

V.2. Análisis filogenético 30

V.3. Patogenicidad y virulencia de los hongos entomopatógenos sobre *T. peregrinus* 36

V. 4. Caracterización ecofisiológica de las cepas seleccionadas 38

V. 4. 1. *Efecto de la temperatura sobre la germinación de las esporas* 38

V. 4. 2. *Efecto de la actividad hídrica sobre la germinación de las esporas* 40

V. 4. 3. *Efecto de la actividad hídrica sobre el crecimiento miceliar* 41

V. 4. 4. *Evaluación de la producción enzimática de los hogos entomopatógenos* 42

V.5. Evaluación de la concentración letal media (CL_{50}) y el tiempo letal medio (TL_{50}) de la cepa seleccionada 43

VI. Discusión 46

VII. Conclusiones 53

VIII. Bibliografía 54

IX. Anexos 63

Resumen

Thaumastocoris peregrinus Carpintero & Dellappé (2006) es una plaga forestal que se alimenta por succión de hojas de *Eucalyptus* spp., provocando amarillamiento y en caso de ataques severos puede generar defoliación. Es un insecto nativo de Australia y recientemente fue introducido en Sudáfrica y Sudamérica. En Uruguay se constató su presencia en plantaciones de *Eucalyptus* spp. en el año 2008 en Tacuarembó y actualmente se encuentra en todo el país. Debido a su amplia distribución y a sus características biológicas, el control químico no parece ser una alternativa viable. Los hongos entomopatógenos se encuentran comúnmente en la naturaleza infectando distintos insectos por lo que pueden ser utilizados para el control biológico. El objetivo de este trabajo fue seleccionar y caracterizar hongos entomopatógenos capaces de controlar a *T. peregrinus.* Se efectuaron colectas de individuos de *T. peregrinus* en plantaciones de eucaliptos con síntomas de ataque por esta plaga. Los adultos muertos fueron colocados en cámaras húmedas individuales y se incubaron hasta la emergencia de los hongos. Los hongos entomopatógenos se aislaron e identificaron mediante las características morfológicas y métodos moleculares. Se evaluó la patogenicidad y virulencia frente a *T. peregrinus* de los hongos entomopatógenos aislados. Para esto se inocularon 50 individuos con una suspensión conteniendo $1x10^7$ esporas/mL de cada hongo. Los insectos se colocaron en floreros con ramas de *Eucalyptus tereticornis* en jaulas de voile. Los individuos muertos se colectaron diariamente y se colocaron en cámara húmeda, previa desinfección superficial, para corroborar la infección. Las cepas se clasificaron en 4 categorías según el tiempo alcanzado en matar al 90 % de la población y se seleccionaron las cepas pertenecientes al grupo 2 y 3. Se evaluó la viabilidad de las esporas a diferentes temperaturas y actividades hídricas, el crecimiento en medios con distinta actividad hídrica y la producción de exoenzimas de las cepas. Se determinó la concentración y el tiempo letal medio de las cepas seleccionadas utilizando el mismo protocolo que para evaluar la virulencia, pero adaptado a las concentraciones requeridas por este ensayo. Se obtuvieron 24 aislamientos de hongos entomopatógenos pertenecientes a los géneros *Beauveria*, *Lecanicillium, Isaria, Paecilomyces, Pochonia* y *Purpureocillium*. Las cepas más virulentas correspondieron a *B. bassiana* y produjeron más del 90% de mortalidad entre los 5 y 6 días. El aislamiento B3 de *B. bassiana* y el aislamiento P2 de *P. lilacinum* fueron los que presentaron el mayor porcentaje de germinación de esporas en las tres temperaturas evaluadas y en las diferentes actividades hídricas. La CL_{50} de la cepa B3 de *B. bassiana* fue de $2,4 \times 10^7$esporas/mL y el TL_{50} fue de 5,6 días. Esta cepa podrá ser utilizada, previa optimización de su producción y evaluación a campo, para producir una epizootia cuando la población de *T. peregrinus* constituya un problema fitosanitario, dado que los tratamientos con insecticidas no son recomendables por razones ambientales y económicas. Este es el primer estudio sistemático de hongos entomopatógenos para el control biológico de *Thaumastocoris peregrinus* en Uruguay.

Agradecimientos

A mi hijo Manuel por acompañarme y apoyarme siempre

A mi familia por estar siempre conmigo y darme contención

A mis amigas y amigos por confiar en mí y darme siempre para adelante

A mi tutora Sandra Lupo que me ayudó en todo momento y de quien aprendí mucho

A Lina Betucci por todos los aportes realizados

A mis compañeros y compañeras de laboratorio: Susana Tiscornia, Raquel Alonso, Dinorah Pan, Silvina Soria, Agustina del Palacio, Natalia Calero, Lucía Sessa, Ana Mionetto, Umberto Galvalisi, Carlos Segui y Sebastián Sánchez que todos y cada uno de ellos aportaron sus conocimientos y se sumaron en los debates que me iban surgiendo. A demás de acompañarme y apoyarme siempre

A Sofia Simeto, Paula González y al equipo técnico del Laboratorio de Entomología de INIA Tacuarembó por su dedicación y esfuerzo para la provisión de chinches y ayuda en la realización de los ensayos

Al tribunal Lyliam Loperena, Eduardo Abreo y Enrique Morelli, muchas gracias por las correcciones y sugerencias para mejorar el trabajo

I. INTRODUCCIÓN

I.1. *Eucalyptus* spp.

El género *Eucalyptus* comprende aproximadamente 800 especies e híbridos. Si bien es originario de Australia muestra una gran adaptación a distintos ambientes (Saavedra *et al.,* 2015). El euclipto posee además un rápido crecimiento, alta productividad, buena forma del tronco, predisposición para la clonación e hibridación y la capacidad de rebrotar lo que lo hace un cultivo muy atractivo para la comercialización (Locatelli *et al*., 2016). Las plantaciones de *Eucalyptus* spp. son de gran importancia a nivel mundial, habiendo más de 18 millones de hectáreas plantadas en 90 países de regiones tropicales y subtropicales (Pirralho *et al*., 2014). En Uruguay la industria de la madera ha crecido rápidamente en los últimos años, alcanzando 1 millón de hectáreas en 2012; siendo *Eucalyptus* el principal género plantado (aproximadamente 70%). Las especies de *Eucalyptus* mayormente plantadas en Uruguay son *E. globulus* Labill, *E. grandis* Hill ex Maiden y *E. dunnii* Maiden (Galetta *et al*., 2014). Los principales usos de la madera de eucalipto son para la industria de papel bajo el formato de madera rolliza sin tratar, chips y pasta de celulosa. Otros usos son en la industria maderera bajo el formato de madera rolliza tratada, madera aserrada y debobinado de madera para la elaboración de tableros, carpintería de obra, muebles y molduras; para la industria química para la elaboración de resinas, aceites esenciales y bioplásticos y para la industria energética como leña, desechos forestales o madera de plantaciones adensadas para la generación de electricidad. En el año 2013 las exportaciones por parte del sector forestal representaron el 10% del total de las exportaciones del país **(**http://www.uruguayxxi.gub.uy/inversiones/wp-content/uploads/sites/3/2014/09/Sector-Forestal-Uruguay-XXI-2014.pdf).

El importante incremento del área forestada durante las últimas décadas ha favorecido la aparición de nuevos patógenos y plagas, tanto de organismos nativos que adquirieron la capacidad de infectar árboles de eucaliptos como de organismos introducidos junto a los eucaliptus en forma accidental (Wingfield *et al.,* 2013). Este es el caso de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Dellappé (2006), un insecto fitófago, que se ha convertido en una de las

plagas emergentes más importantes para las plantaciones de eucaliptos en el hemisferio sur (Martínez & Bianchi, 2010; Wilcken *et al*., 2010; Ide *et al*., 2011).

I.2. *Thaumastocoris peregrinus*

Thaumastocoris peregrinus es un Hemíptero perteneciente a la familia Thaumastocoridae, subfamilia Thaumastocorinae. Este insecto se alimenta succionando el floema de hojas de *Eucalyptus* spp. Es nativo de Australia y fue recientemente introducido en Sudáfrica, Sudamérica, el sur de Europa y Nueva Zelanda. En Australia se encuentran presentes además las especies *T. australicus* Kirkaldy, *T. hackeri* Drake y Slater, *T. petilus* Drake y Slater, y *T. macqueeni* Rose, sin embargo *T. peregrinus* es la única especie que ha colonizado otros territorios (Savaris *et al.*, 2011). El primer registro de *T. peregrinus* fuera de Australia ocurrió en Sudáfrica en el año 2003 (Jacobs & Neser, 2005) y en el año 2005 se encontró en Sudamérica en Buenos Aires, Argentina (Noack & Coviella, 2006). Sin embargo, en ambos casos estaba identificado con el nombre *T. australicus* y fue hasta el año 2006 que se modificó el nombre a *T. peregriuns* con la descripción de una nueva especie por parte de Carpintero y Dellappé (2006). Posteriormente se detectó la presencia en Brasil (Wilcken *et al*., 2010), en Uruguay en el año 2008 (Martínez & Bianchi, 2010), en Chile en el año 2009 (Ide *et al*., 2011) y en Paraguay en el año 2010 (Benítez *et al.*, 2013). En Europa el primer registro fue en Italia en el año 2011 (Laudonia & Sasso, 2012). En Uruguay el primer registro fue en el departamento de Tacuarembó (Martínez & Bianchi, 2010) y actualmente se encuentra infectado casi todas las especies de eucaliptos plantadas comercialmente (Martínez *et al*., 2009). Nadel *et al*. (2010), encontraron que *T. pereginus* es capaz de atacar 30 especies de *Eucalyptus* y 3 híbridos comerciales comunes. En particular, en Sudamérica se encontró a este insecto en 7 especies de *Eucalyptus*. La expansión de *T. peregrinus* en las plantaciones de eucaliptos ha ocasionado importantes pérdidas económicas. El éxito de esta plaga puede deberse a la falta de enemigos naturales que controlen la población en los territorios que ha invadido, al amplio rango de hospederos que es capaz de infectar y a que posee un ciclo de vida corto con un alto potencial reproductivo. La presencia de este insecto en plantas de eucalipto, debido a su alimentación, provoca un amarillamiento de las hojas conocido como bronceado. La pérdida de área

fotosintética produce una reducción en el crecimiento de los árboles y si el ataque es severo puede generar defoliación, ramas que se quiebran e incluso la muerte del árbol (Wilcken *et al*., 2010). *Thaumastocoris peregrinus* tiene un comportamiento gregario, encontrándose ninfas y adultos en la misma hoja. El adulto es pequeño (2 a 4mm de largo) y tiene el cuerpo aplanado, de color castaño claro. Como característica distintiva posee un tubérculo a cada lado del pronoto. El macho tiene la genitalia asimétrica y la hembra tiene el corion más prolongado que el macho. Las hembras son capaces de poner dos huevos por día dentro de los 30 a 40 días de vida de las mismas. Los huevos son oscuros y se encuentran generalmente en grupos sobre hojas adultas o ramas. Durante su ciclo de vida pasa por 5 estadios ninfales hasta convertirse en adulto, demorando aproximadamente 20 días a 17-20°C, mientras que el ciclo completo dura entre 30 y 60 días. En Uruguay se ha constatado que ocurren varias generaciones por año (Martínez & Bianchi, 2010). Nadel *et al.* (2015) encontraron que las poblaciones de *T. peregrinus* se mantienen activas todo el año pero en bajos niveles poblacionales. González *et al.* (2012) observaron que el comportamiento gregario de los machos, puede explicarse en parte por la producción de una feromona masculina (atracción entre machos).

I.3. *Control biológico: hongos entomopatógenos*

Desde sus comienzos la agricultura ha coexistido con microorganismos patógenos e insectos. Tradicionalmente se han utilizado métodos de control químicos como insecticidas y fungicidas entre otros, con el fin de disminuir las pérdidas en la agricultura y la forestación (Verma *et al.*, 2007). La aplicación repetida de productos químicos puede provocar que los insectos generen resistencia o que al eliminar esa plaga resurjan otras o aparezcan nuevas. Por otro lado, la utilización de agentes de control biológico como tales o combinados con insecticidas tiene la ventaja de disminuir el uso de productos químicos y por lo tanto de reducir considerablemente el efecto negativo sobre el ambiente y la salud humana y animal.

La definición de control biológico según Van Driesche y Bellows (1996) expresa el uso de parasitoides, depredadores, patógenos, antagonistas y poblaciones competidoras para suprimir

una población de plagas, haciéndola menos abundante y por tanto menos dañina que en ausencia de los controladores.

Muchos microorganismos (virus, bacterias, protozoos y hongos) han sido eficientemente utilizados como agentes de control biológico frente a insectos. Los hongos entomopatógenos tienen la ventaja de tener especificidad de acción, no afectando a enemigos naturales de la plaga ni a otros insectos no perjudiciales, son seguros desde el punto de vista sanitario dado que no afectan al ambiente ni a los mamíferos, no se acumulan en la cadena trófica, poseen distintos mecanismos de infección lo que dificulta que el insecto genere resistencia, tienen genes específicos de producción de toxinas que pueden ser sobre expresadas por ingeniería genética para una mayor virulencia y poseen una alta persistencia en el ambiente por la capacidad de las esporas de infectar insectos sanos y ocasionar por lo tanto más de un ciclo de infección. Algunos hongos a su vez presentan la capacidad de establecerse como endófitos en algunas plantas lo que podría jugar un papel importante en la activación del sistema inmune. Por otro lado, también tienen la ventaja de ser fáciles de producir, pueden crecer sobre medios artificiales, se pueden aplicar utilizando equipamiento convencional y sobre todo se reduce la cantidad de residuos de pesticidas en los productos (Inglis *et al.*, 2001).

Las principales desventajas del uso de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico son su lenta velocidad de acción, que requieren condiciones de temperatura y humedad específicas, el costo relativo en comparación a biocidas químicos, pueden ocasionar alergias e infecciones en personas inmunodeprimidas. La especificidad de hospedero puede ser un inconveniente en la comercialización del producto dado que se necesitaría un producto para cada peste y que las esporas no pueden almacenarse por largos períodos de tiempo porque pierden viabilidad (Khan *et al*., 2012).

Se conocen más de 700 especies de hongos entomopatógenos pertenecientes a 90 géneros aproximadamente. Presentan distinto comportamiento nutricional pudiendo alimentarse del insecto como biótrofos, necrótrofos o hemibiótrofos (Vega *et al.*, 2009). La mayoría de los hongos entomopatógenos pertenecen a la división *Ascomycota* y *Entomophthoromycota*. Dentro de los *Ascomycota* (Sordariomycetes: Hypocreales) los más utilizados para el control

biológico son los pertenecientes a los géneros *Beauveria*, *Cordyceps*, *Isaria*, *Lecanicillium* y *Metarhizium* y dentro de los *Entomophthoromycota* (Entomophtorales) *Entomophaga*, *Entomophthora* y *Erynia* (Khan *et al.,* 2012). Los hongos entomopatógenos se encuentran comúnmente en la naturaleza infectando distintos insectos y los casos de epizootias no son raros. Si bien no se conoce mucho sobre cómo y en qué condiciones ocurren las epizootias se sabe que involucran una interacción compleja entre hospedero (susceptibilidad, densidad, movimiento y distribución espacial), patógeno (virulencia, dispersión, sobrevivencia, densidad de inóculo y distribución espacial), ambiente (temperatura, humedad, radiación solar) y la actividad humana (Charnley, 1997). Promover la ocurrencia de epizootias mediante la aplicación de inóculo puede ser una estrategia de control efectiva si se tienen en cuenta los aspectos antes mencionados (el momento y modo de aplicación, temperatura, entre otros). Algunos hongos entomopatógenos además de controlar insectos, pueden también controlar patógenos de plantas, establecerse como endófitos o asociarse a la rizosfera favoreciendo a la planta e incluso podrían ser promotores del crecimiento vegetal. *Beauveria bassiana* (Bals. – Criv.) Vuill y *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare y W. Gams han sido muy estudiados por ser enemigos naturales comunes y causantes de epizootias de áfidos y otros insectos y por tener actividad antagónica sobre patógenos de plantas. Dicho antagonismo involucra la producción de metabolitos secundarios y enzimas que participan en la antibiosis y competencia por recursos y espacio. También se ha encontrado que estos hongos pueden inducir la resistencia sistémica en plantas y que especies del género *Lecanicillium* pueden parasitar hongos fitopatógenos (Vega *et al.,* 2009). Las epizootias producidas por Entomophthorales ocurren con frecuencia en la naturaleza, pero dada la dificultad de trabajar con estos hongos en laboratorio debido al crecimiento restringido en medios de cultivo y a que la espora de dormancia es muy estable y no es infectiva, no han sido tan estudiados como los Hypocreales. En la Tabla 1 se muestran diferentes productos comerciales formulados con hongos entomopátogenos que están siendo utilizados eficientemente en diferentes países.

Tabla 1. Productos comerciales elaborados en base a hongos entomopatógenos

Especie fúngica	Nombre del producto	País	Especie objetivo	Cultivo
B. bassiana (Bals. –Criv.) Vuill	Mycotrol, Botanigard	EEUU	mosca blanca, áfidos y tisanópteros	tomates de invernadero y ornamentales
	Naturalis	EEUU	insectos chupadores	algodón y cultivos de invernadero
	Ostrinol	Francia	taladrador	maíz
	Proecol	Venezuela	áfidos	caña de azúcar
B. brogniartii (Sacc.) Petch	Engerlingspilz	Suiza	larva de escarabajos	pasturas
	Beauveria Schweizer	Suiza	larva de escarabajos	pasturas
L. lecanii (Zimm.) Zare & W. Gams	LECAFOL	Uruguay	mosca blanca	tomates
L. longisporum (Petch) Zare & W. Gams	Vertalec	Reino Unido /Europa	áfidos	cultivos de invernadero
L. muscarium (Petch) Zare & W. Gams	Mycotal	Reino Unido /Europa	mosca blanca y tisanóptero	cultivos de invernadero
M. anisopliae (Metschn.) Sorokin	BioBlast	EEUU	termitas	casas
	Green Muscle	Sur África	langostas	matorrales
M. flavoviride W. Gams & Rozsypal	BioGreen	Australia	abejorro	pasturas
P. fumosoroseus Wize	PFR-97	EEUU/ Europa	mosca blanca y tisanóptero	cultivos de invernadero

I.4. *Ciclo de vida de los hongos entomopatógenos*

El proceso de infección comienza cuando la espora entra en contacto con la cutícula del insecto que es capaz de infectar. La mayoría de los conidios (esporas de origen asexual) se adhieren por mecanismos no específicos mediados por la hidrofobicidad de la pared celular. La invasión generalmente ocurre en las partes más finas de la cutícula (no esclerosada) y donde se forman microambientes húmedos como en partes de la boca, en pliegues intersegmentales o en los espiráculos (Charnley, 1997). Luego que la espora germina y debido a un intercambio de señales entre hospedero y patógeno, frena el desarrollo horizontal del hongo por lo que cambia el patrón del crecimiento para comenzar la penetración. Para ello, se pueden formar distintas estructuras como apresorios, un aumento del extremo del tubo germinativo o una vaina extracelular. Aun así, si las condiciones no son favorables, por ejemplo si no se dan las condiciones de humedad adecuada, si hay factores inhibitorios en la cutícula del insecto que impidan el desarrollo del hongo (ej. ácidos grasos de cadena corta) o si el insecto muda y se pierde el inóculo, puede no ocurrir la infección. La penetración del hongo dentro del insecto implica una combinación de mecanismos mecánicos y enzimáticos (producción de proteasas, lipasas, esterasas, quitinasas y quitobiasas). Luego cuando llega a la hemolinfa ocurre la proliferación del micelio o de blastosporas y se producen toxinas para debilitar la eficacia de respuesta defensiva por parte del insecto (Inglis *et al.*, 2001). *B. bassiana* es capaz de producir péptidos cíclicos de bajo peso molecular y ciclosporinas A y C con efecto insecticida y beauvericina, eniatina, oosporeina así como péptidos cíclicos con actividad inmunosupresiva. También puede producir hirsutelina A que es un compuesto de alto peso molecular con actividad toxica (Khan *et al.,* 2012). El insecto puede responder a la presencia del hongo por medio de un mecanismo de defensa humoral en base a fenol oxidasas, lectinas u otras proteínas y péptidos y/o utilizando un mecanismo celular como fagocitosis y/o encapsulación. Algunos hongos poseen modificaciones en su superficie que impiden que sean reconocidos y eliminados por la respuesta defensiva del insecto. El insecto puede morir por una combinación de factores como falta de nutrientes, obstrucción física, invasión de órganos y toxicosis. Cuando el insecto muere, si las condiciones son favorables, el hongo crece y se alimenta saprotróficamente y esporula sobre su hospedero. En ese momento los hongos son capaces de

producir una diversidad de metabolitos que le permiten, seguramente, competir con otros organismos por el sustrato. La dispersión de los conidios es pasiva por medio del viento o la lluvia (Inglis *et al.*, 2001).

I.5. *Enzimas como factores de virulencia*

La cutícula de los insectos está formada por fibras de quitina embebidas en una matriz de proteínas, lípidos, pigmentos y N-acetilcatecolminas. Es una capa heterogénea y sus componentes estructurales varían durante los diferentes estadíos del ciclo de vida del insecto. La epicutícula, que es la capa más externa, está compuesta por proteínas y una gran cantidad de lípidos lo que la hace hidrofóbica. Por debajo de esta se encuentra la procutícula (exo, meso y endocutícula) que contiene quitina y proteínas esclerosadas y luego están las células epidérmicas (Ortiz & Keyhani, 2013).

Tanto los lípidos como las ceras juegan un rol importante en la comunicación química entre patógeno e insecto. Los lípidos y ceras contienen en general muchos hidrocarburos, que varían en cantidad y composición entre las distintas especies de insecto e incluso dentro de los estadíos de un mismo insecto. Estas variaciones afectan directamente la patogenicidad de los hongos sobre los insectos. *Beauveria bassiana* y *M. anisopliae* (Metschn.) Sorokin poseen hidrofobinas en la superficie de sus conidios que ayudan a mantenerla hidrofóbica y a adherirse sobre la epicutícula del insecto (Ortiz & Keyhani, 2013). Las lipoproteínas, ceras y grasas impiden el crecimiento de los hongos, dado que en algunos casos poseen componentes anti fúngicos. Sin embargo, muchos hongos son capaces de producir lipasas y lipoxigenasas, enzimas que le permiten crecer sobre dichos recursos y han desarrollado mecanismos para eliminar los compuestos tóxicos. Las fosfolipasas son un grupo heterogéneo de enzimas capaces de hidrolizar enlaces éster en los glicerofosfolípidos y por tanto son importantes en el proceso de penetración de la cutícula. Estas enzimas pueden desestabilizar las membranas celulares del insecto, ocasionar la lisis celular y también pueden generar mensajeros secundarios (Khan *et al.,* 2012). Los insectos, además de los lípidos también producen toxinas y proteínas con propiedades anti fúngicas. Por ejemplo la melanina es tóxica e inhibe la germinación y/o el crecimiento hifal, genera mayor resistencia a la penetración y a la acción de las enzimas

degradativas. Sin embargo, algunos hongos son resistentes a este compuesto y mediante la actividad de proteasas pueden solubilizar el enlace de la melanina a la cutícula (Ortiz & Keyhani, 2013). Dado que uno de los principales componentes de la cutícula son las proteínas es de esperarse que la producción de enzimas que las degraden sea importante en el proceso de infección. Es así que las proteasas y peptidasas actúan como factores de virulencia y también son importantes durante el crecimiento saprofítico. La quitina es otro componente estructural importante de la cutícula. Muchos hongos son capaces de producir endo y exoquitinasas que rompen el polímero N-acetilglucosamina en unidades más pequeñas o en monómeros. Las quitinasas son consideradas un factor de virulencia clave (Khan *et al.,* 2012).

I.6. *Factores ambientales*

La radiación solar, en particular la UVB (285-315nm), afecta la persistencia del propágulo del hongo en el ambiente. Existen diferencias en la susceptibilidad a la radiación tanto entre taxas como entre cepas. Algunas especies, como por ejemplo *M. anisopliae*, presentan conidios pigmentados que les confieren mayor resistencia a los rayos UV. En las formulaciones de los productos con hongos generalmente se agregan protectores solares y/o químicos que absorben el UVB o también melanina u otros polifenoles como por ejemplo la lignina, que protegen a las esporas de la radiación.

La temperatura es otro parámetro a tener en cuenta dado que afecta la germinación de los conidios y el crecimiento del hongo y, por la tanto afecta, la tasa de infección y el tiempo de muerte de los insectos. Una vez muerto el insecto, estos parámetros ambientales también pueden afectar el desarrollo del hongo sobre el cadáver. La mayoría de los hongos entomopatógenos son mesófilos y no pueden crecer a 37°C o temperaturas superiores. Este hecho es importante ya que al no poder crecer a la temperatura corporal de los mamíferos, hace que su uso en la agricultura sea de bajo riesgo para infecciones en humanos. De todas formas existe mucha variabilidad entre cepas por lo que es necesario conocer el rango de temperatura en el que el inóculo se mantiene viable.

La humedad relativa es importante en la persistencia del inóculo, en la germinación de los conidios y en la regulación de la conidiogénesis sobre los cadáveres. Algunos hongos poseen

menores requerimientos de humedad y pueden germinar e infectar a humedades relativamente bajas. La humedad combinada con la temperatura puede afectar la evaporación en la pulverización del producto y por lo tanto generar pérdida de inóculo. En la mayoría de los casos, durante el almacenamiento, los conidios perduran más en condiciones de frío y sequedad, por ello, muchas veces se adicionan aceites en las formulaciones para mejorar el rendimiento en condiciones de baja humedad (Inglis *et al*., 2001).

I.7. *Manejo de Thaumastocoris peregrinus: antecedentes*

No existe hasta el momento una estrategia comercial efectiva para controlar a *T. peregrinus*. El uso de productos químicos no es muy adecuado para el control de esta plaga debido a la amplia distribución del insecto, a sus características biológicas y al impacto que tienen estos productos sobre el ambiente y otras especies no blanco (Martínez & Bianchi, 2010). A su vez, los cultivos forestales tienen grandes exigencias para la certificación por el Consejo de Administración Forestal (FSC: Forest Stewardship Council) que impone grandes restricciones al momento de permitir el uso de determinados productos químicos. El control biológico, en el contexto de un programa de Manejo Integrado de Plagas (MIP), parece ser una alternativa viable para disminuir los daños causados por este insecto. En el escenario de un posible control biológico de *T. peregrinus,* dado que es un insecto succionador, sería más conveniente utilizar hongos entomopatógenos, que actúan por contacto, en lugar de bacterias o virus que tienen que ser ingeridos para que ocurra la infección (Ihara *et al.,* 2001). Por otro lado, se ha demostrado que aplicaciones subletales de insecticidas combinados con la aplicación de hongos entomopatógenos mejoran su eficiencia, dado que el insecto al estar estresado se torna más susceptible a la infección con lo cual se disminuye considerablemente la cantidad de insecticida a utilizar (Inglis *et al*., 2001). A su vez, el comportamiento gregario de *T. peregrinus* y la coexistencia de los diferentes estadios de vida, podrían facilitar el contagio de los hongos dentro de la población de la plaga.

Hasta el momento se han registrado distintos enemigos naturales de *T. peregrinus*: los parasitoides de huevos *Cleurochoides noackae* Lin & Huber (Hymenoptera: Mymaridae) y *Stethynium* sp. Enock (Hymenoptera: Mymaridae) y los predadores: *Supputius cincticeps* Stal

(Hemiptera: Pentatomidae), *Chyrsoperla externa* Hagen (Neuropteta: Chrysopidae), *Atrachelus cinereus* Fabricius (Hemiptera: Reduviidae) y *Podisus australis* Berg (Hemiptera: Pentatomidae) (Lin *et al.,* 2007; Wilken *et al.*, 2010; Mascarin *et al*., 2012; Sousa *et al*., 2012; Santadino *et al*., 2013); éste último presente en Uruguay. En cuanto a los hongos entomopatógenos no existen hasta el momento registros de infección en Australia (lugar de origen de *Thaumastocoris*). Mascarin *et al.* (2012) encontraron al hongo Entomophtoral *Zoophtora radicans* (Brefeld) Batko infectando naturalmente a *Thaumastocoris* en Brasil. Posteriormente, San Román (2012) y Moio (2015) aislaron e identificaron los hongos *Isaria cateniannulata* (Z.Q. Liang) Samson y Hywel- Jones*, Fusarium equiseti* (Corda) Sacc*., Fusarium tricinctum* (Corda) Sacc. y *Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg sobre cadáveres de *T. peregrinus* en Brasil. Además, evaluaron la patogenicidad y virulencia sobre este insecto, encontrando que todas las cepas eran patogénicas pero presentaban distintos grados de virulencia.

Dada la poca información que existe sobre hongos entomopatógenos que infecten a *T. peregrinus* y su potencial interés para el control biológico de este insecto, resulta de importancia estudiar la presencia de los mismos en Uruguay.

II. HIPÓTESIS

Existen en Uruguay, hongos entomopatógenos que actúan como enemigos naturales, infectando y controlando la población de *T. peregrinus* en condiciones naturales

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Seleccionar y caracterizar hongos entomopatógenos capaces de controlar a *T. peregrinus*

Objetivos específicos:

1. Aislar hongos entomopatógenos a partir de individuos de *T. peregrinus* colectados en plantaciones de *Eucalyptus* spp.

2. Determinar la frecuencia de infección de los hongos entomopatógenos presentes sobre *T. peregrinus*

3. Identificar las cepas de hongos entomopatógenos aisladas a partir de *T. peregrinus*

4. Caracterizar ecofisiológicamente las distintas cepas

5. Seleccionar las cepas de hongos entomopatógenos más virulentas frente a *T. peregrinus*

IV. METODOLOGÍA

IV. 1. Colecta de insectos

Se efectuaron colectas de individuos de *T. peregrinus* en ocho plantaciones de eucaliptos con síntomas de ataque por esta plaga: tres plantaciones correspondían a *Eucalyptus smithii* en el departamento de Florida, tres plantaciones a *E. globulus* en Rocha, una plantación a *E. globulus* y una plantación mixta a *E. globulus* y *E. smithii* en el departamento de Lavalleja. Las colectas se llevaron a cabo entre marzo y mayo del 2013. En cada sitio de muestreo se seleccionaron 10 árboles con síntoma. Se cortó una rama de cada árbol, con aproximadamente 70 hojas y se colocaron en bolsas para su transporte al laboratorio (Figura 1).

Figura 1. Árboles de *Eucalyptus* infectados con *T. peregrinus*. a: *E. smithii* con síntomas de infección, b: adultos y ninfas de *T. peregrinus* sobre hoja adulta de *E. smithii* y c: rama de *E. smithii* acondicionada para el transporte

Se colectaron 1283 individuos en los sitios muestreados, siendo menor el número encontrado en Rocha (sitio 103) debido a la influencia de las bajas temperaturas existentes durante el momento del muestreo y en los días previos (Tabla 2).

Tabla 2. Total de insectos colectados en los distintos sitios de muestreo

Sitio	**Total de insectos**
Reboledo: *E. smithii* (764)	159
Reboledo: *E. smithii* (765)	233
Reboledo: *E. smithii* (766)	202
Rocha, Redalco: *E. globulus* (767)	183
Rocha: *E. globulus* (768)	194
Solís de Mataojo: *E. globulus* (101)	111
Lavalleja: *E. globulus* y *E. smithii* (102)	140
Rocha: *E. globulus* (103)	61
Total	1283

IV. 2. Aislamiento de hongos entomopatógenos

En el laboratorio se observaron bajo microscopio estereoscópico todos los insectos discriminando los individuos muertos con infección por hongos, muertos sin desarrollo de hongos y vivos. Se analizaron todos los insectos muertos y hasta 5 adultos vivos por muestra correspondiente a una rama. Para ello, se colocó cada individuo vivo y muerto sin desarrollo fúngico en una cámara húmeda y se incubó a temperatura ambiente hasta la emergencia de los hongos (Figura 2). En el caso de los insectos que estaban vivos, éstos se mataron con frío previo a la colocación en cámara húmeda. Posteriormente se observaron las chinches bajo microscopio estereoscópico y se aislaron los hongos cuyas características morfológicas coincidieron con las de géneros de hongos entomopatógenos. Se transfirieron los mismos a placas de Petri con medio de cultivo Agar- Papa al 2% (PDA). Se obtuvieron cultivos puros de cada aislamiento. El micelio con esporas de los distintos aislamientos fueron guardados en

crioviales con agua destilada estéril a temperatura ambiente y en crioviales con glicerol (10%) a -80°C en la colección del Laboratorio de Micología de Facultad de Ciencias.

Se registró la presencia de géneros de hongos entomopatógenos y otros géneros de hongos sobre cada individuo de *T. peregrinus* evaluado.

La frecuencia de colonización de cada género se calculó como: (número de hongos pertenecientes a un género/total de insectos) x 100 y el porcentaje de infección se calculó como: (insectos infectados con hongos entomopatógenos/total de insectos) x 100.

Figura 2. Izquierda y centro: cámara húmeda con adultos de *T. peregrinus*, derecha: placa con *Cladosporium* sp. y *Beauveria* sp.

IV. 3. Identificación de los hongos

Todos los hongos presentes sobre *T. peregrinus* se identificaron a nivel de género por observación de sus características micromorfológicas bajo microscopio óptico.

En particular, los hongos entomopatógenos se identificaron morfológicamente a nivel de especie siguiendo las claves específicas para cada grupo de hongos.

Para esto, las características macro y micromorfológicas observadas fueron: color, forma y textura de la colonia, color del envés de la colonia, tipo de conidiogénesis y disposición de los conidios, color, tamaño y forma de los conidios y forma de la célula conidiógena.

La identidad de las cepas se confirmó mediante métodos moleculares. El ADN se extrajo a partir de cultivos puros en PDA según el método de Lee & Taylor (1990). Se amplificaron distintas

regiones del genoma mediante PCR (en inglés: *Polymerase chain reaction*). Las especies pertenecientes al género *Beauveria* se analizaron por comparación de la secuencia de ADN de la región espaciadora interna del genoma (ITS 1 e ITS 2) y del gen ribosomal 5.8S y, del factor de elongación 1-alfa (EF-1α) con la presente en la base de datos del GenBank. Las especies pertenecientes al género *Lecanicillium* se analizaron por comparación de la región espaciadora interna del genoma (ITS1 e ITS2) y del gen ribosomal 5.8S y, del ADN mitocondrial NADH deshidrogenasa y las del género *Paecilomyces* con la región ITS y la β-tubulina. Los cebadores utilizados para la amplificación de las diferentes regiones del genoma se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Cebadores utilizados en las PCRs

Región	**Cebador**	**Dirección**	**Secuencia (5'-3')**	**Referencia**
ADN ribosomal	ITS 4	Reverso	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White *et al.* (1990)
(ITS)	ITS 5	Directo	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	White *et al.* (1990)
Factor de	EF1-986R	Reverso	TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC	Carbone & Kohn (1999)
elongación (TEF)	EF1-728F	Directo	CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG	Carbone & Kohn (1999)
β - tubulina	βt-2b	Reverso	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	Glass & Donaldson (1995)
(Tub 2)	T1	Directo	AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT	O'Donnell & Cigelnik (1997)
NADH	nad1A	Reverso	ATG GCS* AGT ATG CAA AGA AGA	Kouvelis *et al.* (2004)
deshidrogenasa	Nad1B	Directo	GCA TGT TCT GTC ATA AAS* CCA CTA AC	Kouvelis *et al.* (2004)

Los parámetros de ciclado utilizados para la amplificación mediante PCR de la región ITS, β-tubulina o NADH deshidrogenasa fueron los siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos; 35 ciclos de desnaturalización (1 minuto a 94°C), hibridación (45 segundos a 50°C) y extensión (1 minuto a 72°C); seguidos de un ciclo de extensión final de 5 minutos a 72°C y 5 minutos a 4°C.

La amplificación del factor de elongación se realizó con un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos; 35 ciclos de desnaturalización (1 minuto a 95°C), hibridación (1 minuto a 55°C) y extensión (1,5 minutos a 72°C); seguidos de un ciclo de extensión final de 10 minutos a 72°C y 5 minutos a 4°C. La amplificación se realizó en un termociclador Corbett Research.

En todos los casos la mezcla de la reacción contenía 2,5µL de Buffer 10X, 2,5µL de dNTPs (2,5mM), 1,5µL de $MgCl_2$ (25mM), 0,5µL de cebador 1 (10µM), 0,5µL de cebador 2 (10µM), 0,25µL de Taq polimerasa, 15,25µL de agua MQ libre de RNAsa y 2µL de la muestra de ADN (50µL de volumen final). El control negativo se realizó utilizando la misma mezcla pero sin agregado de ADN y el control positivo se realizó utilizando una muestra que dio positiva en una reacción de PCR previa.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 1X teñidos con EZ Vision^R One (Amresco) y bajo luz UV en transiluminador. Como marcador de peso molecular se utilizó DNA mass ruler 100pb (Fermentas).

Los productos de PCR, fueron secuenciados en MACROGEN, Corea. Inicialmente las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante la herramienta BLASTn con secuencias registradas en la base de datos del GenBank.

Las secuencias se corrigieron y se alinearon mediante ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), incluyendo las secuencias de cepas tipo obtenidas de la base de datos GenBank utilizando el programa MEGA 6.06 (Tamura *et al.,* 2013). Para el análisis filogenético se utilizó el método de Máxima Parsimonia y la robustez de los árboles fue evaluada mediante 1.000 réplicas de boostrap. Todos los caracteres se consideraron de peso equivalente y los gaps fueron excluidos del análisis. En el caso del género *Lecanicillium* se realizó un análisis con las secuencias concatenadas de la región ITS y NADH deshidrogenasa y en el caso del género *Paecilomyces* se realizó un análisis con las secuencias concatenadas de la región ITS y la β-tubulina.

IV. 4. Evaluación de la patogenicidad y virulencia de los hongos entomopatógenos sobre *T. peregrinus*

Se entiende por patogenicidad la capacidad de infectar y producir la enfermedad y por virulencia el grado de dicha patogenicidad (Agrios, 1988). En este ensayo se utilizaron 19 aislamientos de hongos entomopatógenos: 6 *Beauveria* spp., 1 *Fusarium semitectum* Berk. & Ravenel, 3 *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fr., 4 *Lecanicillium* spp., 1 *Paecilomyces variotii* Bainier, 1 *Pochonia bulbillosa* (W. Gams & Malla) Zare & W. Gams, 2 *Purpureocillium lilacinum* (Thom)

Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson y 1 *Simplicillium lanosoniveum* (J.F.H. Beyma) Zare & W. Gams.

El inóculo se preparó a partir de un cultivo puro incubado durante 20 días en alternancia de luz-oscuridad. Se colectaron las esporas y se resuspendieron en agua con Tween20 (0,02%). La concentración de la suspensión de esporas se determinó mediante cámara de Neubauer. Posteriormente, se realizaron las diluciones necesarias para obtener una concentración final de 1×10^7 esporas viables/mL.

Para determinar la viabilidad de las esporas se tomó una alícuota del inóculo, se colocó en una placa con PDA y se incubó a 25°C durante 24hs. La viabilidad se calculó como: (esporas viables/total de esporas) x 100. Se consideró una espora viable a aquélla en la que el tubo germinativo alcanzó ¾ del tamaño de la espora. Los ensayos se realizaron por duplicado y se contaron 200 esporas por placa.

Se colocaron 50 individuos adultos (25 machos y 25 hembras) en ramos de hojas frescas de *Eucalyptus tereticornis*, criados en jaulas de tul, según Martínez & Scoz (2012). Los insectos fueron suministrados por la unidad de cría del Laboratorio de Entomología de INIA-Tacuarembó. Para cada aislamiento se preparó y aplicó mediante aspersión hasta punto de goteo, 30mL de una suspensión de 1×10^7 esporas viables/mL en agua-Tween20 al 0,02% (Figura 3). El control negativo se realizó aplicando agua-Tween20 al 0,02% y el control positivo aplicando una cepa de *Beauveria bassiana* de actividad conocida. Dado que el ensayo fue realizado a modo de screening primario, se utilizó una réplica para cada tratamiento y no se realizaron repeticiones.

Figura 3. Ramos de *E. tereticornis* con individuos adultos de *T. peregrinus*. Izquierda: aplicación mediante aspersión de las esporas, centro: jaulas de tul con ramos de *E. tereticornis* y derecha: ramo de *E. tereticornis* con individuos vivos sobre las hojas y muertos en el piso de la jaula

Los insectos se mantuvieron en las jaulas durante 10 días bajo condiciones de temperatura y humedad controladas (23°C ± 2°C y 80% de humedad relativa). Se realizaron inspecciones diarias, registrando el número de insectos muertos y retirándolos de la jaula. Posteriormente se realizó una desinfección superficial de cada uno de los individuos muertos, colocándolos en alcohol 70% durante 5 segundos, seguido de dos enjuagues con agua destilada estéril y secados en papel de filtro estéril. Los insectos fueron colocados en cámaras húmedas individuales para luego realizar el aislamiento del hongo inoculado y corroborar la muerte por infección.

Las cepas se clasificaron en cuatro grupos en base al número de días que demoraron en matar al 90% de la población de chinches dentro de cada unidad del ensayo (una jaula): Clase I, 4 días o menos; Clase 2, 5 a 7 días; Clase 3, 8 a 10 días y Clase 4, más de 10 días y no patogénicas (Ihara *et al*., 2001). Las cepas pertenecientes a las clases 2 y/o 3 fueron seleccionadas para la caracterización ecofisiológica.

IV. 5. Caracterización ecofisiológica de las cepas seleccionadas

Se evaluó la viabilidad de las esporas a diferentes temperaturas y actividades hídricas, el crecimiento en medios con distinta actividad hídrica y la producción de exoenzimas de las cepas.

IV. 5.1 *Efecto de la temperatura sobre la germinación de las esporas*

El efecto de la temperatura sobre la germinación de los conidios se determinó inoculando 200µL de una suspensión de 1 x 10^3 esporas/mL (agua-Tween20 al 0,02%) en una placa de Petri conteniendo medio de cultivo Agar-Malta (AM). Se incubó a tres temperaturas diferentes (20, 25 y 30°C) durante 24hs en oscuridad. La viabilidad de las esporas se calculó de igual forma que la descripta en el punto 4. Se realizaron 5 réplicas y se contabilizaron 300 esporas por placa.

IV. 5.2 *Efecto de la actividad hídrica sobre la germinación de las esporas y la velocidad de crecimiento micelial*

Para evaluar el efecto de la actividad hídrica sobre la germinación de los conidios se inocularon 200µL una suspensión de 1 x 10^3 esporas/mL en una placa de Petri conteniendo medio de cultivo agar-papa y diferentes cantidades de glicerol (Tabla 4) (Gervais *et al*., 1988). La actividad hídrica se corroboró utilizando AquaLab 4. Las placas se mantuvieron a 25°C durante 24hs en oscuridad. La viabilidad de las esporas se calculó de igual forma que la descripta en el punto 4. Se realizaron 5 réplicas y se contabilizaron 300 esporas por placa.

Tanto para evaluar el efecto de la temperatura como el de actividad hídrica, la suspensión de esporas utilizada se realizó a partir de cultivos puros crecidos en tubos de vidrio con PDA, incubados durante 10 días a 25°C, a los que se le agrego el volumen de agua-Tween20 al 0,02% necesario para obtener una concentración final de 1 x 10^3 esporas/mL.

Tabla 4. Cantidad de glicerol según las distintas actividades hídricas

A_w	0,995	0,990	0,980	0,970	0,960
Glicerol (g/L)	0	51,06	102,02	152,96	203,94

El crecimiento micelial de las cepas seleccionadas en medios con distinta actividad hídrica se evaluó colocando de forma equidistante 3 discos de micelio en una placa de Petri con Agar-Papa y las cantidades de glicerol descritas anteriormente. Las placas se incubaron a 25°C durante 6 días, momento en que se midió el diámetro de crecimiento.

IV. 5.3 *Evaluación de la producción enzimática de los hongos entomopatógenos*

Se analizó la producción de exoenzimas de algunas de las cepas seleccionadas, incluyendo un aislamiento de cada especie. Para ello, se utilizó el método semicuantitativo API®ZIM, el cual permite analizar la actividad de 19 exoenzimas (Tabla 5).

Se cortaron 5 discos con sacabocado de un cultivo puro, de cada hongo, crecido en una placa de Petri con medio PDA. Los discos se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 200mL con 100mL de medio de cultivo líquido Papa-Dextrosa (PDB) más 0,15g de mudas de *Tenebrio molitor* como inductor de la virulencia, previamente molidas en un mortero. Los cultivos se incubaron durante 40 días (sin agitación) a 25°C. Luego, el medio de cultivo sin micelio se pasó a través de un filtro Millex GV de 0,22µm. Se colocaron 65µL del filtrado en cada cúpula de la tirilla API®ZIM y se incubó en oscuridad durante 4h a 30°C. Se añadió una gota del reactivo ZYM A y una gota del reactivo ZYM B en cada cúpula y se esperó 5 minutos aproximadamente hasta observar el desarrollo de color. Dependiendo de la intensidad de color observada se le adjudicaron valores entre 0 y 5, siendo el valor 0 una reacción negativa y 5 una reacción positiva de color intenso. Los valores 1, 2, 3 y 4 corresponden a reacciones intermedias, considerándose positivas por encima de 2.

Para confirmar los resultados se realizaron dos repeticiones a partir de cultivos independientes.

Tabla 5. Enzimas analizadas, sustrato sobre el que actúan y color esperado en caso que la reacción sea positiva o negativa

Número	Enzima	Sustrato	Reacción	
			Positiva	**Negativa**
1	Control		Incoloro o color de la muestra	
2	Fosfatasa alcalina	2-naftil fosfato	Violeta	
3	Esterasa (C4)	2-naftil butirato	Violeta	
4	Esterasa lipasa(C8)	2-naftil caprilato	Violeta	
5	Lipasa (C14)	2-naftil miristato	Violeta	
6	Leucina arilamidasa	L-leucil-2-naftilamina	Naranja	
7	Valina arilamidasa	L-valil-2-naftilamida	Naranja	
8	Cistina arilamidasa	L-cistil-2-naftilamida	Naranja	
9	Tripsina	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida	Naranja	
10	α-quimiotripsina	N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamida	Naranja	Incolora o
11	Fosfatasa ácida	2-naftil fosfato	Violeta	amarillo
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	Naftol-AS-BI-fosfato	Azul	pálido
13	α-galactosidasa	6-Br-2-naftil-αD-galactopiranosido	Violeta	
14	β-galactosidasa	2-naftil-βD- galactopiranósido	Violeta	
15	β-glucuronidasa	Naftol-AS-BI-βD-glucuronido	Azul	
16	α-glucosidasa	2-naftil-αD-glucopiranósido	Violeta	
17	β-glucosidasa	6-Br-2-naftil-βD-glucopiranósido	Violeta	
18	N-acétil-β-glucosaminidasa	1-naftil-N-acetil-βD-glucosaminido	Marrón	
19	α-mannosidasa	6-Br-2-naftil-αD-mannopiranosido	Violeta	
20	α-fucosidasa	2-naftil-αL-fucopiranosido	Violeta	

IV. 6. Evaluación de la concentración y el tiempo letal 50 de la cepa seleccionada

Se seleccionó la cepa que presentó un grado alto de virulencia y que toleró el mayor rango de temperatura y actividad hídrica.

Se entiende por concentración letal 50 (CL_{50}) a la concentración que causa la mortalidad del 50% de la población blanco en un tiempo dado y por el tiempo letal 50 (TL_{50}) al tiempo en el que se alcanza la mortalidad del 50% de la población blanco para una concentración dada (Sánchez, 2006). Se evaluaron cinco concentraciones de esporas: $1x10^4$, $1x10^5$, $1x10^6$, $1x10^7$ y $1x10^8$ esporas/mL para determinar la CL_{50} de la cepa seleccionada y utilizando una concentración de esporas igual a la CL_{50} se evaluó el TL_{50}. Se utilizó el mismo protocolo que para evaluar la patogenicidad y virulencia, pero adaptado a las concentraciones requeridas por este ensayo. Se realizaron tres réplicas.

IV. 7. Análisis de los datos

Se cuantificaron las especies de hongos entomopatógenos y otros géneros de hongos no entomopatógenos presentes sobre cada individuo de *T. peregrinus*.

Para el análisis de datos, los valores del número de taxa se transformaron utilizando la Ley de Taylor (1961) como: Log (x_{ij}+1), siendo x_{ij} el número de hongos observados de cada género.

Se realizó el Test de Normalidad de Shapiro-Wilk y de homogeneidad de varianza de Levene primero con el número de géneros de hongos observados sobre *T. peregrinus* y luego considerando únicamente el número de especies de hongos entomopatógenos. Mediante un análisis de varianza (ANOVA) se compararon los promedios con el Test de Tukey para determinar la existencia de diferencias entre los sitios de muestreo. Se realizó un análisis de correspondencia teniendo en cuenta los hongos observados en frecuencias superiores al 0,5% para determinar si había alguna asociación de especies con los sitios. Utilizando solo los datos de observaciones de hongos entomopatógenos se realizó un análisis de agrupamientos utilizando el índice de Jaccard y un boostrap de 1000.

Tanto los valores de viabilidad a distintas temperaturas como a distintas actividades hídricas se transformaron como arcoseno($\sqrt{x_{ij}}$). Se realizó el Test no paramétrico de Kruskal-Wallis para determinar si existían diferencias significativas en la viabilidad de las esporas a distinta temperatura. Este análisis se realizó para cada cepa y también se comparó si había diferencias en la viabilidad de las esporas entre las distintas cepas a una temperatura dada.

Para determinar si la viabilidad de las esporas a distintas actividades hídricas eran estadísticamente diferentes, se realizó el Test de Kruskal-Wallis. Esto se realizó para cada cepa y también se comparó si había diferencias significativas en la viabilidad de las esporas entre las distintas cepas a una actividad hídrica dada.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa PAST (Hammer *et al*., 2001).

Para estimar la CL_{50} y TL_{50} se utilizó el modelo estadístico Probit (Finney, 1971), mediante el programa Statgraphics XVII-X64 (http://www.statgraphics.net/descargas-centurion-xvii/). Las curvas de mortalidad diaria acumulada para cada concentración de conidios ($1x10^4$, $1x10^5$, $1x10^6$, $1x10^7$ y $1x10^8$ esporas/mL) o tiempo (1-10 días) se ajustaron mediante el método de mínimos cuadrados no lineal.

V. RESULTADOS

V.1. Aislamiento e identificación morfológica de los hongos

Se procesaron 1283 insectos y se identificaron a nivel de género 2011 hongos. En la Tabla 6 se muestra el total de hongos observados por sitio. El 88% de los individuos analizados presentaron desarrollo de hongos, observándose la mayoría de las veces más de una especie de hongo por insecto (Figura 4). En el sito 764 el 100% de los insectos muestreados presentaron desarrollo fúngico, mientras que en los últimos dos muestreos (102 y 103) se observó el mayor número de insectos sin hongos (32 y 36%, respectivamente).

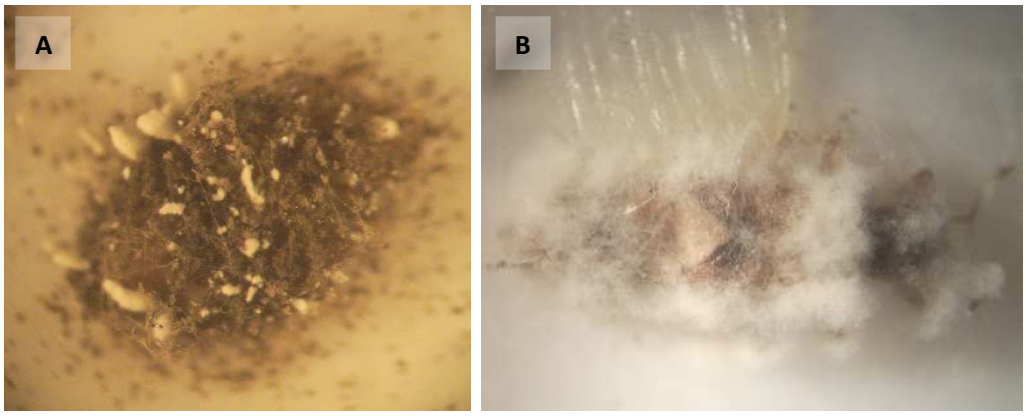


Figura 4. Adultos de *T. peregrinus* con desarrollo fúngico. A: *Acrodontium* sp., *Cladosporium* sp. y *Beauveria* sp. y B: *Alternaria* sp. y *Paecilomyces* sp.

Tabla 6. Número de hongos observados en los distintos sitios de muestreo y porcentaje de insectos sin presencia de hongos

Sitio	Total de insectos	Total de hongos	Insectos sin hongos (%)
Reboledo (764)	159	283	0.0
Reboledo (765)	233	379	4.3
Reboledo (766)	202	298	9.4
Rocha, Redalco (767)	183	282	8.7
Rocha (768)	194	357	12.9
Solís de Mataojo (101)	111	165	20.7
Lavalleja (102)	140	189	32.1
Rocha(103)	61	58	36.1
Total	1283	2011	12.5

Se obtuvieron 34 géneros de hongos en base a la observación de las características morfológicas, de los cuales pocos eran muy frecuentes y muchos géneros se encontraron en baja frecuencia. Los datos se ajustaron a una curva potencial (Figura 5). El 74% de los insectos observados tenían *Cladosporium* spp., el 40% *Alternaria alternata* y el 13% *Acrodontium* spp. (Figura 6 y Tabla 7). El resto de los géneros observados aparecieron en frecuencias menores al 6%. En particular, los hongos entomopatógenos se encontraron en menos del 3% de los insectos muestreados, indicando la ausencia de epizootias en el momento del muestreo (Figura 7). En el sitio de muestreo 766, en Reboledo, no se observó la presencia de hongos entomopatógenos.

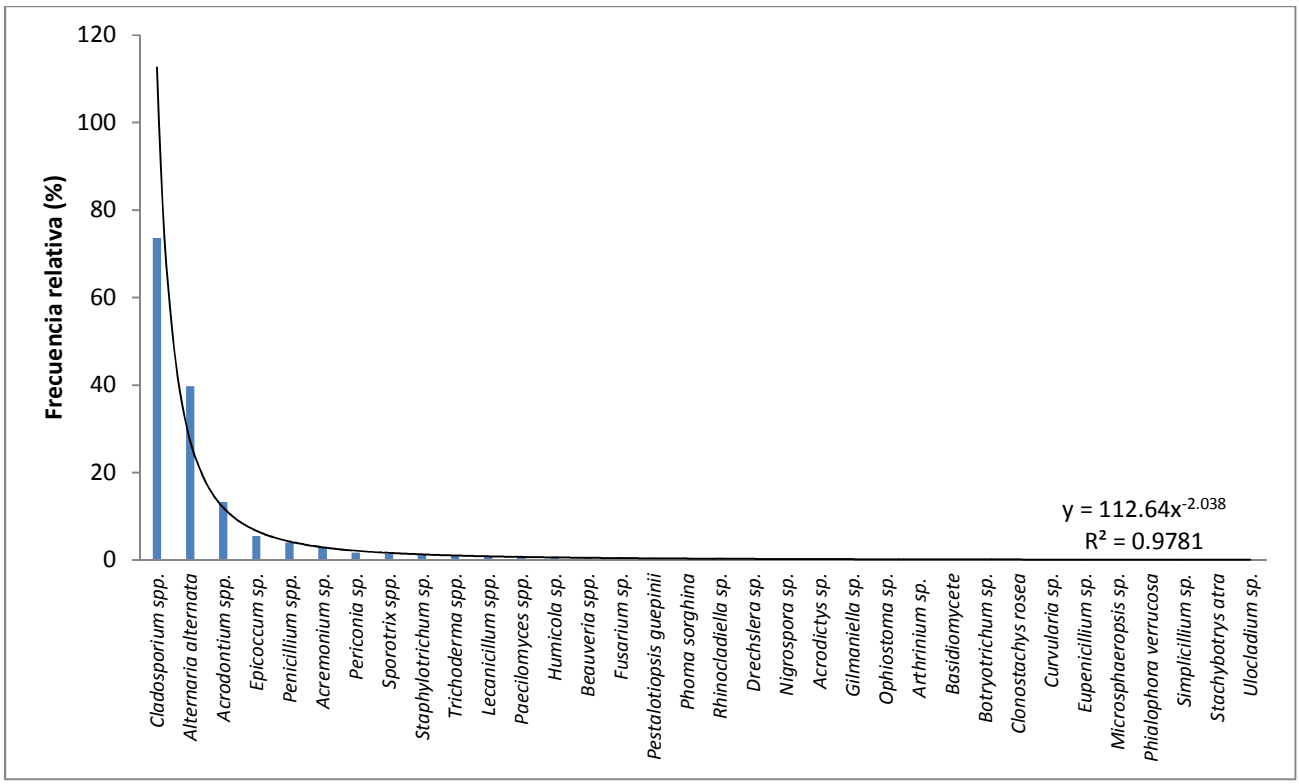


Figura 5. Frecuencia de colonización de los géneros encontrados

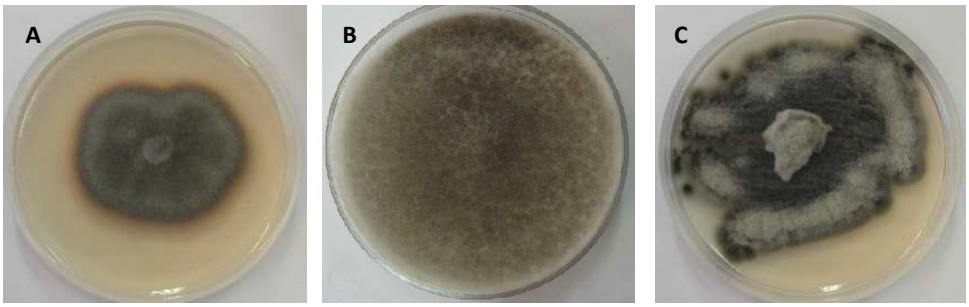


Figura 6. Cultivos de los hongos creciendo sobre medio PDA. A: *Cladosporium* sp., B: *Alternaria alternata* y C: *Acrodontium* sp.

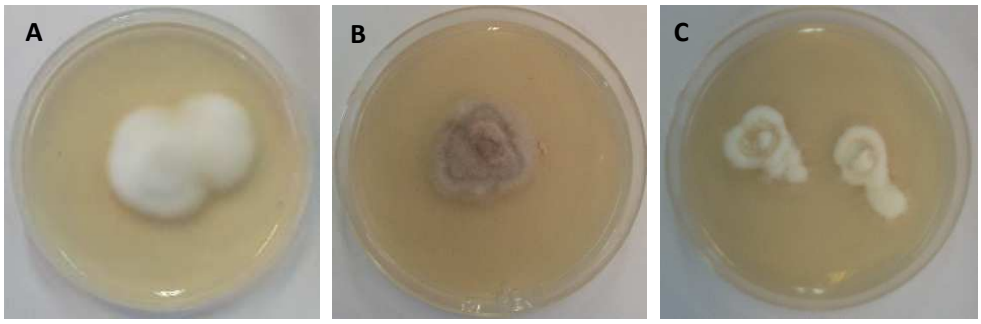


Figura 7. Cultivos de hongos entomopatógenos aislados. A: *Lecanicillium psalliotae*, B: *Purpureocillium lilacinum* y C: *Beauveria pseudobassiana*

No se observaron diferencias significativas entre los sitios de muestreo según los géneros de hongos observados (Anexo IX. 4). El análisis de correspondencia mostró que no existen tendencias que permitan explicar relaciones entre sitios y la composición de las especies fúngicas asociadas a los insectos (Anexo IX. 4).

A partir del grafico de LN de la varianza en función del LN de la media se obtuvo que el valor de p fue igual a -0,04 cercano a 0, indicando que la mejor transformación para los datos es Log (x_{ij}+1). El R^2 fue igual a 0,975 por lo que se puede asumir con un 97,5% de confianza que la transformación es válida (Anexo IX. 3). El test de Shapiro-Wilk mostró que los datos no se ajustan a una distribución Normal, incluso luego de ser transformados (p=2,82E-21<0,05), pero

si presentaron homogeneidad de varianza (p=0,44>0,05). Por esta razón los datos se analizaron con el test paramétrico de Tukey.

Al tener en cuenta únicamente la infección por hongos entomopatógenos tampoco se observaron diferencias significativas entre los sitios (Anexo IX. 5). Si bien, los datos no se ajustaron a una distribución normal (p= 0,0001<0,05), presentaron homogeneidad de varianza (p=0,97>0,05) y por esta razón se analizaron mediante el test de Tukey.

El análisis de agrupamiento (Jaccard = 0,95) muestra que los sitios 764 y 765 (Reboledo), y los sitios 768 y 767 (Rocha) no se diferencian entre sí, con un boostrap de 100 y 67, respectivamente (Figura 8).

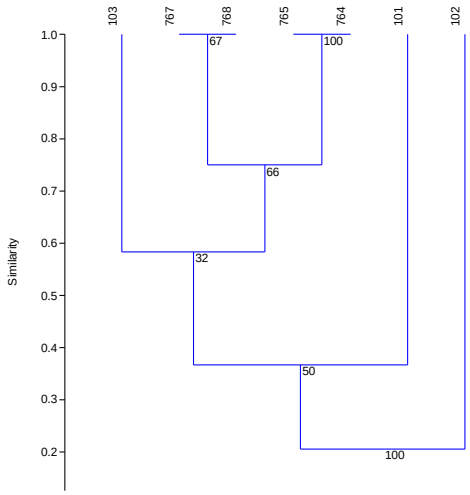


Figura 8. Diagrama de agrupamiento de los distintos sitios según el número de hongos entomoaptógenos de cada especie observada

Tabla 7. Frecuencia de colonización de los géneros observados en los distintos sitios de muestreo

Taxa	Frecuencia de colonización (%)								Total (%)
	764	765	766	767	768	101	102	103	
Acremonium sp.	3.8	0.4	2.0	2.2	9.3	1.8	1.4	3.3	3.0
Acrodictys sp.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.9	0.0	0.0	0.2
Acrodontium spp.	15.1	5.6	29.7	14.2	15.5	8.1	2.1	9.8	13.3
Alternaria alternata	43.4	42.5	17.3	50.8	45.9	43.2	49.3	14.8	39.8
Arthrinium sp.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0	0.1
Basidiomycete	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
***Beauveria* spp.**	0.0	0.0	0.0	1.1	0.5	2.7	0.0	0.0	0.5
Botryotrichum sp.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.1
Cladosporium spp.	84.9	89.3	81.7	60.7	74.7	55.9	64.3	45.9	73.6
Clonostachys rosea	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
Curvularia sp.	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
Drechslera sp.	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	0.9	0.7	0.0	0.4
Epicoccum sp.	12.6	7.3	2.0	2.7	4.6	4.5	6.4	3.3	5.5
Eupenicillium sp.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.1
***Fusarium* sp.**	1.3	0.4	0.0	0.5	1.0	0.0	0.0	0.0	0.5
Gilmaniella sp.	0.0	0.4	0.0	0.0	0.5	0.0	0.7	0.0	0.2
Humicola sp.	0.0	0.0	0.0	0.5	2.1	3.6	0.7	0.0	0.8
***Lecanicillum* spp.**	0.6	0.9	0.0	0.5	2.6	0.0	0.7	3.3	0.9
Microsphaeropsis sp.	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
Nigrospora sp.	0.6	0.4	0.5	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
Ophiostoma sp.	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.7	0.0	0.2
***Paecilomyces* spp.**	0.6	1.3	0.0	1.1	1.5	0.9	0.0	1.6	0.9
Penicillium spp.	2.5	3.4	3.0	3.3	4.1	10.8	4.3	1.6	4.0
Periconia sp.	1.3	2.1	3.5	2.7	1.0	0.0	0.7	0.0	1.7
Pestalotiopsis guepinii	0.0	2.1	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5
Phialophora verrucosa	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
Phoma sorghina	0.0	0.4	1.0	0.0	0.5	1.8	0.0	0.0	0.5
Rhinocladiella sp.	1.3	0.9	0.0	0.5	0.0	0.9	0.0	0.0	0.5
***Simplicillium* sp.**	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.1
Sporotrix spp.	1.3	0.0	0.5	3.8	2.1	3.6	0.0	0.0	1.4
Stachybotrys atra	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.1
Staphylotrichum sp.	0.0	0.0	0.0	0.0	6.7	2.7	1.4	0.0	1.4
Trichoderma spp.	0.0	0.9	0.5	2.2	1.5	0.9	0.0	3.3	1.0
Ulocladium sp.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0	0.1
Sin identificar*	7.5	3.9	5.0	4.9	5.7	3.6	0.0	8.2	4.7

*Los hongos sin identificar no corresponden a entomopatógenos

V. 2. Análisis filogenético

De un total de 36 hongos entomopatógenos observados se lograron aislar 24 cepas. Estas se identificaron a nivel molecular obteniendo 6 cepas pertenecientes al género *Beauveria*, 1 *Fusarium*, 3 *Isaria*, 8 *Lecanicillium*, 1 *Paecilomyces*, 2 *Pochonia*, 2 *Purpureocillium* y 1 *Simplicillium* (Tabla 8).

Tabla 8. Especies de hongos entomopatógenos asilados

Código	Cepa	Sitio
A1	*Simplicillium* sp.	102: Lavalleja
B1	*B. bassiana*	767: Rocha
B2	*B. pseudobassiana*	101: Solís de Mataojo
B3	*B. bassiana*	101: Solís de Mataojo
B4	*B. pseudobassiana*	767: Rocha
B5	*B. pseudobassiana*	101: Solís de Mataojo
B6	*B. pseudobassiana*	768: Rocha
F1	*Fusarium* sp.	767: Rocha
L1	*L. muscarium*	768: Rocha
L2	*P. bulbillosa*	764: Reboledo
L3	*L. muscarium*	767: Rocha
L4	*L. psalliotae*	765: Reboledo
L5	*L. lecanii*	103: Rocha
L6	*L. psalliotae*	103: Rocha
L7	*L. psalliotae*	764: Reboledo
L8	*L. psalliotae*	103: Rocha
L9	*Lecanicillum* sp.	768: Rocha
L10	*P. suchlasporia*	765: Reboledo
P1	*P. variotii*	768: Rocha
P2	*P. lilacinum*	765: Reboledo
P3	*I. farinosa*	765: Reboledo
P4	*I. farinosa*	765: Reboledo
P5	*I. farinosa*	103: Rocha
P6	*P. lilacinum*	768: Rocha

A partir del árbol filogenético realizado en base a la secuencia de la región ITS de las cepas aisladas de *Beauveria* spp., se obtuvo que las cepas estudiadas se agruparon con dos especies de *Beauveria* (Figura 9). Las cepas B1 y B3 se agruparon con *B. bassiana* (97% boostrap), mientras que las cepas B2, B4, B5 y B6 se agruparon con *B. pseudobassiana* (90% boostrap). El

alineamiento final alcanzó 334 sitios. La longitud del árbol fue de 25 con un índice de consistencia (CI) de 0,92 y un índice de retención (RI) de 0,93. Estas relaciones se confirmaron mediante el árbol filogenético realizado a partir de secuencias del Factor de Elongación 1-alfa, donde las cepas B1 y B3 se agruparon con *B. bassiana* (99% boostrap) y las cepas B2, B4, B5 y B6 se agruparon con *B. pseudobassiana* (95% boostrap) (Figura 10). El alineamiento final alcanzó 235 sitios. La longitud del árbol fue de 185 con un CI de 0,96 y un RI de 0,98.

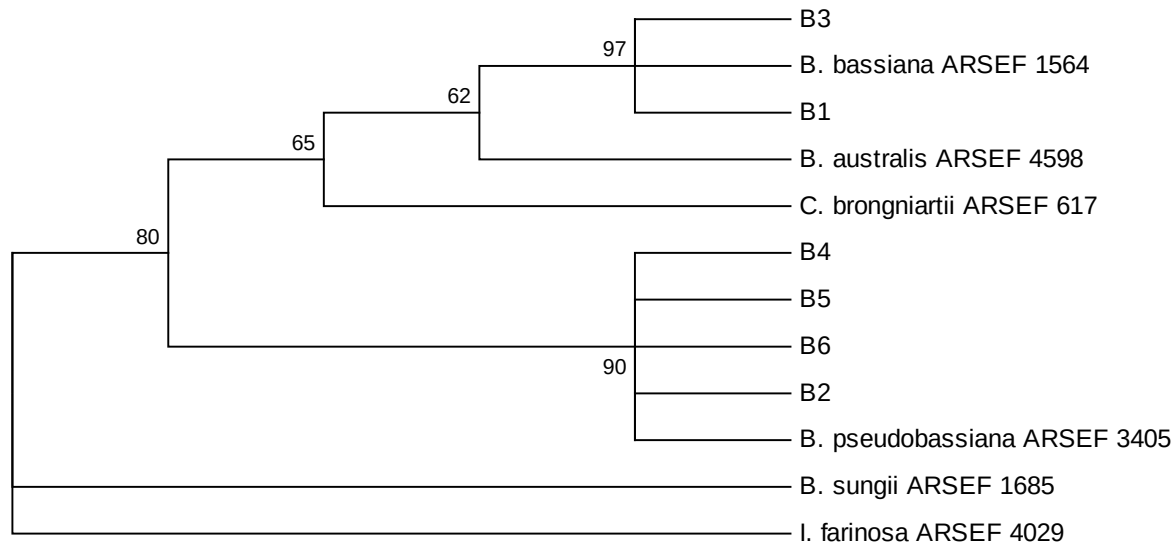


Figura 9. Árbol filogenético consenso construido por máxima parsimonia a partir de secuencias de la región ITS de los aislamientos de *Beauveria* spp. y secuencias del GenBank. Como grupo externo se utilizó *I. farinosa*

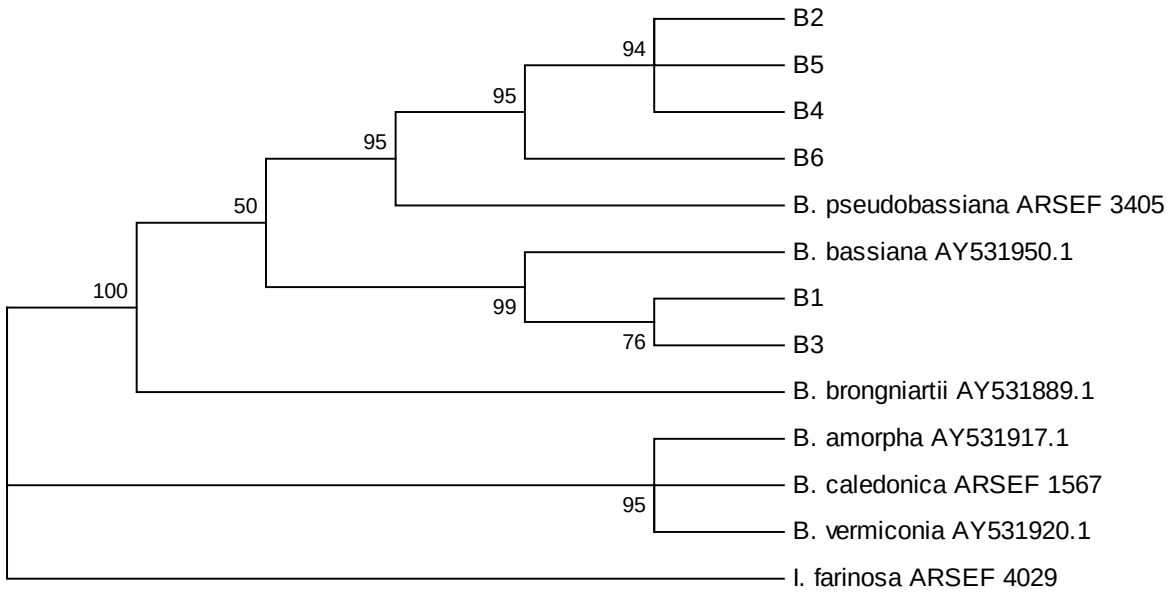


Figura 10. Árbol filogenético consenso construido por máxima parsimonia a partir de secuencias del Factor de Elongación 1-alfa de los aislamientos de *Beauveria* spp. y secuencias del GenBank. Como grupo externo se utilizó *I. farinosa*

De las 10 cepas identificadas morfológicamente como *Lecanicillium* spp. dos resultaron pertenecer al género *Pochonia*. El árbol construido en base a la región ITS mostró que la cepa L2 se agrupó con *P. bulbillosa* (boostrap 100) y L10 se agrupó con *P. suchlasporia* (boostrap 98). Estas dos especies fueron utilizadas como grupo externo. El análisis de la región ITS no resultó apropiado para discriminar las especies *L. lecanii* y *L. muscarium*. Las cepas L6, L7 y L8 se agruparon con *L. psalliotae* (98 boostrap) (Figura 11). El alineamiento final alcanzó 429 sitios. La longitud del árbol fue de 264 con un CI de 0,84 y un RI de 0,89. A partir del árbol filogenético de las secuencias concatenadas de ITS y NADH deshidrogenasa se identificó a la cepa L5 como *L. lecanii* y a las cepas L1 y L3 como *L. muscarium*. La cepa L9 no pudo ser identificada (Figura 12). El alineamiento final alcanzó 828 sitios. La longitud del árbol fue de 271 con un CI de 0,84 y un RI de 0,86.

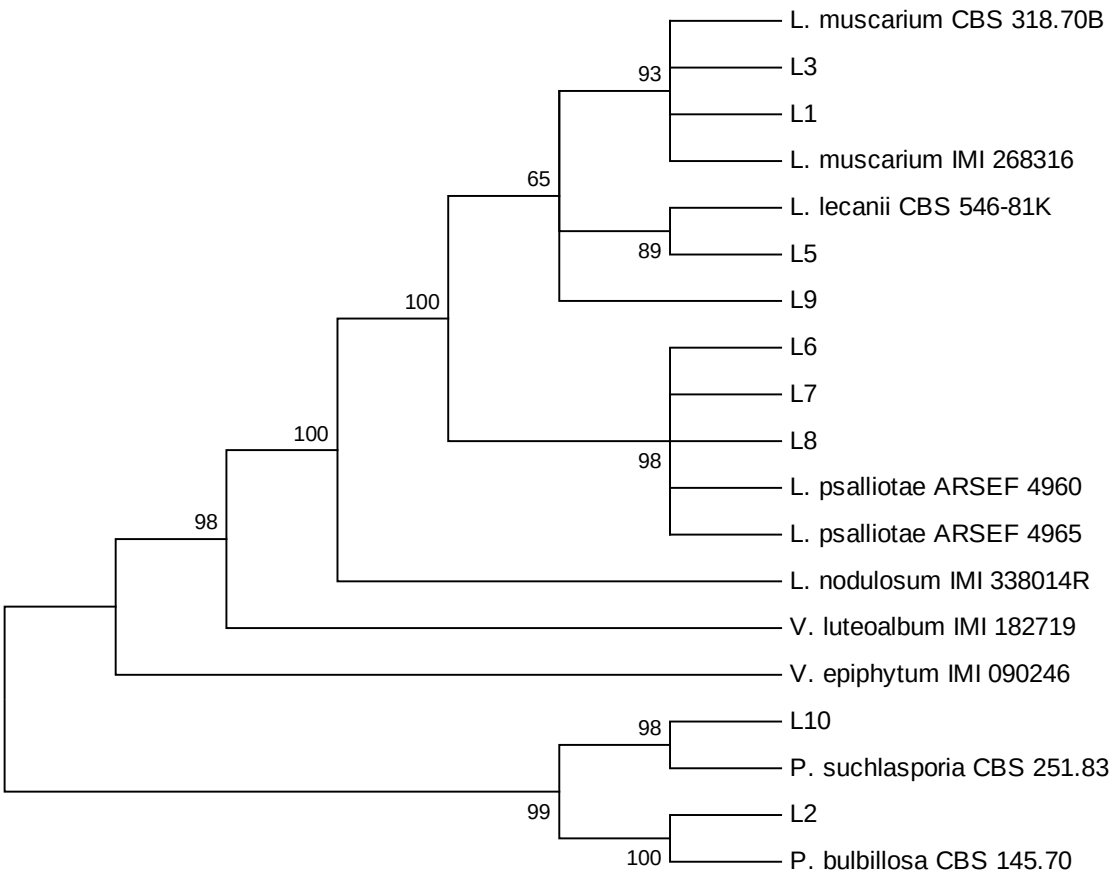


Figura 11. Árbol filogenético consenso construido por máxima parsimonia a partir de secuencias de la región ITS de los aislamientos de *Lecaicillium* spp., *Pochonia* spp. y secuencias del GenBank. Como grupo externo se utilizó *P. suchlasporia* y *P. bulbillosa*

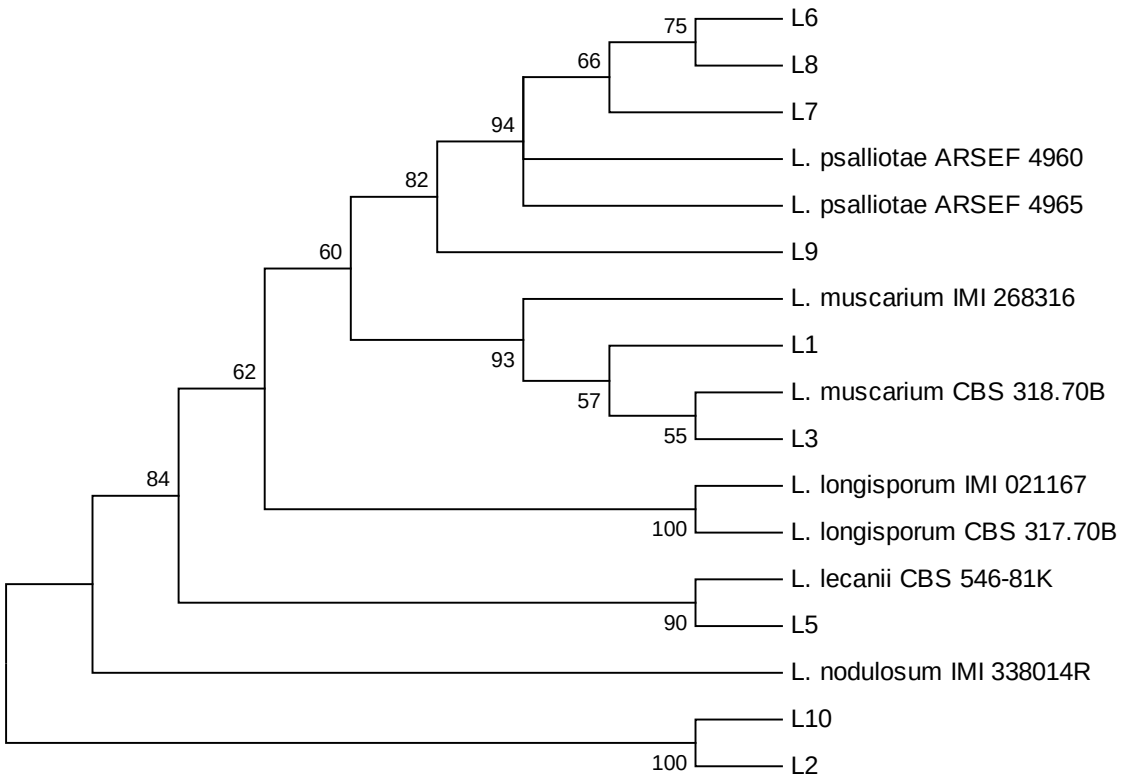


Figura 12. Árbol filogenético consenso construido por máxima parsimonia a partir de secuencias de la región ITS y de la NADH deshidrogenasa de los aislamientos de *Lecanicillum* spp., *Pochonia* spp. y secuencias del GenBank. Como grupo externo se utilizó *P. suchlasporia* (L10) y *P. bulbillosa* (L2)

A partir del árbol filogenético construido en base a secuencias de la región ITS del género identificado morfológicamente como *Paecilomyces*, se obtuvieron 3 aislamientos que agruparon con *Isaria farinosa* (P3, P4 y P5), dos con *Purpureocillium lilacinum* (P2 y P6) y uno con *Paecilomyces variotii* (P1) (Figura 13). El alineamiento final alcanzó 385 sitios. La longitud del árbol fue de 514 con un CI de 0,80 y un RI de 0,80. Estos agrupamientos también fueron observados cuando se utilizaron secuencias concatenadas de ITS con secuencias del gen de la β-tubulina, confirmando así las especies obtenidas (Figura 14). El alineamiento final alcanzó 496 sitios. La longitud del árbol fue de 381 con un CI de 0,81 y un RI de 0,79.

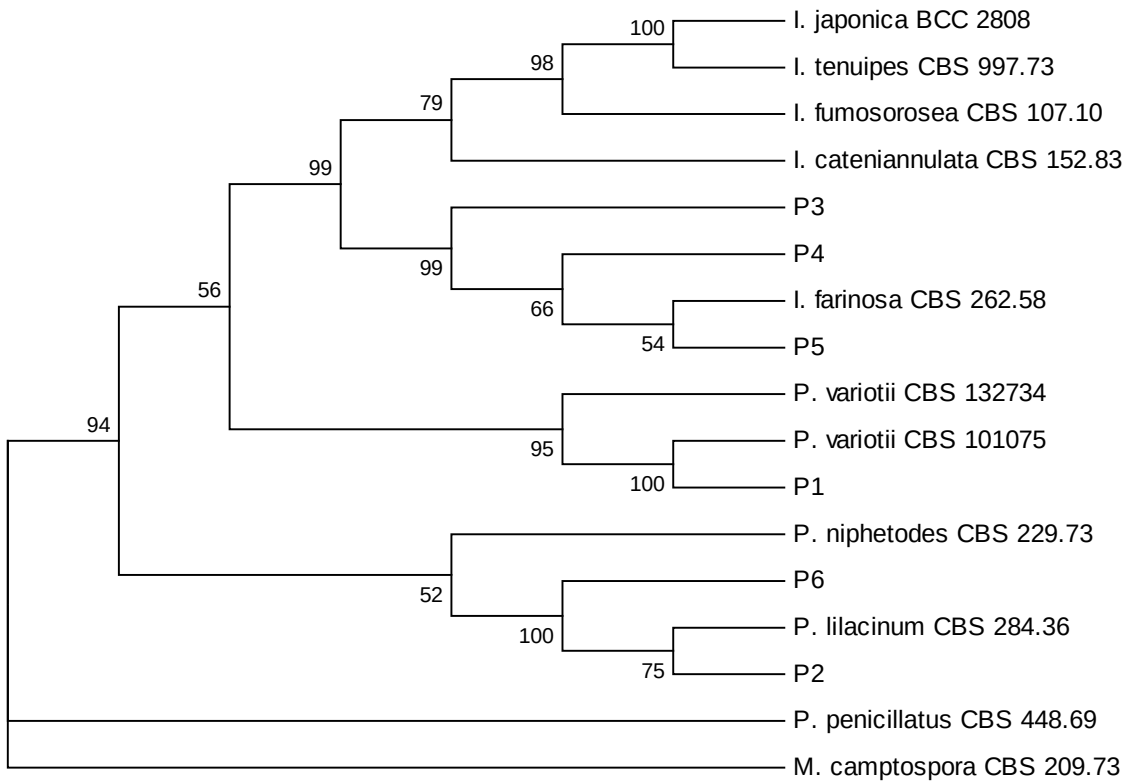


Figura 13. Árbol filogenético consenso construido por máxima parsimonia a partir de secuencias de la región ITS de los aislamientos de *Isaria* sp., *Paecilomyces* sp., *Purpureocillium* sp. y secuencias del GenBank. Como grupo externo se utilizó *M. camptospora*

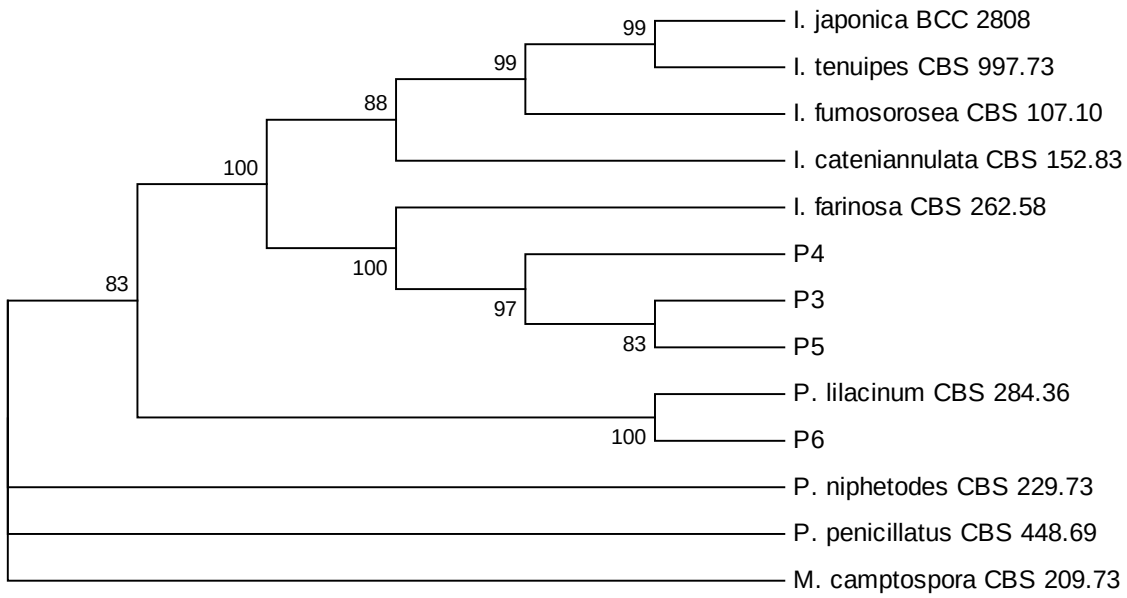


Figura 14. Árbol filogenético consenso construido por máxima parsimonia a partir de secuencias de la región ITS y de la β-tubulina de los aislamientos de *Isaria* sp., *Paecilomyces* sp., *Purpureocillium* sp. y secuencias del GenBank. Como grupo externo se utilizó *M. camptospora*

V.3. Patogenicidad y virulencia de los hongos entomopatógenos sobre *T. peregrinus*

En base a la patogenicidad y virulencia se seleccionaron las cepas que provocaron mayor mortalidad de *T. peregrinus* en un menor tiempo.

Para estos ensayos se utilizaron 19 cepas de hongos entomopatógenos de las 24 cepas aisladas, dado que algunas cepas de *L. psalliotae* produjeron muy baja cantidad de esporas.

En la primera evaluación se obtuvieron 6 cepas pertenecientes a la clase 2, 4 cepas de *Beauveria* (B1, B2, B3 y B4), 1 de *Purpurecillium* (P2) y 1 de *Isaria* (P3) (Figura 15). En la segunda evaluación el control positivo demoró más tiempo en matar al 90% de los insectos, posiblemente porque la temperatura del ensayo fue levemente menor que la del primero (21°C y 23°C, respectivamente). Debido a esto, en el segundo ensayo, se incluyeron las cepas de la clase 3 en la selección: 2 cepas de *Beauveria* (B5 y B6) y 1 de *Isaria* (P4) (Figura 16). En ambos

casos, no se obtuvieron cepas pertenecientes a la clase 1. Los aislamientos de *Fusarium semitectum* (F1) y *Lecanicillium psalliotae* (L4) no resultaron patogénicos frente a *Thaumastocoris* y los aislamientos de *Simplicillium lanosoniveum* (A1) y *Paecilomyces variotti* (P1) fueron los que produjeron el menor porcentaje de mortalidad de *T. peregrinus* en las condiciones evaluadas. Las 9 cepas seleccionadas se utilizaron en los siguientes ensayos.

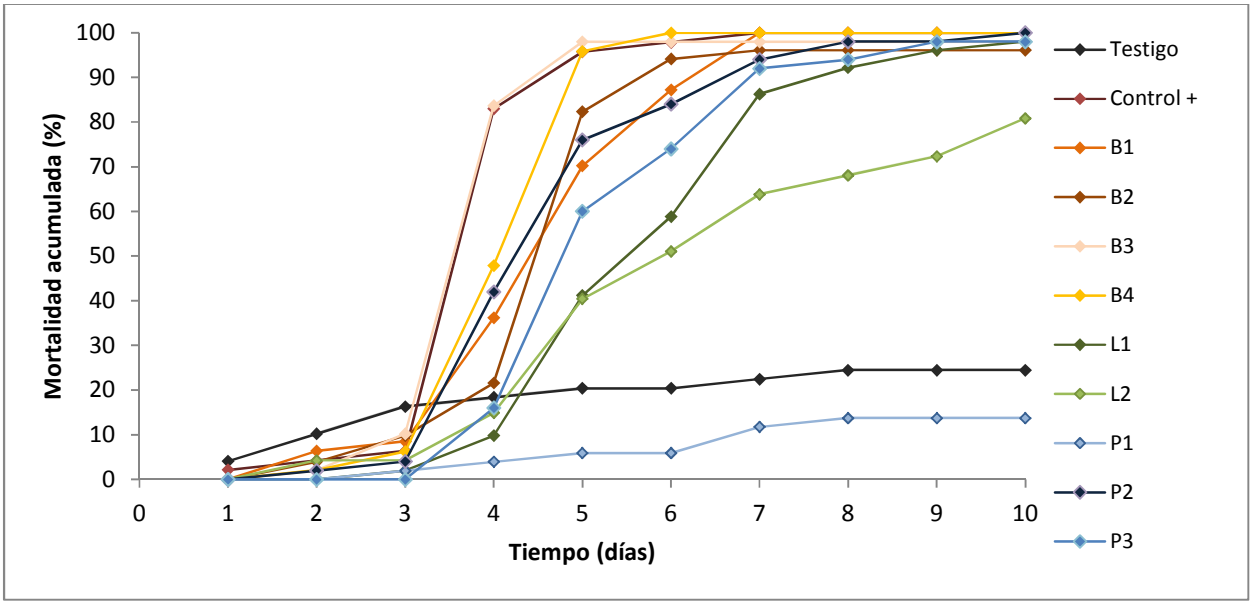


Figura 15. Mortalidad acumulada en función del tiempo: 1. B1: *B. bassiana*, B2: *B. pseudobassiana*, B3: *B. bassiana*, B4: *B. pseudobassiana*, L1: *L. muscarium*, L2: *P. bulbillosa*, P1: *P. variotii*, P2: *P. lilacinum* y P3: *I. farinosa*

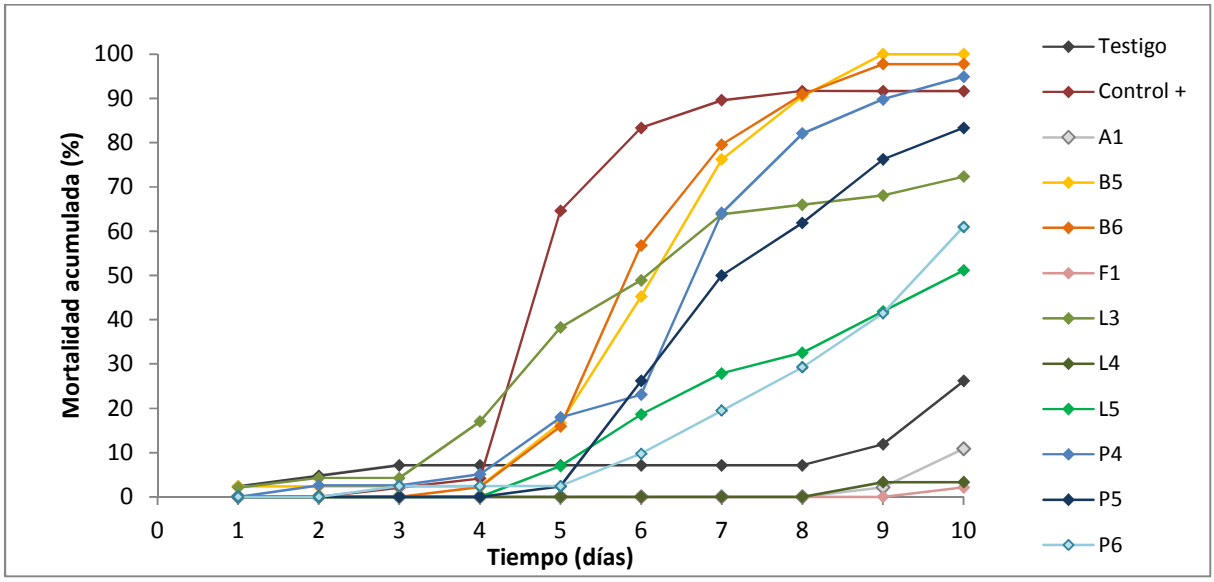


Figura 16. Mortalidad acumulada en función del tiempo: 2. A1: *Simplicillium* sp., B5: *B. pseudobassiana*, B6: *B. pseudobassiana*, F1: *Fusarium* sp., L3: *L. muscarium*, L4: *L. psalliotae*, L5: *L. lecanii*, P4: *I. farinosa*, P5: *I. farinosa* y P6: *P. lilacinum*

V. 4. Caracterización ecofisiológica de las cepas seleccionadas

V. 4. 1. *Efecto de la temperatura sobre la germinación de las esporas*

En la mayoría de las cepas la viabilidad de las esporas a las tres temperaturas evaluadas superó el 70%. El aislamiento B3 de *B. bassiana* (Figura 17) y el aislamiento P2 de *P. lilacinum* fueron los que presentaron el mayor porcentaje de germinación de esporas en las tres temperaturas evaluadas. Los menores porcentajes de germinación fueron para la cepa B5 de *B. pseudobassiana* que presentó una viabilidad de 49% a 20°C y la cepa P4 de *I. farinosa* que presentó una viabilidad de 13% a 30°C. Se observaron diferencias significativas en la viabilidad de las esporas a distintas temperaturas, tanto dentro de una misma cepa como entre cepas. La viabilidad de las esporas de las cepas B3 (*B. bassiana*) y P2 (*P. lilacinum*) fue significativamente diferente solo a los 25°C, siendo levemente superior en P2 (100%). Tanto la cepa B2 como la B3 (*B. pseudobassiana* y *B. bassiana*, respectivamente) no mostraron diferencias significativas en la germinación de las esporas a las distintas temperaturas (p= 0,1 y p= 0,3, respectivamente), el

resto de las cepas mostraron diferencias entre al menos dos temperaturas (Anexo IX. 6 y Tabla 9).

Tabla 9. Viabilidad de las esporas de las cepas seleccionadas en las distintas temperaturas

Especie	Temperatura (°C)					
	20		25		30	
	Promedio	Desvío	Promedio	Desvío	Promedio	Desvío
***B. bassiana* (B1)**	86.5^{Aa}	2.2	98.1^{Ab}	0.9	93.3^{Ac}	1.5
***B. pseudobassiana* (B2)**	81.2^{Ba}	2.4	85.0^{BCDEGa}	9.3	73.9^{Ba}	4.1
***B. bassiana* (B3)**	**98.1^{Ca}**	**3.0**	**96.0^{ACa}**	**3.0**	**98.3^{Ca}**	**2.3**
***B. pseudobassiana* (B4)**	$84.0^{ABCDEGa}$	3.8	95.4^{Cb}	1.6	96.0^{ACb}	1.9
***B. pseudobassiana* (B5)**	49.1^{Da}	2.2	86.3^{DEGb}	2.6	87.1^{Db}	2.4
***B. pseudobassiana* (B6)**	73.7^{Ea}	1.6	88.4^{Eb}	1.8	88.2^{DEb}	3.7
***P. lilacinum* (P2)**	**99.6^{CFa}**	**0.5**	**100.0^{FHa}**	**0.0**	**$92.0^{ACDEFGb}$**	**7.1**
***I. farinosa* (P3)**	76.1^{BEGa}	3.3	82.0^{Ga}	2.5	88.3^{DEFb}	2.8
***I. farinosa* (P4)**	97.4^{CHa}	1.6	99.7^{Hb}	0.3	13.3^{CFGc}	1.7

Medias seguidas de diferente letra en mayúscula, dentro de una columna, y en minúscula, dentro de una fila, difieren significativamente

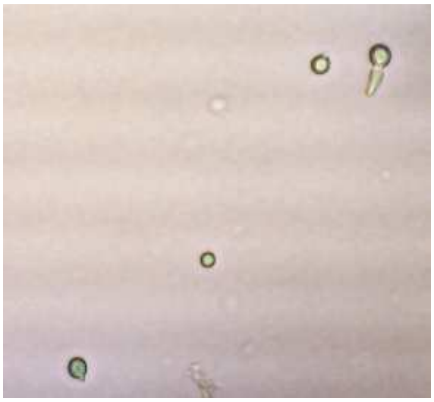


Figura 17. Esporas germinadas y sin germinar de *B. bassiana* (B3)

V. 4. 2. *Efecto de la actividad hídrica sobre la germinación de las esporas*

Como se observa en la Tabla 10, las bajas actividades hídricas afectan la germinación de las esporas, observándose diferencias significativas entre la germinación de las esporas a actividades hídricas de 0,970 y 0,960 en todas las cepas con la germinación a actividades hídricas superiores. Tanto dentro de una misma cepa como entre cepas, se observaron diferencias significativas en la viabilidad de las esporas. Las cepas que presentaron mayor viabilidad a actividades hídricas bajas fueron B3 (*B. bassiana*) y P2 (*P. lilacinum*). Ambas cepas presentaron diferencias significativas entre ellas en la germinación de las esporas a 0,970 y 0,960 de actividad hídrica, siendo la viabilidad de las esporas de P2 superior a la de B3. Una cepa de *B. pseudobassiana* (B2) fue la que presentó la menor viabilidad a 0,980 y muy baja viabilidad a 0,970 y 0,960 (Anexo IX. 7 y Tabla 10).

Tabla 10. Viabilidad de las esporas de las cepas seleccionadas en las distintas actividades hídricas

Especie	Actividad hídrica									
	0.995		0.990		0.980		0.970		0.960	
	Promedio	Desvío	Promedio	Desvío	Promedio	Desvío	Promedio	Desvío	Promedio	Desvío
***B. bassiana* (B1)**	97.6^{Aa}	0.7	96.1^{Aa}	1.5	87.6^{Ab}	2.4	38.8^{Ac}	4.4	2.4^{Ad}	0.6
***B.pseudobassiana* (B2)**	98.4^{Aa}	0.8	91.5^{Bb}	1.7	49.9^{Bc}	5.9	7.4^{Bd}	1.9	1.4^{Ae}	0.9
***B. bassiana* (B3)**	**98.8^{ACDEa}**	**0.7**	**100.0^{Cb}**	**0.0**	**98.9^{Ca}**	**0.7**	**92.1^{Cc}**	**2.8**	**42.7^{Bd}**	**4.6**
***B.pseudobassiana* (B4)**	95.9^{Ba}	1.7	97.8^{Ab}	0.7	87.6^{Ac}	2.8	37.7^{Ad}	3.9	0.0^{Ce}	0.0
***B.pseudobassiana* (B5)**	96.9^{ABa}	1.4	96.7^{Aa}	1.7	78.0^{Db}	6.1	18.5^{BDc}	8.0	2.2^{Ad}	1.3
***B.pseudobassiana* (B6)**	99.8^{CEa}	0.4	97.9^{Ab}	1.8	88.9^{AGc}	3.9	22.5^{DEd}	5.9	0.2^{CDe}	0.5
***P. lilacinum* (P2)**	**99.8^{CDEa}**	**0.4**	**100.0^{CDa}**	**0.0**	**99.6^{CEa}**	**0.5**	**97.7^{Fb}**	**0.8**	**91.1^{Ec}**	**2.4**
***I. farinosa* (P3)**	98.1^{Aa}	0.3	98.4^{Aa}	1.1	97.7^{CFa}	1.0	53.8^{Gb}	7.7	1.3^{ACDFc}	1.4
***I. farinosa* (P4)**	99.7^{Ea}	0.6	100.0^{CDEa}	0.0	94.9^{FGb}	2.6	24.4^{DEHc}	4.5	0.2^{CDFd}	0.3

Medias seguidas de diferente letra en mayúscula, dentro de una columna, y en minúscula dentro de una fila, difieren significativamente

V. 4. 3. *Efecto de la actividad hídrica sobre el crecimiento miceliar*

Como se observa en la Figura 18, la actividad hídrica afecta al crecimiento miceliar, a menor actividad hídrica menor crecimiento. La cepa P2 de *P. lilacinum* fue la que creció más en todas las actividades hídricas. La cepa B3 de *B. bassiana* también tuvo un crecimiento mayor al de las demás cepas pero en el medio con actividad hídrica de 0.970 y de 0.960 las diferencias en el crecimiento entre las cepas se minimizaron. En 0.960 la mayoría de las cepas tuvieron un crecimiento casi igual a 0 (tamaño del disco). Las cepas B1 de *B. bassiana* y B2 de *B. pseudobassiana* fueron las que presentaron el menor crecimiento miceliar.

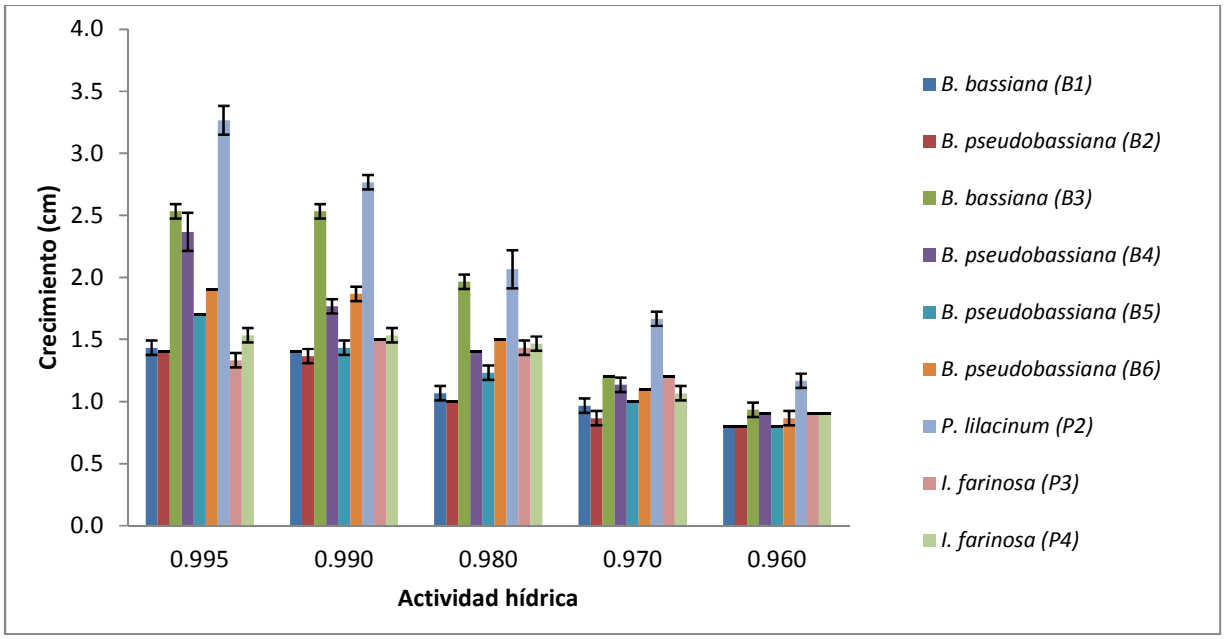


Figura 18. Crecimiento de las cepas según las distintas actividades hídricas

V. 4. 4. *Evaluación de la producción enzimática de los hogos entomopatógenos*

Las cepas utilizadas para evaluar la producción de exoenzimas se seleccionaron por su virulencia eligiendo una cepa de cada género. Como se observa en la Tabla 11 el perfil enzimático varió entre las especies. Ninguna especie mostró actividad Lipasa (C14), Cistina arilamidasa, Tripsina, β-glucuronidasa, α-glucosidasa y α-fucosidasa. La cepa de *B. bassiana* (B3) presentó la mayor producción de la enzima N-acétil-β-glucosaminidasa (18), implicada en la degradación de quitina de la cutícula de insectos (Figura 19).

Tabla 11. Actividad enzimática de las distintas especies

Especie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
***B. bassiana* (B3)**		1	3	1	1	1	1	1	1	5	5	3	3	4	1	1	1	5	1	1
***B. pseudobassiana* (B5)**		1	4	2	1	1	1	1	1	1	4	4	5	3	1	2	4	3	1	1
***P. lilacinum* (P2)**		5	4	4	0	5	4	0	0	5	4	3	3	4	0	0	5	0	5	0
***I. farinosa* (P3)**		1	3	3	1	1	1	1	1	1	4	4	3	1	1	1	3	3	1	1

1: Control, 2: Fosfatasa alcalina, 3: Esterasa (C4), 4: Esterasa lipasa(C8), 5: Lipasa (C14), 6: Leucina arilamidasa, 7: Valina arilamidasa, 8: Cistina arilamidasa, 9: Tripsina, 10: α-quimiotripsina, 11: Fosfatasa ácida, 12: Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, 13: α-galactosidasa, 14: β-galactosidasa, 15: β-glucuronidasa, 16: α-glucosidasa, 17: β-glucosidasa, 18: N-acétil-β-glucosaminidasa, 19: α-mannosidasa y 20: α-fucosidasa. 0-2: negativo y 3-5: positivo

Figura 19. Reacciones enzimáticas de API®ZIM para la cepa de *B. bassiana* B3 (superior) y testigo (inferior)

V. 5. Evaluación de la concentración letal media (CL_{50}) y el tiempo letal medio (TL_{50}) de la cepa seleccionada

La cepa de *B. bassiana* (B3) se preseleccionó por su virulencia, germinación de las esporas a distintas temperaturas y actividades hídricas, crecimiento a las distintas actividades hídricas y producción de exoenzimas.

Como se observa en la Figura 21 la mortalidad de *T. peregrinus* fue mayor a concentraciones más altas de inóculo. La mortalidad de los insectos causada por la infección con *B. bassiana* se evidenció a partir del 3-4 día desde la inoculación. En la Figura 22 se observa un adulto con desarrollo de micelio y esporas de *B. bassiana*.

A partir del análisis Probit, se determinó que la CL_{50} de la cepa B3 de *B. bassiana* fue de 2,4 x 10^7esporas/mL (1,2 x 10^7 – 3,8 x 10^7 esporas/mL, con un límite de confianza del 95%) y el TL_{50} fue de 5,6 días (5,1 – 6,1 días, con un límite de confianza del 95%) (Figuras 23 y 24 y Anexo IX. 9 y 10).

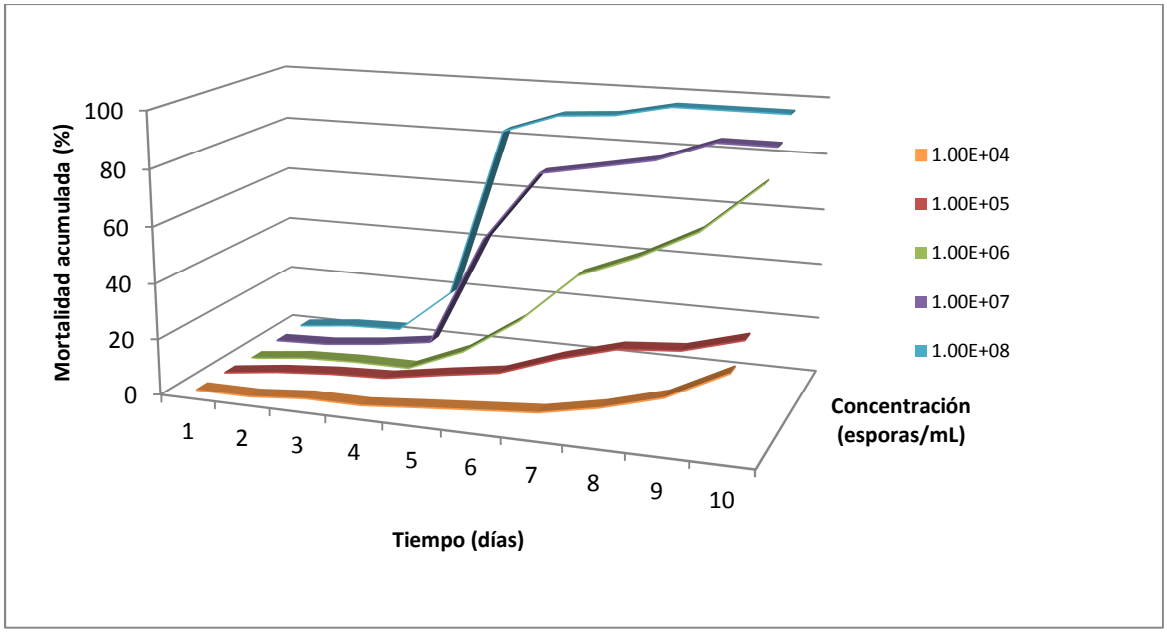


Figura 21. Mortalidad acumulada de *T. peregrinus* luego de la aplicación de las distintas concentraciones de conidios de *B. bassiana* (B3), en función del tiempo

Figura 22. Adulto de *T. peregrinus* infectado con la cepa de *B. bassiana* B3

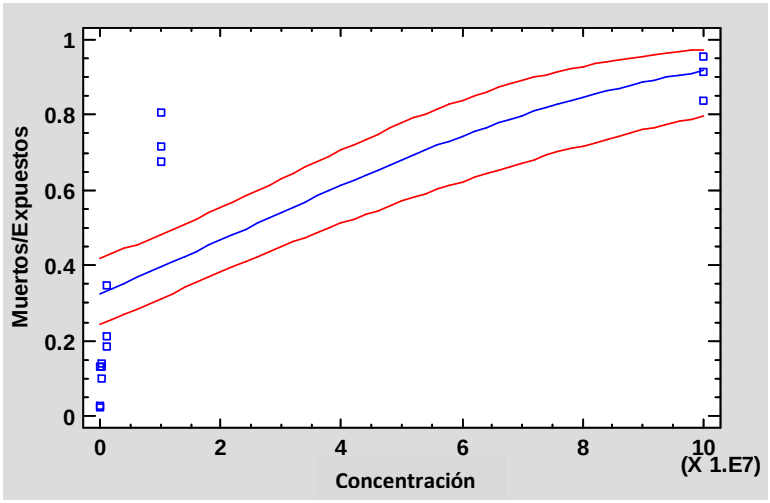


Figura 23. Modelo Probit ajustado de la relación entre mortalidad y la concentración de esporas de *B. bassiana*

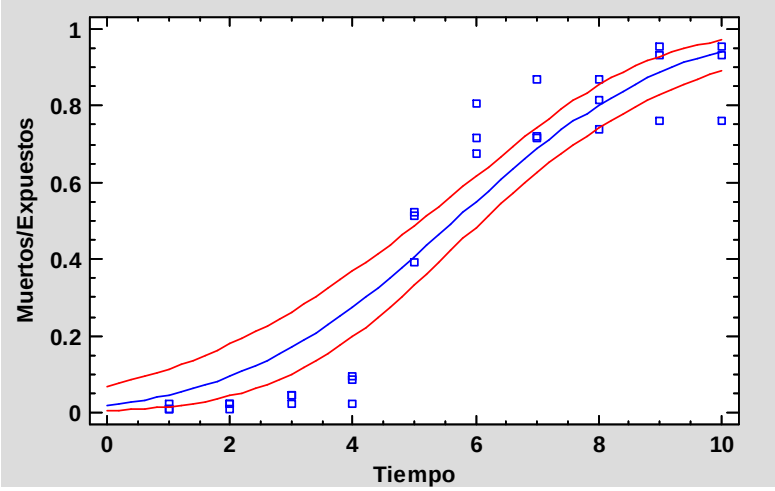


Figura 24. Modelo Probit ajustado de la relación entre mortalidad y tiempo

VI. DISCUSIÓN

A partir de los 1283 individuos analizados se encontraron 2011 hongos. Entre ellos los hongos pertenecientes a los géneros *Cladosporium* spp. y *Alternaria* sp. fueron los más frecuentemente observados sobre los individuos de *T. peregrinus* colectados. La presencia de estos hongos es probable que esté asociada a un desarrollo saprotrófico casual sobre los cadáveres de *Thaumastocoris* más que a un posible rol como patógenos. Sin embargo, Soliman (2014) encontró tres cepas de *Cladosporium* sp. patógenas de *Thaumastocoris*, pero de muy baja virulencia. La baja frecuencia de hongos entomopatógenos (menor al 3%) y la diversidad de especies observada, descarta la ocurrencia de epizootias al momento de muestreo. Esto es diferente a lo observado en el año 2012 cuando hubo una epizootia en Uruguay sobre *T. peregrinus* causada por *Beauveria* sp. y un hongo perteneciente a los Entomophtorales cuya especie no fue identificada (comunicación personal de Sofia Simeto). Dado que las epizootias son el resultado de una interacción compleja entre huésped, patógeno y ambiente, es importante conocer los factores determinantes para la ocurrencia de las mismas, como el momento de la infección inicial, la cantidad de inóculo, el tiempo que demora el hongo en matar al insecto, la velocidad de propagación, entre otros (Inglis *et al.*, 2001). Estos conocimientos pueden constituir una herramienta para potenciar el control de la peste (Charnley, 1997), predecir cuándo va a ocurrir una epizootia e incluso como generarla.

En el período en que se efectuó el estudio si bien los hongos entomopatógenos fueron poco frecuentes pertenecían a distintas especies. Estas mismas especies fúngicas fueron encontradas sobre distintos grupos de insectos en varios departamentos del país. Asi, *B. bassiana* fue encontrada sobre *Phoracantha recurva* y *P. semipunctata* (Sánchez, 2006) y *Lecanicillium* spp. sobre *Trialeurodes vaporariorum*, *Schizaphis graminum* y *Diabrotica speciosa* (Rivas *et al.,* 2013). Es evidente que estas especies entomopatógenas cosmopolitas, con una distribución semejante en los distintos sitios muestreados, lograron infectar a *T. peregrinus,* que es un insecto introducido.

El análisis de agrupamiento mostró que la composición de especies es la misma en los sitios 764 y 765 en Reboledo y 768 y 767 en Rocha. También se puso en evidencia que los sitios 101 y 102 ubicados en Lavalleja son levemente diferentes del resto, probablemente debido al reducido número de insectos encontrados y a la baja frecuencia de individuos infectados. En estos sitios el muestreo se realizó en mayo cuando las temperaturas eran bajas y como mostraron Wilcken *et al*. (2010), cuando ocurren bajas temperaturas la población de estos insectos se reduce

A partir de las características morfológicas no se pudo identificar plenamente los aislamientos de *Beauveria* spp. Rehner *et al.* (2011) realizaron una revisión sobre el género *Beauveria* en la que describieron 6 nuevas especies (*B. asiatica*, *B. australis*, *B. kipukae*, *B. pseudobassiana*, *B. sunguii* y *B. varroae*) en base a un análisis filogenético multilocus. En su trabajo plantean que los caracteres morfológicos no son suficientes para separar las especies de este género de hongos debido a que algunas características como el crecimiento, forma, textura y color de la colonia, la célula conidiógena y la forma y tamaño de los conidios son compartidos entre la mayoría de las especies. Esto concuerda con lo obtenido en este trabajo donde a partir de las características morfológicas los 6 aislamientos obtenidos se identificaron como *B. bassiana s.l.*, mientras que mediante el análisis de la secuencia de la región ITS y del Factor de Elongación 1- alfa, 4 de las cepas se pudieron identificar como *B. pseudobassiana*, siendo el primer registro de esta especie para Uruguay.

Una situación similar se observó con algunas cepas del género *Lecanicillium*, donde morfológicamente no se pudo discriminar entre *L. lecanii* y *L. muscarium*. La identificación de ambas especies se logró mediante el análisis de las secuencias concatenadas de ITS y NADH deshidrogenasa. *L. muscarium* es la primera vez que se detecta en Uruguay. Kouvelis *et al.* (2008) estudiaron 65 cepas de *V. lecanii*, *V. psalliotae* y *Verticillium* spp. provenientes de diferentes regiones geográficas y hospederos y encontraron que la región ITS no era suficiente para discriminar entre las especies de este género de hongos. Sin embargo, cuando utilizaron secuencias de genes mitocondriales como por ejemplo la secuencia que codifica para la enzima NADH deshidrogenasa pudieron resolver algunos

agrupamientos, siendo el gen nad1 el más informativo para los análisis filogenéticos. Estos análisis también permitieron identificar a *P. bulbillosa* y *P. suchlasporia*. Algunas especies pertenecientes al género *Pochonia* antes estaban incluidas dentro de *Verticillium* spp. (Zare *et al.*, 2001). Por lo tanto, en los hongos resulta fundamental realizar la caracterización morfológica en conjunto con la molecular para obtener una correcta identificación de las especies.

Los hongos evaluados presentaron diferencias en cuanto a la virulencia sobre *T. peregrinus*, lo cual refleja diferencias intrínsecas de las cepas como la capacidad de producir enzimas implicadas en el proceso de infección o la capacidad de producción de toxinas, entre otras. Las 6 cepas de *Beauveria* evaluadas resultaron muy virulentas sobre *T. peregrinus* y fueron seleccionadas para los siguientes ensayos. Algo similar fue observado por Ihara *et al.* (2001), en su trabajo evaluaron la patogenicidad y virulencia de 711 aislamientos de hongos entomopatógenos pertenecientes a los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces* sobre *Plautia stali* Scott (Hemiptera: Pentatomidae). Encontraron diferencias en la virulencia tanto entre especies como entre cepas de una misma especie, siendo *Beauveria* spp. y *Metarhizium* spp. los géneros que produjeron mayor mortalidad de *P. stali* en menor tiempo.

Goettel *et al.* (2008) plantearon que las cepas de *Lecanicillium* spp. tienen un gran potencial como agentes de control biológico (ACB) dado que además de controlar algunos insectos, también son eficientes controladores de fitopatógenos y nematodos parásitos de plantas. Sin embargo, en este trabajo la mayoría de las cepas de *Lecanicillium* sp. no resultaron muy virulentas por lo que no fueron seleccionadas. Algunas cepas de *Lecanicillium*, *Pochonia* e *Isaria* presentaron un alto porcentaje de mortalidad al décimo día de inoculadas sobre los individuos. Estas cepas, si bien son virulentas, no fueron seleccionadas por el extenso tiempo requerido para matar a los individuos a la dosis utilizada (1×10^7 esporas/mL). Dado que las cepas fúngicas tienen distinta patogenicidad y virulencia sobre diferentes hospederos, resulta de vital importancia realizar las evaluaciones sobre el insecto que se desea controlar, así como también evaluar la patogenicidad sobre insectos no blanco como pueden ser los enemigos naturales de la

plaga. A su vez, es importante determinar el modo de aplicación del ACB para maximizar el control sobre la especie objetivo y minimizar el impacto sobre otras especies. Por otro lado, las cepas que resultaron poco virulentas frente a *Thaumastocoris* pueden ser eficientes en el control de otras plagas, por lo que sería interesante continuar realizando estudios en este sentido.

Dentro de los factores debidos al huésped que pueden afectar la virulencia se encuentra la edad de los individuos, la diferencia entre machos y hembras y el estadío del insecto. En este trabajo se utilizaron individuos adultos de la misma edad e igual proporción de machos que de hembras. No se observaron diferencias en la virulencia de los hongos entomopatógenos sobre los individuos de diferente sexo, posiblemente debido a que las características morfológicas entre machos y hembras de este insecto son similares (Martínez & Bianchi, 2010) (Datos no mostrados). En cuanto a la susceptibilidad de los distintos estadíos del ciclo de vida de *Thaumastocoris,* Soliman (2014) encontró que hay una gran variación en la eficiencia de los hongos según el estadío. Las ninfas son más sensibles a la infección causada por hongos que los individuos adultos, pero sobre las ninfas se produce una menor cantidad de conidios. Además, cuando las ninfas mudan se puede perder el inóculo generando una barrera a la infección.

En cuanto al efecto de la temperatura sobre la germinación de los conidios se observó que hubo una mayor variabilidad entre cepas de una misma especie que entre especies por lo que no se encontraron preferencias de una especie por una temperatura. Por esta razón, Yeo *et al.* (2003) plantean la necesidad de realizar un perfil de temperaturas para cada aislamiento fúngico y a la vez estudiar la capacidad de infección de las cepas sobre el hospedero a estas temperaturas *in vivo*, de forma de seleccionar cepas para el ambiente en el que se van a utilizar. *Beauveria*, *Isaria* y *Purpureocillium* son hongos mesófilos por lo que es de esperarse que sus conidios tengan buena viabilidad entre 20ºC y 30ºC. Sin embargo, la germinación de las esporas a 20ºC fue más baja que en las otras temperaturas, siendo la cepas de *B. bassiana* (B3) y la cepa de *P. lilacinum* (P2) las que presentaron mayor viabilidad en esta temperatura. La disminución en la viabilidad de

esporas de algunas cepas puede deberse a que se enlentezca la germinación a temperaturas más bajas o a que se inhiba la germinación de los conidios. Nadel *et al.* (2015) en su trabajo sobre dinámicas poblacionales de *T. peregrinus* encontraron que el rango de temperatura que tolera este insecto es entre los 4 y 39ºC, siendo el óptimo para el desarrollo de los huevos a 30ºC. La mayoría de los hongos evaluados presentaron una alta viabilidad de las esporas a esta temperatura (mayor al 70%). Esto es importante si se quiere aplicar el producto formulado con hongos entomopatógenos cuando ocurren los picos poblacionales de la plaga.

En la evaluación del crecimiento y viabilidad de las esporas a distintas actividades hídricas, al igual que con las distintas temperaturas, se observó una gran variabilidad entre las cepas. Las diferencias entre cepas se acentuaron en las actividades hídricas bajas, si bien en todos los aislamientos la viabilidad de los conidios y el crecimiento disminuyó a dichas actividades. Se ha demostrado que la humedad relativa afecta de distinta forma a las especies de hongos entomopatógenos. La humedad relativa ambiente no afecta la capacidad de *B. bassiana* de infectar al hospedero pero si son menores al 97% se reduce la producción de conidios sobre el mismo (Inglis *et al.*, 2001). Por esta razón, resulta necesario evaluar cada asilamiento de forma de seleccionar al que presente las características más adecuadas para su aplicación a campo. Garlet *et al.* (2012) encontraron que altas temperaturas junto con humedad relativa baja favorecen el desarrollo y reproducción de *T. peregrinus*. A su vez, Mascarin *et al.* (2012) asociaron altas temperaturas y altas humedades relativas con una mayor incidencia de hongos entomopatógenos y la consecuente disminución en el tamaño poblacional del insecto. La cepa de *B. bassiana* (B3) y de *P. lilacinum* (P2) fueron las que presentaron mayor viabilidad de las esporas y mayor crecimiento miceliar a *aw* de 0,960 lo que les podría conferir una ventaja, en condiciones ambientales adversas, sobre los otros aislamientos evaluados.

Si bien los hongos entomopatógenos evolucionaron convergentemente y el proceso de infección en términos generales es similar (Ortiz & Keyhani, 2013), existen diferencias entre las especies fúngicas en los mecanismos (como la producción de algunas enzimas) que utilizan para adherirse, penetrar y proliferar dentro de los insectos. Las esterasas y

fosfolipasas, que son importantes factores de virulencia implicados en el reconocimiento y penetración, se encontraron en todas las especies evaluadas. La α-quimiotripsina fue producida en grandes cantidades por los aislamientos seleccionados B3 y P2. Esta proteasa es un factor de virulencia y fue encontrada por Screen & St. Leger (2000) en una cepa de *M. anisopliae*. Se detectó la producción de la enzima quitinolítica N-acétil-β-glucosaminidasa por los aislamientos de *B. bassiana* (B3), *B. pseudobassiana* (B5) e *I. farinosa* (P3). St. Leger *et al*. (1996) también encontraron que *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *M. flavoviride* produjeron esta enzima sobre medio de cultivo que contenía cutícula de insectos. Parece evidente que el éxito de la infección está relacionado con la producción de enzimas extracelulares tal como ha sido propuesto por Khachatourians (1996). Una cepa de *P. lilacinum* (P2) que fue muy virulenta frente a *T. peregrinus* no produjo la enzima N-acétil-β-glucosaminidasa, esto podría indicar que la cepa P2 es capaz de producir otras quitinasas no detectadas con el Kit enzimático utilizado. El método de análisis semicuantitativo API®ZIM no resulta en consecuencia un indicador efectivo de virulencia, ya que una mayor virulencia no se correspondió en todos los casos con una mayor producción de enzimas, debido a que hay otras enzimas involucradas en la degradación de la cutícula que no son detectadas con el Kit.

Las proteasas, quitinasas y glucanasas pueden ser inducidas por sustratos complejos como la cutícula de los insectos, aumentando así la virulencia de los hongos. Por lo tanto, incubar los hongos sobre un medio complejo previo a la producción de esporas para la formulación podría resultar en un aumento de la virulencia en el producto final (Ortiz & Keyhani, 2013).

Las cepas de *B. bassiana* y *P. lilacinum* que resultaron muy virulentas frente a *T. peregrinus* y además presentaron buena viabilidad de los conidios en las condiciones evaluadas serían candidatos a ser seleccionados para la bioproducción. Sin embargo, *P. lilacinum* ha sido detectado causando diversos problemas en humanos por lo que no sería conveniente su uso. Produce infecciones externas, principalmente queratitis ocular pero también es capaz de infectar otras partes del cuerpo (Luangsa-ard *et al.*, 2011).

El TL_{50} de la cepa de *B. bassiana* B3 (5,6 días) fue similar al encontrado por Soliman (2014) (aproximadamente 5 días) para el producto formulado con esta misma especie BIT-Koppert y el BUS-Usina Paulista. Sin embargo, la CL_{50} (2,4 x 10^7esporas/mL) en este trabajo fue superior a la obtenida por Soliman (2014), que fue de 4,2 x 10^6esporas/mL con el producto formulado BIT-Koppert y 1,8 x 10^7esporas/mL con el producto BUS-Usina Paulista.

En la selección de cepas para formular un producto se busca que provoque la muerte del insecto en un tiempo reducido, que produzca muchas esporas y que estas sean estables. En este proceso pueden descartarse cepas que posean características que les confieran una ventaja en la formulación, producción o aplicación a campo y que no han sido consideradas en los pasos de selección.

A lo largo de este trabajo se verificó que la cepa de *B. bassania* B3 es estable, dado que no modificó el crecimiento ni la esporulación, no se alteró la virulencia y las esporas mantuvieron su viabilidad durante las evaluaciones realizadas. Esta cepa fue capaz de producir una gran cantidad de esporas en los medios utilizados. A su vez, las esporas presentaron una alta viabilidad en un amplio rango de temperaturas y actividades hídricas lo cual es importante para la aplicación en campo. Por lo antes mencionado la cepa seleccionada en este trabajo resulta promisoria para desarrollar un producto que sea eficiente en el control de *T. peregrinus*.

VII. CONCLUSIONES

- No se observaron epizootias en el período de evaluación
- Se encontraron 13 especies de hongos entomopatógenos infectando naturalmente a *T. peregrinus* en Uruguay
- Se aislaron e identificaron especies no registradas anteriormente en Uruguay (*B. pseudobassiana* y *L. muscarium*)
- 17 aislamientos fueron capaces de infectar y matar individuos adultos de *T. peregrinus*, presentando diferencias en la virulencia
- Se preseleccionaron y caracterizaron 9 cepas de hongos entomopatógenos y se seleccionó la cepa B3 de *B. bassiana* para realizar estudios de formulación y bioproducción
- Se determinó la CL_{50} y el TL_{50} de la cepa seleccionada
- La cepa de *B. bassiana* B3 fue muy virulenta frente a *T. pergrinus* y además fue estable, produjo una gran cantidad de esporas y presentó una alta viabilidad de las esporas en un rango amplio de temperatura y actividad hídrica

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Agrios G.N. 1988. Plant Pathology. Academic Press, San Diego, CA.

Benítez E. A., Sosa R. & Godziewski D. 2013. Consideraciones sobre dos nuevas plagas del Eucalipto en Paraguay, el psílido de la concha o escudo *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Psyllidae) y la chinche marrón *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). Boletín del Museo Nacional de Historia Natural de Paraguay 17 (1): 72-75.

Carbone I. & Kohn L. M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 91 (3): 553-556.

Carpintero D. L. & Dellapé P. M. 2006. A new species of *Thaumastocoris* Kirkaldy from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae). Zootaxa 1228: 61–68.

Charnley A. K. 1997. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: The Mycota. Environmental and microbial relationships IV. (Wicklow D. T. & Söderström B. Eds.). Springer-Verlag, Germany 12: 185-201.

Finney D. J. 1971. Probit analysis. 3rd ed. Cambridge University Press, London 383.

Galetta M.A., Reina L., Resquin F., Mantero C., González-Pérez J.A., Almendros G., Menéndez M.P. & González-Vila F.J. 2014. Chemometric appraisal of lignin pyrolytic assemblages from *Eucalyptus* woods relevant for pulping in Uruguay. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 109: 296–303.

Garlet J., Correa E., Boscardin J., Nascimento D. & Pedron L. 2012. Fluctuação populacional de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) em plantioclonal de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophyllaem* Alegrete, RS, Brasil. In: Actas del 7mo Congreso de Medio Ambiente, La Plata Argentina.

Gervais P., Molin P., Grajek W. & Bensoussan M. 1988. Influence of water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. Biotechnology and Bioengineering 31: 457-463.

Glass N. L. & Donaldson G. C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology 61: 1323-1330.

González A., Calvo M. V., Cal V., Hernández V., Doño F., Alves L., Gamenara D., Rossini C. & Martínez G. 2012. A male aggregation pheromone in the bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus* (Thaumastocoridae). Psyche 2012: 1-7.

Goettel M. S., Koike M., Kim J. J., Aiuchi D., Shinya R. & Brodeur J. 2008. Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. Journal of Invertebrate Pathology 98: 256–261.

Hammer O., Harper D. A. T. & Ryan P. D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Paleontología Electronica, version 2.17.

http://www.statgraphics.net/descargas-centurion-xvii/

http://www.uruguayxxi.gub.uy/inversiones/wp-content/uploads/sites/3/2014/09/Sector-Forestal-Uruguay-XXI-2014.pdf

Ide S., Ruiz C., Sandoval A. & Valenzuela J. 2011. Detection of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) associated to *Eucalyptus* spp. in Chile. BOSQUE 32 (3): 309-313.

Ihara F., Yaginuma K., Kobayashi N., Mishiro K. & Sato T. 2001. Screening of entomopathogenic fungi againts the brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott (Hemiptera: Pentatomidae). Applied Entomology and Zoology 36 (4): 495-500.

Inglis G. D., Goettel M. S., Butt T. M & Strasser H. 2001. Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Fungi as biocontrol agents. Progress, problems and potential. (Butt T M., Jackson C. W. & Magan N. Eds.). CABI Publishing, USA 3: 23-69.

Jacobs D. H. & Neser S. 2005. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Heteroptera: Thaumastocoridae): a new insect arrival in South Africa, damaging to *Eucalyptus* trees. South African Journal of Science 101: 233-236.

Khachatourians G. G. 1996. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In: Mycota VI. Human and animal relationships. (Howard D. H. & Miller J. D. Eds.). Springer, Heidelberg: 331-363.

Khan S., Guo L., Maimaiti Y., Mijit M. & Qiu D. 2012. Entomopathogenic Fungi as Microbial Biocontrol Agent. Molecular Plant Breeding 3 (7): 63-79.

Kouvelis V. N., Ghikas D.V. & Typas M. A. 2004. The analysis of the complete mitochondrial genome of *Lecanicillium muscarium* (synonym *Verticillium lecanii*) suggests a minimum common gene organization in mtDNAs of Sordariomycetes: phylogenetic implications. Fungal Genetics and Biology 41: 930–940.

Kouvelis V. N., Sialakouma A. & Typas M. A. 2008. Mitochondrial gene sequences alone or combined with ITS region sequences provide firm molecular criteria for the classification of *Lecanicillium* species. Mycological Research 112: 829-844.

Laudonia S. & Sasso R. 2012. The bronze bug *Thaumastocoris peregrinus*: a new insect recorded in Italy, damaging to *Eucalyptus* trees. Bulletin of Insectology 65 (1): 89-93.

Lee S. & Taylor J. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. (Innis M. A., Gelfand D. H., Snindky J. J. & White T. J. Eds.). Academic Press, San Diego, California 282-287.

Lin N. Q., Huber J. T. & LaSalle J. 2007. The Australian genera of Mymaridae (Hymenoptera: Chalcidoidea). Zootaxa 1596: 1-111.

Locatelli T., Gardiner B., Tarantola S., Nicoll B., Bonnefond J. M., Garrigou D., Kamimura K. & Patenaude G. 2016. Modelling wind risk to *Eucalyptus globulus* (Labill.) stands. Forest Ecology and Management 365: 159-173.

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.

Martínez G., Simeto S. & Balmelli G. 2009. La chinche del Eucalipto en Uruguay: Panorama de la Investigación a un Año de su Detección Oficial. Revista INIA 18: 33-35.

Martínez G. & Bianchi M. 2010. Primer registro para Uruguay de la chinche del eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Dellappé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae). Agrociencia XIV (1): 15-18.

Martínez G. & Scoz R. 2012. INIA diseñó un sistema exitoso para la producción de huevos de la chinche del eucalipto. Revista INIA 29: 43-46.

Mascarin G. M., da Silveira V., Mendes M. & Delalibera Jr. I. 2012. Natural occurrence of *Zoophthora radicans* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) on *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae), an invasive pest recently found in Brazil. Journal of Invertebrate Pathology 110: 401–404.

Moio S. G. 2015. Identificação, caracterização e avaliação da patogenicidade de diferentes isolados de *Fusarium* spp. para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas), Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, Brasi.

Nadel R. L., Slippers B., Scholes M. C., Lawson S. A., Noack A. E., Wilcken C. F., Bouvet J. P. & Wingfield M. J. 2010. DNA bar-coding reveals source and patterns of *Thaumastocoris peregrinus* invasions in South Africa and South America. Biological Invasions 12: 1067-1077.

Nadel R. L., Wingfield M. J., Scholes M. C., Garnas J. R., Lawson S. A. & Slippers B. 2015. Population dynamics of *Thaumastocoris peregrinus* in *Eucalyptus* plantations of South Africa. Journal of Pest Science 88: 97-106.

Noack A. E. & Coviella C. E. 2006. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Hemiptera: Thaumastocoridae): first record of this invasive pest of *Eucalyptus* in the Americas. General and Applied Entomology 35: 13-15.

O`Donnell K. & Cigelnik E. 1997. Two different intragenomics rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus Fusarium are nonorthologous. Molecular Phylogenetics Evolution 7: 103-116.

Ortiz A. & Keyhani N. O. 2013. Action on the surface: entomopathogenic fungi *versus* the insect cuticle. Insects 4: 357-374.

Pirralho M., Flores D., Sousa V. B., Quilhó T., Knapic S. & Pereira H. 2014. Evaluation on paper making potential of nine *Eucalyptus* species based on wood anatomical features. Industrial Crops and Products 54: 327-334.

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.

Rivas F., Nuñez P., Jackson T. & Altier N. 2013. Effect of temperature and water activity on mycelia radial growth, conidial production and germination of *Lecanicillium* spp. isolates and their virulence against *Trialeurodes vaporariorum* on tomato plants. Biological Control. DOI 10.1007/s10526-013-9542-y.

Saavedra M.C., Withers T. M. & Holwell G. I. 2015. Susceptibility of four *Eucalyptus* host species for the development of *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae). Forest Ecology and Management 336: 210-216.

San Román M. L. 2012. Caracterização e patogenicidade de fungos entomopatogênicos isolados do percevejo-bronzeado do eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas), Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista– Campus de Botucatu, Brasil.

Sánchez A. 2006. Selección y caracterización de cepas fúngicas para el biocontrol de *Phoracantha recurva* Newman, 1840 (Coleoptera: Cerambycidae) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de Maestría en Biología opción Botánica, Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA), Facultad de Ciencias, Uruguay.

Santadino M. V., Riquelme M. B. & Coviella C. E. 2013. First record of native predators on the invasive species *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) in *Eucalyptus* in Argentina. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina 72 (3-4): 219-222.

Savaris M., Lampert S., Valle da Silva P. R & Salvadori J. R. 2011. First record of *Thaumastocoris peregrinus* for the state of Santa Catarina, and new areas of occurrence for the Rio Grande do Sul, Brazil. Ciencia Rural, Santa Maria 41 (11): 1874-1876.

Screen S. E. & St. Leger R. J. 2000. Cloning, expression and substrate specificity of a fungal chymotrypsin. Journal of Biological Chemistry 275: 6689-6694.

Soliman E. P. 2014. Controle biológico de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) com fungos entomopatogênicos. Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas), Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista– Campus de Botucatu, Brasil.

Souza G. K., Pikart T., Pikart F., Serrao J., Wilcken C. & Zanuncio J. C. 2012. First record of the native Heteropteran preying on the introduced *Eucalyptus* pest, *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), in Brazil. Florida Entomologist 95 (2): 517-520.

St Leger R. J., Joshi L., Bidochka M. J. & Roberts D.W. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America 93: 6349-6354.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. & Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30 (12): 2725–2729.

Taylor L. R. 1961. Aggregation, variance and the mean. Nature 189: 732–735.

Thompson J. D., Higgins D. G. & Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22: 4673-4680.

Van Driesche R. G. & Bellows T. S. 1996. Biological Control. Chapman & Hall, New York 539.

Vega F. E., Goettel M. S., Blackwell M., Chandler D., Jackson M. A., Keller S., Koike M., Maniania N. K., Monzón A., Ownley B. H., Pell J. K., Rangel D. E. N. & Roy H. E. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. Fungal Ecology 2: 149-159.

Verma M., Brar S. K., Tyagi R. D., Surampalli R. Y. & Valéro J.R. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal 37: 1-20.

White T. J., Burns T., Lee S. & Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. (Innis M. A., Gelfand D. H., Snindky J. J. & White T. J. Eds.). Academic Press, Inc.: New York 315-322.

Wilcken C. F., Soliman E. P., Nogueira de Sá L. A., Rodrigues L., Ribeiro T. K., Ferreira-Filho P. J. & Rodrigues R. J. 2010. Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on *Eucalyptus* in Brazil and its distribution. Journal of Plant Protection Research 50 (2).

Wingfield M. J., Roux J., Slippers B., Hurley B. P., Garnas J., Myburg A. A., Wingfield B. D. 2013. Established and new technologies reduce increasing pest and pathogen threats to Eucalypt plantations. Forest Ecology and Management 301: 35–42.

Yeo H., Pell J. K., Alderson P. G., Clark S. J. & Pye B. J. 2003. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. Pest Management Science 59:156–165.

Zare R., Gams W. & Evans H. C. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata.* V. The genus *Pochonia,* with notes on *Rotiferophthora.* Nova Hedwigia 72: 51- 86.

IX. ANEXOS

ANEXO IX. 1. Medios de cultivo

Agar malta (MEA)

- 20 g agar
- 20 g malta
- 1 L agua destilada

Papa-dextrosa-agar (PDA)

- 250 g de papa blanca hervida
- 20 g agar
- 20 g dextrosa
- 1 L agua destilada

Papa-dextrosa (PDB)

- 250 g de papa blanca hervida
- 20 g dextrosa
- 1 L agua destilada

ANEXO IX. 2. Método de extracción de ADN

Se raspó el micelio con bisturí estéril y se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se agregaron 400 µl de buffer de lisis (Tris HCl 50mM pH 8, $EDTANa_2$ 50 mM, SDS 0,3% y 5 µl de proteinasa K 2% (p/v)). Se realizó la lisis mecánica con un machacador plástico estéril. La muestra se incubó a 60 ˚C durante 30 minutos. Se agregaron 112 µl de NaCl 5M y 52 µl de CTAB 10X (CTAB 10% (p/v), Tris HCl 100 mM pH 8, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, β-mercaptoetanol 0,2% (v/v)). Se incubó 10 minutos a 65 ˚C. Se agregaron 570 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1, v/v), se agitó enérgicamente y se incubó a -20 ˚C durante 30 minutos. Se centrifugó 10 minutos a 10.000 RPM, se transfirieron 400-500 µl de sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5mL y se agregaron 20 µl de acetato de sodio 3M. Se incubó 30 minutos a -20 ˚C. Luego se centrifugó 10 minutos a 10.000 RPM. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo

Eppendorf de 1,5mL y se agregaron 0,55 volúmenes de isopropanol. Se agitó suavemente, se incubó 30 minutos a -20 °C y se centrifugó 5 minutos a 10.000 RPM. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 200 µl de etanol 70% (v/v). Se centrifugó 5 minutos a 10.000 RPM. Se descartó el etanol y se dejó secar el pellet. Luego se resuspendió el pellet en 50-100 µl de agua mQ a 60 °C, se agregó 1 µl de RNAsa 5µg/mL y se incubó 60 minutos a 37°C. Se almacenó a -20°C.

ANEXO IX. 3. Transformación de Taylor

$F(x) = a \int \dot{X}^{-b/2} d\dot{X}$

$Z = \dot{X}^{p}$ entonces $p = 1 - 1/2b$

Tabla 12. Transformación correspondiente a cada valor de p

Valor de p	Transformación
0	Log (X_{ij} +1) o log (X_{ij})
0,5	$\sqrt{X_{ij}}$
-0,5	$1/\sqrt{X_{ij}}$
-1	$1/X_{ij}$

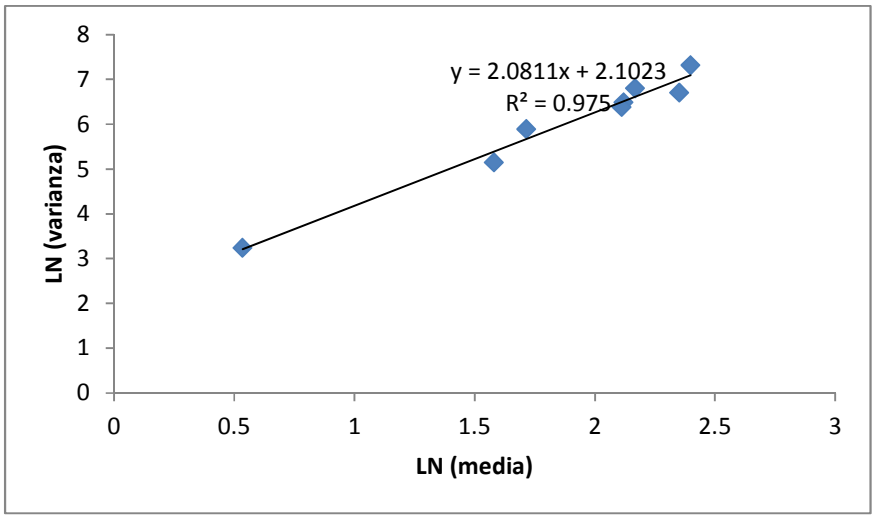


Figura 23. Logaritmo de la varianza en función del logaritmo de la media del número de aislamientos encontrados en cada sitio de muestreo

ANEXO IX. 4. Análisis de la composición fúngica en los distintos sitios de muestreo

Test de normalidad

	M
N	144
Shapiro-Wilk W	0.8547
p(normal)	1.33E-10

Test de homogeneidad

One-way ANOVA

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p(same)
Between groups:	3.03432	7	0.433474	1.196	0.3091
Within groups:	49.2838	136	0.362381		
Total:	52.3181	143			
omega^2:	0.009447				

Levene's test for homogeneity of variance, based on means: p(same) =	0.7683
Based on medians: p(same) =	0.9603
Welch F test in the case of unequal variances:	F=1.54, df=58.14, p=0.1721

Test de Tukey

Tukey's pairwise comparisons: Q below diagonal, p(same) above diagonal

Sitios	764	765	766	767	768	101	102	103
764		0.9999	1	0.9996	0.9443	1	0.996	0.8726
765	0.5541		0.9991	1	0.9949	1	0.9518	0.6485
766	0.2605	0.8146		0.997	0.8839	1	0.9994	0.9372
767	0.7291	0.175	0.9896		0.9983	0.9997	0.9175	0.5634
768	1.634	1.079	1.894	0.9045		0.9502	0.5596	0.1862
101	0.0343	0.5198	0.2948	0.6948	1.599		0.9952	0.8619
102	1.036	1.59	0.775	1.765	2.669	1.07		0.9984
103	1.932	2.487	1.672	2.662	3.566	1.967	0.8969	

Análisis de correspondencia

Componente	Autovalor	% varianza
1	0.106137	37.058
2	0.0515506	17.999
3	0.0409487	14.297
4	0.0310764	10.85
5	0.0274998	9.6015
6	0.0191147	6.6739
7	0.0100837	3.5207

	Eje 1	Eje 2	Eje 3	Eje 4	Eje 5	Eje 6	Eje 7
764	0.2069	0.10861	-0.14699	-0.38671	0.044685	-0.01973	-0.093612
765	0.45856	-0.089459	-0.032442	0.12986	-0.2963	-0.029255	-0.026427
766	0.28797	-0.13467	0.37794	0.056811	0.24505	-0.092789	-0.031458
767	0.039821	-0.24133	-0.22338	0.0038858	0.11622	0.036564	0.16917
768	-0.3731	0.14048	-0.10625	0.11242	0.0074462	-0.20881	-0.023838
101	-0.50892	-0.28853	0.1069	-0.036393	-0.087896	0.16334	-0.09073
102	-0.13195	0.38073	0.29678	-0.11446	-0.14072	0.07997	0.17156
103	0.16217	0.38977	-0.17168	0.292	0.20103	0.29914	-0.092871
1	-0.095513	0.17741	-0.048083	-0.042776	0.22661	-0.10048	-0.051244
2	0.11968	-0.025866	0.048091	0.0077336	0.20833	-0.016081	-0.078695
3	0.034323	0.06825	0.057137	-0.054851	-0.040055	0.076961	0.059619
4	-0.88894	-0.78682	-0.26567	0.04142	0.020863	0.27736	0.13647
5	0.091793	0.090614	0.087487	-0.008798	0.024835	0.087576	0.00075563
6	0.10824	0.13982	0.031824	-0.15727	-0.12943	0.04133	-0.019733
7	0.1395	0.054538	-0.62819	-0.3388	-0.11367	-0.49656	-0.083618
8	-0.98875	-0.13548	0.055729	0.049685	-0.19178	0.011919	0.11199
9	0.047036	0.54691	-0.37918	0.29428	-0.076845	-0.012574	-0.0040744
10	0.033676	-0.036223	-0.48537	0.22948	-0.16555	0.020694	-0.12715
11	-0.059172	-0.050689	0.16107	-0.037842	-0.08774	0.056364	0.02877
12	0.43701	-0.17258	0.14735	-0.024427	0.10338	-0.31754	0.20984
13	1.013	-0.58332	0.076204	0.48079	-0.53222	-0.20799	0.15074
14	-0.15718	-0.52796	0.60198	0.30135	-0.0464	-0.17663	-0.46986
15	0.34771	-0.42554	-0.38318	-0.49089	-0.43213	0.17106	-0.21538
16	-0.3939	-0.44362	-0.25299	-0.21697	0.28164	-0.084822	0.060033
17	-1.0993	0.33439	0.18696	0.1334	-0.30221	-0.33424	0.00040403
18	0.035296	-0.10515	-0.29668	0.54078	0.18481	0.12617	0.035519

ANEXO IX. 5. Análisis de los géneros de hongos entomopatógenos en los distintos sitios de muestreo

Test de normalidad

	I
N	35
Shapiro-Wilk W	0.8358
p(normal)	0.0001116

Test de homogeneidad

One-way ANOVA

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p(same)
Between groups:	0.343132	6	0.0571886	1.015	0.436
Within groups:	1.57825	28	0.056366		
Total:	1.92E+00	34			
omega^2:	0.002495				

Levene's test for homogeneity of variance, based on means: p(same) = 0.7325

Based on medians: p(same) = 0.970

Welch F test in the case of unequal variances: F=0.8123, df=12.39, p=0.5796

Test de Tukey

Tukey's pairwise comparisons: Q below diagonal, p(same) above diagonal

Sitios	764	765	767	768	101	102	103
764		0.9996	0.995	0.7774	1	0.995	0.9996
765	0.567		1	0.9409	0.995	0.9409	0.9829
767	0.8987	0.3317		0.9829	0.9742	0.8592	0.9409
768	2.033	1.466	1.134		0.6391	0.395	0.535
101	0.3317	0.8987	1.23	2.365		0.9996	1
102	0.8987	1.466	1.797	2.932	0.567		1
103	0.567	1.134	1.466	2.6	0.2353	0.3317	

ANEXO IX. 6. Análisis del efecto de la temperatura sobre la viabilidad de las esporas

Análisis de Kruskal-Wallis para cada cepa

Cepa: B1 p (K-W)=0.0019

Mann-Whitney pairwise comparisons

Temperatura (°C)	20	25	30
20		0.01219	0.01219
25	0.03656		0.01219
30	0.03656	0.03656	

Cepa: B2 p (K-W)=0.115

Mann-Whitney pairwise comparisons

Temperatura (°C)	20	25	30
20	0	0.8852	0.0294
25	1	0	0.3094
30	0.0882	0.9283	0

Cepa: B3 p(K-W)=0.304

Mann-Whitney pairwise comparisons

Temperatura (°C)	20	25	30
20		0.2187	0.8839
25	0.6562		0.2703
30	1	0.811	

Cepa: B4 p (K-W)=0.037

Mann-Whitney pairwise comparisons

Temperatura (°C)	20	25	30
20		0.03689	0.03689
25	0.1107		0.6761
30	0.1107	1	

Cepa: B5 p (K-W)=0.0145

Mann-Whitney pairwise comparisons

Temperatura (°C)	20	25	30
20		0.01996	0.01996
25	0.05989		0.4034
30	0.05989	1	

Cepa: B6 p (K-W)=0.0183

Mann-Whitney pairwise comparisons

Temperatura (°C)	20	25	30
20		0.01996	0.01996
25	0.05989		1
30	0.05989	1	

Cepa: P2 p (K-W)=0.005

Mann-Whitney pairwise comparisons

Temperatura (°C)	20	25	30
20		0.07201	0.01945
25	0.216		0.0108
30	0.05835	0.0324	

Cepa: P3 p (K-W)=0.0111

Mann-Whitney pairwise comparisons

Temperatura (°C)	20	25	30
20		0.06619	0.03038
25	0.1986		0.03734
30	0.09115	0.112	

Cepa: P4 p (K-W)=0.005

Mann-Whitney pairwise comparisons

Temperatura (°C)	20	25	30
20		0.01193	0.03689
25	0.03578		0.03577
30	0.1107	0.1073	

Análisis de Kruskal-Wallis entre cepas y para cada temperatura

Temperatura:
20°C

p (K-W)=2.88 E-5

Mann-Whitney pairwise comparisons

Cepa	B1	B2	B3	B4	B5	B6	P2	P3	P4
B1		0.03734	0.01996	0.551	0.01996	0.01996	0.01193	0.01996	0.01219
B2	1		0.03038	0.5959	0.03038	0.03038	0.01945	0.0606	0.01996
B3	0.7187	1		0.05183	0.03038	0.03038	0.5334	0.03038	0.2703
B4	1	1	1		0.05183	0.05183	0.03577	0.1116	0.03689
B5	0.7187	1	1	1		0.03038	0.01945	0.03038	0.01996
B6	0.7187	1	1	1	1		0.01945	0.3123	0.01996
P2	0.4293	0.7002	1	1	0.7002	0.7002		0.01945	0.01193
P3	0.7187	1	1	1	1	1	0.7002		0.01996
P4	0.4387	0.7187	1	1	0.7187	0.7187	0.4293	0.7187	

Temperatura:
25°C

p (K-W)=5.18 E-6

Mann-Whitney pairwise comparisons

Cepa	B1	B2	B3	B4	B5	B6	P2	P3	P4
B1		0.01996	0.2963	0.03671	0.01219	0.01219	0.007495	0.01219	0.01193
B2	0.7187		0.03734	0.06619	0.9025	0.5403	0.0108	0.9025	0.01945
B3	1	1		0.2963	0.01219	0.01219	0.007495	0.01219	0.01193
B4	1	1	1		0.01219	0.01219	0.007495	0.01219	0.01193
B5	0.4387	1	0.4387	0.4387		0.2963	0.007495	0.0601	0.01193
B6	0.4387	1	0.4387	0.4387	1		0.007495	0.01219	0.01193
P2	0.2698	0.3888	0.2698	0.2698	0.2698	0.2698		0.007495	0.07201
P3	0.4387	1	0.4387	0.4387	1	0.4387	0.2698		0.01193
P4	0.4293	0.7002	0.4293	0.4293	0.4293	0.4293	1	0.4293	

Temperatura: 30°C

p (K-W)=0.00014

Mann-Whitney pairwise comparisons

Cepa	B1	B2	B3	B4	B5	B6	P2	P3	P4
B1		0.01945	0.03734	0.1437	0.01219	0.02157	0.9025	0.01996	0.03689
B2	0.7002		0.0294	0.01945	0.01945	0.01945	0.0294	0.0294	0.04975
B3	1	1		0.1113	0.01996	0.01996	0.1124	0.03038	0.05183
B4	1	0.7002	1		0.01219	0.01219	0.5403	0.01996	0.03689
B5	0.4387	0.7002	0.7187	0.4387		0.5309	0.2703	0.7133	0.03689
B6	0.7766	0.7002	0.7187	0.4387	1		0.5403	0.9025	0.03689
P2	1	1	1	1	1	1		0.4705	0.05183
P3	0.7187	1	1	0.7187	1	1	1		0.05183
P4	1	1	1	1	1	1	1	1	

ANEXO IX. 7. Análisis del efecto de la actividad hídrica sobre la viabilidad de las esporas

Análisis de Kruskal-Wallis para cada cepa

Cepa: B1 p (K-W)=0.00016

Mann-Whitney pairwise comparisons

A_w	0.995	0.990	0.980	0.970	0.960
0.995		0.09469	0.01219	0.01219	0.01219
0.990	0.9469		0.01219	0.01219	0.01219
0.980	0.1219	0.1219		0.01219	0.01219
0.970	0.1219	0.1219	0.1219		0.01219
0.960	0.1219	0.1219	0.1219	0.1219	

Cepa: B2 p (K-W)=0.00019

Mann-Whitney pairwise comparisons

A_w	0.995	0.990	0.980	0.970	0.960
0.995		0.01219	0.01219	0.01996	0.01219
0.990	0.1219		0.01219	0.01996	0.01219
0.980	0.1219	0.1219		0.01996	0.01219
0.970	0.1996	0.1996	0.1996		0.01996
0.960	0.1219	0.1219	0.1219	0.1996	

Cepa: B3 p (K-W)=0.00025

Mann-Whitney pairwise comparisons

A_w	0.995	0.990	0.980	0.970	0.960
0.995		0.007495	0.8345	0.01219	0.01219
0.990	0.07495		0.02537	0.007495	0.007495
0.980	1	0.2537		0.01219	0.01219
0.970	0.1219	0.07495	0.1219		0.01219
0.960	0.1219	0.07495	0.1219	0.1219	

Cepa: B4 p (K-W)=0.00013

Mann-Whitney pairwise comparisons

A_w	0.995	0.990	0.980	0.970	0.960
0.995		0.03671	0.01219	0.01219	0.007495
0.990	0.3671		0.01219	0.01219	0.007495
0.980	0.1219	0.1219		0.01219	0.007495
0.970	0.1219	0.1219	0.1219		0.007495
0.960	0.07495	0.07495	0.07495	0.07495	

Cepa: B5 p (K-W)=0.00021

Mann-Whitney pairwise comparisons

A_W	0.995	0.990	0.980	0.970	0.960
0.995		1	0.01219	0.01219	0.01219
0.990	1		0.01219	0.01219	0.01219
0.980	0.1219	0.1219		0.01219	0.01219
0.970	0.1219	0.1219	0.1219		0.01219
0.960	0.1219	0.1219	0.1219	0.1219	

Cepa: B6 p (K-W)=0.00014

Mann-Whitney pairwise comparisons

A_W	0.995	0.990	0.980	0.970	0.960
0.995		0.04491	0.009701	0.009701	0.007495
0.990	0.4491		0.01219	0.01219	0.009701
0.980	0.09701	0.1219		0.01219	0.009701
0.970	0.09701	0.1219	0.1219		0.009701
0.960	0.07495	0.09701	0.09701	0.09701	

Cepa: P2 p (K-W)=0.00028

Mann-Whitney pairwise comparisons

A_W	0.995	0.990	0.980	0.970	0.960
0.995		0.4237	0.6005	0.009701	0.009701
0.990	1		0.177	0.007495	0.007495
0.980	1	1		0.01091	0.01091
0.970	0.09701	0.07495	0.1091		0.01219
0.960	0.09701	0.07495	0.1091	0.1219	

Cepa: P3 p (K-W)=0.0008

Mann-Whitney pairwise comparisons

A_W	0.995	0.990	0.980	0.970	0.960
0.995		0.6761	0.4034	0.01219	0.01193
0.990	1		0.4034	0.01219	0.01193
0.980	1	1		0.01219	0.01193
0.970	0.1219	0.1219	0.1219		0.01193
0.960	0.1193	0.1193	0.1193	0.1193	

Cepa: P4 p (K-W)=0.00012

Mann-Whitney pairwise comparisons

A_w	0.995	0.990	0.980	0.970	0.960
0.995		0.4237	0.009701	0.009701	0.007495
0.990	1		0.007495	0.007495	0.005584
0.980	0.09701	0.07495		0.01219	0.009701
0.970	0.09701	0.07495	0.1219		0.009701
0.960	0.07495	0.05584	0.09701	0.09701	

Análisis de Kruskal-Wallis entre cepas y para cada actividad hídrica

A_W=0.995 p (K-W)=4.86E-5

Mann-Whitney pairwise comparisons

Cepa	B1	B2	B3	B4	B5	B6	P2	P3	P4
B1		0.2101	0.0601	0.03671	0.6761	0.009701	0.009701	0.4034	0.01775
B2	1		0.5309	0.01219	0.1437	0.03114	0.03114	0.9166	0.03114
B3	1	1		0.01219	0.09469	0.05241	0.05241	0.2101	0.05241
B4	1	0.4387	0.4387		0.4034	0.009701	0.009701	0.01219	0.009701
B5	1	1	1	1		0.009701	0.009701	0.1437	0.01775
B6	0.3492	1	1	0.3492	0.3492		1	0.009701	1
P2	0.3492	1	1	0.3492	0.3492	1		0.009701	1
P3	1	1	1	0.4387	1	0.3492	0.3492		0.009701
P4	0.639	1	1	0.3492	0.639	1	1	0.3492	

A_W=0.990 p (K-W)=1.046E-5

Mann-Whitney pairwise comparisons

Cepa	B1	B2	B3	B4	B5	B6	P2	P3	P4
B1		0.02157	0.007495	0.09469	0.6761	0.09469	0.007495	0.0601	0.007495
B2	0.7766		0.007495	0.01219	0.02157	0.01219	0.007495	0.01219	0.007495
B3	0.2698	0.2698		0.007495	0.007495	0.02537	1	0.007495	1
B4	1	0.4387	0.2698		0.4034	0.4034	0.007495	0.5309	0.007495
B5	1	0.7766	0.2698	1		0.09469	0.007495	0.2101	0.007495
B6	1	0.4387	0.9133	1	1		0.02537	0.8345	0.02537
P2	0.2698	0.2698	1	0.2698	0.2698	0.9133		0.007495	1
P3	1	0.4387	0.2698	1	1	1	0.2698		0.007495
P4	0.2698	0.2698	1	0.2698	0.2698	0.9133	1	0.2698	

p (K-W)=3.022E-6

A_W=0.980

Mann-Whitney pairwise comparisons

Cepa	B1	B2	B3	B4	B5	B6	P2	P3	P4
B1		0.01219	0.01219	1	0.03671	0.4034	0.01091	0.01219	0.02157
B2	0.4387		0.01219	0.01219	0.01219	0.01219	0.01091	0.01219	0.01219
B3	0.4387	0.4387		0.01219	0.01219	0.01219	0.1599	0.09469	0.02157
B4	1	0.4387	0.4387		0.03671	0.6761	0.01091	0.01219	0.01219
B5	1	0.4387	0.4387	1		0.02157	0.01091	0.01219	0.01219
B6	1	0.4387	0.4387	1	0.7766		0.01091	0.01219	0.0601
P2	0.3927	0.3927	1	0.3927	0.3927	0.3927		0.03389	0.01091
P3	0.4387	0.4387	1	0.4387	0.4387	0.4387	1		0.09469
P4	0.7766	0.4387	0.7766	0.4387	0.4387	1	0.3927	1	

p (K-W)=2.897E-6

A_W=0.970

Mann-Whitney pairwise comparisons

Cepa	B1	B2	B3	B4	B5	B6	P2	P3	P4
B1		0.01996	0.01219	1	0.01219	0.01219	0.01219	0.02157	0.01219
B2	0.7187		0.01996	0.01996	0.1113	0.01996	0.01996	0.01996	0.01996
B3	0.4387	0.7187		0.01219	0.01219	0.01219	0.01219	0.01219	0.01219
B4	1	0.7187	0.4387		0.01219	0.02157	0.01219	0.01219	0.01219
B5	0.4387	1	0.4387	0.4387		0.5309	0.01219	0.01219	0.4034
B6	0.4387	0.7187	0.4387	0.7766	1		0.01219	0.01219	0.6761
P2	0.4387	0.7187	0.4387	0.4387	0.4387	0.4387		0.01219	0.01219
P3	0.7766	0.7187	0.4387	0.4387	0.4387	0.4387	0.4387		0.01219
P4	0.4387	0.7187	0.4387	0.4387	1	1	0.4387	0.4387	

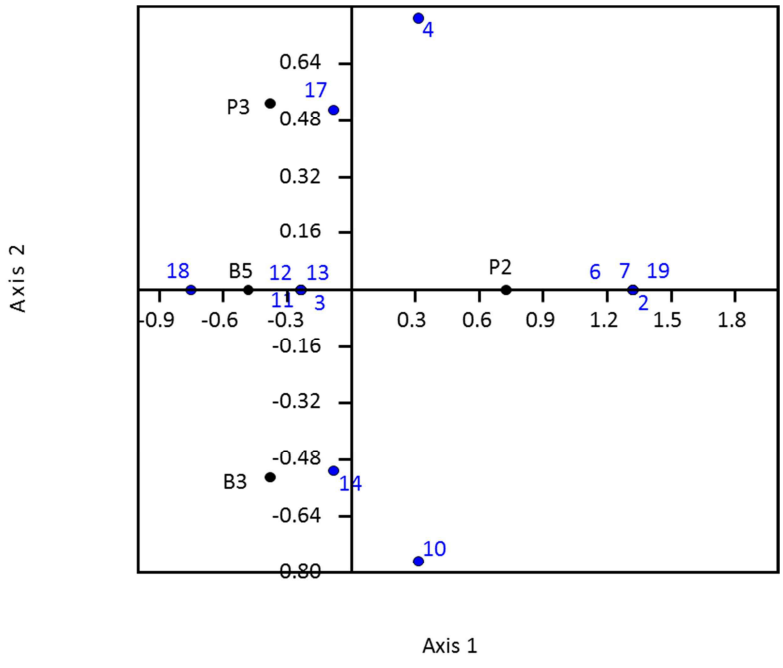
A_W=0.960	p (K-W)=1.741E-5

Mann-Whitney pairwise comparisons

Cepa	B1	B2	B3	B4	B5	B6	P2	P3	P4
B1		0.09469	0.01219	0.007495	0.6761	0.009701	0.01219	0.2948	0.009701
B2	1		0.01219	0.02537	0.6761	0.07464	0.01219	0.8325	0.04491
B3	0.4387	0.4387		0.007495	0.01219	0.009701	0.01219	0.01193	0.009701
B4	0.2698	0.9133	0.2698		0.007495	0.4237	0.007495	0.07201	0.4237
B5	1	1	0.4387	0.2698		0.03114	0.01219	0.2948	0.01775
B6	0.3492	1	0.3492	1	1		0.009701	0.2393	1
P2	0.4387	0.4387	0.4387	0.2698	0.4387	0.3492		0.01193	0.009701
P3	1	1	0.4293	1	1	1	0.4293		0.2393
P4	0.3492	1	0.3492	1	0.639	1	0.3492	1	

ANEXO IX. 8. Análisis de la producción enzimática de las distintas especies de hongos entomopatógenos

PC	Eigenvalue	% variance
1	0.302903	65.803
2	0.119048	25.862
3	0.0383664	8.3348



	Axis 1	Axis 2	Axis 3
B3	-0.38059	-0.52973	-0.18363
B5	-0.48382	3.15E-17	0.33594
P2	0.72625	-9.01E-18	1.83E-02
P3	-0.38059	0.52973	-1.84E-01
2	1.3196	4.81E-18	9.33E-02
3	-0.23564	7.67E-17	-1.67E-02
4	0.31403	0.76765	-4.22E-01
6	1.3196	4.81E-18	9.33E-02
7	1.3196	4.81E-18	9.33E-02
10	0.31403	-0.76765	-0.4221
11	-0.23564	7.67E-17	-1.67E-02
12	-0.23564	7.67E-17	-1.67E-02
13	-0.23564	7.67E-17	-1.67E-02
14	-0.08368	-0.51177	2.90E-01
17	-0.08368	0.51177	0.29029
18	-0.75405	1.02E-16	-5.33E-02
19	1.3196	4.81E-18	9.33E-02

ANEXO IX. 9. Evaluación de la CL_{50}

Análisis Probit - Muertos/Expuestos

Variable dependiente: Muertos/Expuestos

Tamaños de muestra: Expuestos

Factores: Concentración

Número de observaciones: 15

Modelo Estimado de Regresión (Mínimos Cuadrados Ponderados)

		Error	*Estadístico*	
Parámetro	*Estimado*	*Estándar*	*T*	*Valor-P*
CONSTANTE	-0.449393	0.212592	-2.11387	0.0345
Concentración	1.83761E-8	5.4342E-9	3.38156	0.0007

Análisis de Varianza

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Modelo	32.8535	1	32.8535	11.43	0.0049
Residuo	37.3499	13	2.87307		
Total (Corr.)	70.2033	14			

R-Cuadrada = 46.7976 porciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 42.7051 porciento

Error estándar del est. = 1.69501

Error medio absoluto = 0.581339

Estadístico Durbin-Watson = 1.70025

Autocorrelación residual de retardo 1 = 0.115315

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Concentración	32.8535	1	32.8535	11.43	0.0049
Residuo	37.3499	13	2.87307		

Análisis de Residuos

	Estimación	*Validación*
n	15	
CME	2.87307	
MAE	0.581339	
MAPE	349.084	
ME	-4.34236E-17	
MPE	-268.603	

El StatAdvisor

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo de regresión probit para describir la relación entre Muertos/Expuestos y 1 variable(s) independiente(s). La ecuación del modelo ajustado es:

Muertos/Expuestos = normal(eta), en donde eta = -0.449393 + 1.83761E-8*Concentración

Como el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 46.7976% de la variabilidad en Muertos/Expuestos. El estadístico R-Cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes es 42.7051%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 1.69501. Este valor puede utilizarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones seleccionando la opción de Pronósticos del menú de texto. El error absoluto medio (MAE) de

0.581339 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentaron en su archivo de datos.

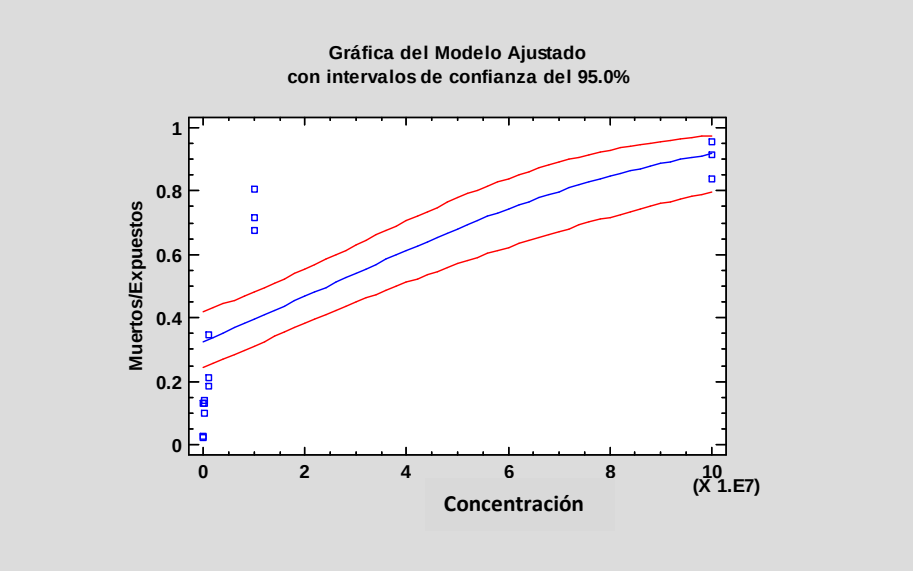
Para determinar si el modelo puede ser simplificado, note que el valor-P más alto para la suma de cuadrados Tipo III es 0.0049, que pertenece a Concentración. Como el valor-P es menor que 0.05, ese término es estadísticamente significativo al nivel de confianza del 95.0%. Consecuentemente, usted probablemente no quisiera eliminar ninguna variable del modelo.

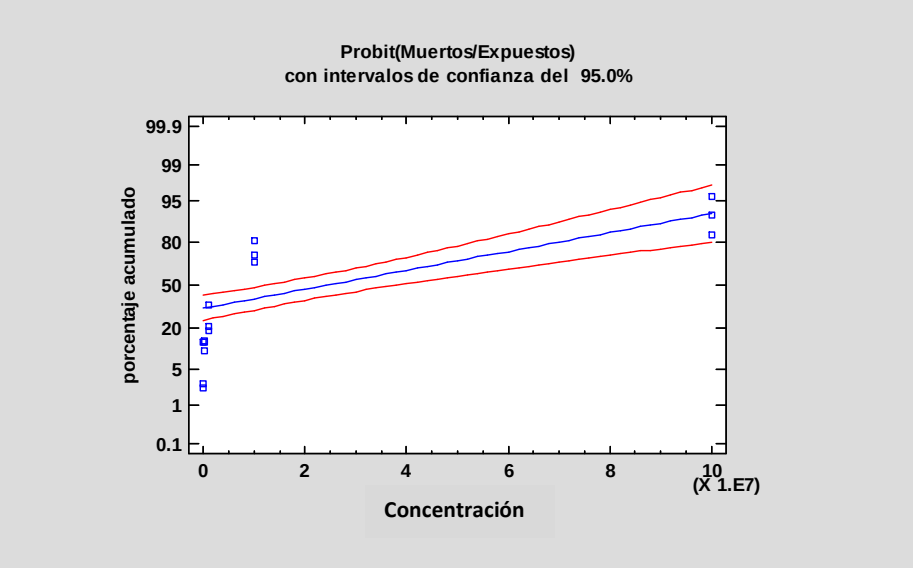
El StatAdvisor

Esta tabla muestra las predicciones inversas obtenidas del modelo ajustado. Las predicciones inversas indican el valor de Concentración al cual el modelo alcanza ciertos porcentajes. Por ejemplo, el valor correspondiente a p=50% (LC50) es igual a 2.44553E7. También se muestran intervalos fiduciarios aproximados de confianza para las predicciones inversas.

Tabla de Predicciones Inversas para Concentración

		LC Inferior 95.0%	*LC Superior 95.0%*
Porcentaje	*Concentración*	*Límite Conf.*	*Límite Conf.*
0.1	-1.43712E8	-2.2923E8	-1.01143E8
0.5	-1.15718E8	-1.86942E8	-8.00299E7
1.0	-1.02141E8	-1.66473E8	-6.97502E7
2.0	-8.73065E7	-1.44153E8	-5.84731E7
3.0	-7.78946E7	-1.30025E8	-5.12851E7
4.0	-7.08143E7	-1.19418E8	-4.58557E7
5.0	-6.50551E7	-1.10809E8	-4.14218E7
6.0	-6.01531E7	-1.03495E8	-3.76332E7
7.0	-5.5855E7	-9.70955E7	-3.42984E7
8.0	-5.20065E7	-9.13774E7	-3.13005E7
9.0	-4.85065E7	-8.61881E7	-2.85628E7
10.0	-4.52847E7	-8.1422E7	-2.60322E7
15.0	-3.19457E7	-6.18305E7	-1.54132E7
20.0	-2.13443E7	-4.64963E7	-6.73716E6
25.0	-1.22492E7	-3.36088E7	974114.
30.0	-4.08156E6	-2.23569E7	8.22047E6
35.0	3.487E6	-1.23228E7	1.53277E7
40.0	1.06688E7	-3.2718E6	2.25423E7
45.0	1.76174E7	4.9513E6	3.00564E7
50.0	2.44553E7	1.24871E7	3.80073E7
55.0	3.12933E7	1.94963E7	4.64848E7
60.0	3.82418E7	2.61607E7	5.55576E7
65.0	4.54236E7	3.26716E7	6.53122E7
70.0	5.29922E7	3.92294E7	7.58959E7
75.0	6.11598E7	4.60595E7	8.7564E7
80.0	7.02549E7	5.34578E7	1.00765E8
85.0	8.08564E7	6.18958E7	1.16337E8
90.0	9.41954E7	7.23284E7	1.36115E8
91.0	9.74171E7	7.48262E7	1.40914E8
92.0	1.00917E8	7.7532E7	1.46135E8
93.0	1.04766E8	8.0499E7	1.51884E8
94.0	1.09064E8	8.38035E7	1.58314E8
95.0	1.13966E8	8.75621E7	1.65657E8
96.0	1.19725E8	9.19659E7	1.74297E8
97.0	1.26805E8	9.73645E7	1.84934E8
98.0	1.36217E8	1.04519E8	1.99095E8
99.0	1.51052E8	1.15758E8	2.21454E8
99.5	1.64628E8	1.26012E8	2.41949E8
99.9	1.92622E8	1.47089E8	2.84273E8





ANEXO IX. 10. Evaluación del TL_{50}

Análisis Probit - Muertos/Expuestos

Variable dependiente: Muertos/Expuestos

Tamaños de muestra: Expuestos

Factores: Tiempo

Número de observaciones: 30

Modelo Estimado de Regresión (Mínimos Cuadrados Ponderados)

		Error	*Estadístico*	
Parámetro	*Estimado*	*Estándar*	*T*	*Valor-P*
CONSTANTE	-2.0397	0.296504	-6.87915	0.0000
Tiempo	0.361027	0.043619	8.27681	0.0000

Análisis de Varianza

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Modelo	77.5064	1	77.5064	68.51	0.0000
Residuo	31.6788	28	1.13139		
Total (Corr.)	109.185	29			

R-Cuadrada = 70.9862 porciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 69.9499 porciento

Error estándar del est. = 1.06367

Error medio absoluto = 0.373729

Estadístico Durbin-Watson = 0.737879

Autocorrelación residual de retardo 1 = 0.530306

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Tiempo	77.5064	1	77.5064	68.51	0.0000
Residuo	31.6788	28	1.13139		

Análisis de Residuos

	Estimación	*Validación*
n	30	
CME	1.13139	
MAE	0.373729	
MAPE	317.836	
ME	-1.81757E-16	
MPE	-264.49	

El StatAdvisor

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo de regresión probit para describir la relación entre Muertos/Expuestos y 1 variable(s) independiente(s). La ecuación del modelo ajustado es:

Muertos/Expuestos = normal(eta), en donde eta = -2.0397 + 0.361027*Tiempo

Como el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 70.9862% de la variabilidad en Muertos/Expuestos. El estadístico R-Cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes es 69.9499%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 1.06367. Este valor puede utilizarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones seleccionando la opción de Pronósticos del menú de texto. El error absoluto medio (MAE) de 0.373729 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentaron en su archivo de datos.

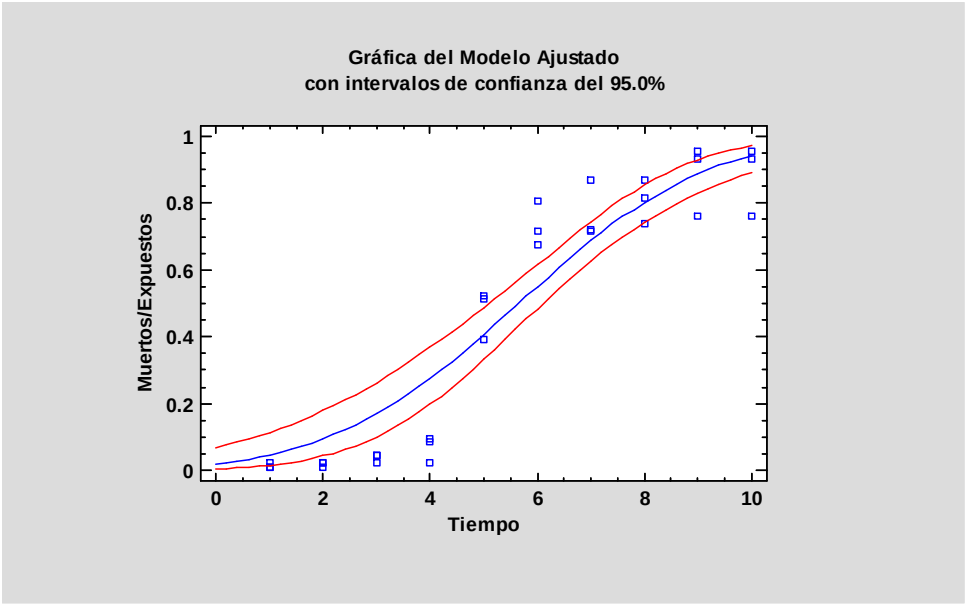
Para determinar si el modelo puede ser simplificado, note que el valor-P más alto para la suma de cuadrados Tipo III es 0.0000, que pertenece a Tiempo. Como el valor-P es menor que 0.05, ese término es estadísticamente significativo al nivel de confianza del 95.0%. Consecuentemente, usted probablemente no quisiera eliminar ninguna variable del modelo.

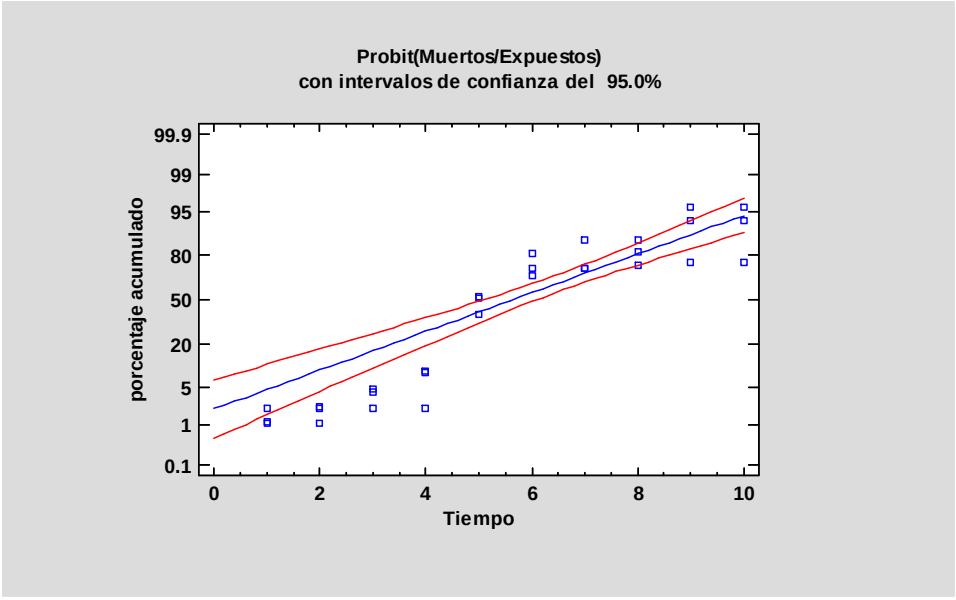
El StatAdvisor

Esta tabla muestra las predicciones inversas obtenidas del modelo ajustado. Las predicciones inversas indican el valor de Tiempo al cual el modelo alcanza ciertos porcentajes. Por ejemplo, el valor correspondiente a p=50% (LD50) es igual a 5.64971. También se muestran intervalos fiduciarios aproximados de confianza para las predicciones inversas.

Tabla de Predicciones Inversas para Tiempo

		LC Inferior 95.0%	*LC Superior 95.0%*
Porcentaje	*Tiempo*	*Límite Conf.*	*Límite Conf.*
0.1	-2.90991	-5.6501	-1.15034
0.5	-1.48503	-3.82541	0.0233435
1.0	-0.793986	-2.94158	0.593668
2.0	-0.0389175	-1.97702	1.218
3.0	0.440147	-1.36586	1.61493
4.0	0.800528	-0.906633	1.91405
5.0	1.09367	-0.533478	2.15776
6.0	1.34318	-0.216186	2.36551
7.0	1.56195	0.0617423	2.54794
8.0	1.75784	0.310349	2.71153
9.0	1.93599	0.536225	2.86054
10.0	2.09997	0.743936	2.9979
15.0	2.77892	1.60134	3.56921
20.0	3.31853	2.27883	4.02722
25.0	3.78147	2.85604	4.42416
30.0	4.1972	3.37001	4.78501
35.0	4.58243	3.84122	5.12445
40.0	4.94799	4.28231	5.45259
45.0	5.30166	4.70169	5.77745
50.0	5.64971	5.10528	6.10626
55.0	5.99776	5.49768	6.44626
60.0	6.35144	5.88299	6.80519
65.0	6.71699	6.26578	7.19162
70.0	7.10223	6.65243	7.61562
75.0	7.51796	7.05256	8.09032
80.0	7.98089	7.48137	8.63566
85.0	8.5205	7.96504	9.28748
90.0	9.19945	8.55729	10.124
91.0	9.36344	8.69842	10.3279
92.0	9.54159	8.85109	10.5501
93.0	9.73747	9.01826	10.7951
94.0	9.95624	9.20422	11.0695
95.0	10.2058	9.41548	11.3833
96.0	10.4989	9.66271	11.7529
97.0	10.8593	9.96547	12.2085
98.0	11.3383	10.3663	12.8158
99.0	12.0934	10.9952	13.7757
99.5	12.7845	11.5686	14.6565
99.9	14.2093	12.7466	16.477


Gráfica del Modelo Ajustado
con intervalos de confianza del 95.0%
Muertos/Expuestos
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
2
4
6
8
10
Tiempo


Probit(Muertos/Expuestos)
con intervalos de confianza del 95.0%
porcentaje acumulado
99.9
99
95
80
50
20
5
1
0.1
0
2
4
6
8
10
Tiempo