



Trabajo Final de Graduación

“Uso de *Galleria mellonella* en la reactivación de una especie de hongo entomopatógeno procedente de una cepa nativa de Misiones”

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura - UNNE

Carrera: Licenciatura en Ciencias Biológicas

Autor: Von Fuchs María Cielo Agustina

Director: Dr. Pozo Velázquez Edilberto

Co-Director: Dr. Niveiro Nicolás

Lugar: Biofábrica Misiones

Año: 2025

RESUMEN

La nutrición artificial de cepas de hongos en almacenamiento contribuye a una disminución de su capacidad virulenta y producción de metabolitos. Se analiza el éxito de la reactivación de una cepa de *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (Clavicipiceae; Hypocreales) a través de la utilización de larvas del modelo biológico *Galleria mellonella* (Linnaeus 1758) (Lepidoptera; Pyralidae) como insecto hospedante. Para ello también se establece un método de cría sucesiva de este insecto y se redacta un protocolo para su realización. Además, se realiza la redacción de un protocolo de reactivación de hongos entomopatógenos a través de modelos entomológicos. Nuestras predicciones establecen que la tasa de mortalidad irá en aumento con consecutivas inoculaciones, a la vez que el tiempo de infección disminuirá.

Los tiempos de mortalidad registrados luego de inoculaciones con esporas en suspensión del hongo fueron menores a aquellos observados sobre los grupos de control. Estos tiempos disminuyeron nuevamente durante un segundo pase a través de las larvas. Nuestros resultados muestran a *G. mellonella* como un modelo biológico de requerimientos simples y como un hospedante prometedor para la reactivación de este hongo.

Palabras clave: Control biológico, entomopatógeno, modelo biológico, microbiología.

INTRODUCCIÓN

Por muchos años, el control de plagas ha sido en gran parte dependiente de técnicas concentradas en la utilización de productos químicos sintéticos, muchos de los cuales conllevan un riesgo tanto para la salud humana como para el bienestar del ambiente en general (Badii & Abreu, 2006).

Esto ha repercutido en un renovado interés por opciones biológicas que produzcan un resultado similar sin comprometer al medio natural. Una de estas opciones nos libera de la necesidad de agregar elementos químicos externos a la hora del manejo de plagas y enfermedades en las plantas: el control biológico.

El control biológico se define como la utilización de enemigos naturales como agentes de control de plagas. Este sistema es el utilizado por la misma naturaleza, basándose así en los conceptos de relaciones simbióticas, competencia, depredación, parasitismo, para mantener un equilibrio estable en las relaciones tróficas (Badii & Abreu, 2006). Mediante el Control Biológico, es posible utilizar organismos o sus metabolitos, para combatir los daños causados por aquellos que resulten perjudiciales (Badii & Abreu, 2006).

Otra definición del control biológico es aportada por Pozo-Velázquez (2020), la cual se basa en la utilización de insectos parasitoides, depredadores; microorganismos parásitos, hiperparásitos, antagonistas y sus productos metabólicos toxigénicos, además de extractos naturales de plantas.

La mayoría de las especies poseen diferentes enemigos naturales, diversos en su modo de acción. Dichos enemigos naturales pueden clasificarse en tres grandes grupos: depredadores, parasitoides y agentes de control biológico entomopatógenos. (Álcázar *et al.*, 2000; Badii & Abreu, 2006;)

Dentro de los agentes de control biológico, los microorganismos entomopatógenos son capaces de generar enfermedades y la muerte a los insectos. Penetran a través del tubo digestivo, espiráculos, unión de artejos o el tegumento, generando la enfermedad que provocará la muerte del insecto hospedante. A diferencia de los otros dos grupos, los entomopatógenos no buscan activamente a sus presas, a excepción de los nematodos entomopatógenos (Álcázar, 2000; Badii & Abreu, 2006;).

Los agentes de control biológico entomopatógenos incluyen bacterias, hongos, virus, nematodos, y protozoos (Badii & Abreu, 2006). Se caracterizan por su escasa toxicidad sobre otros organismos del ambiente y por su elevada aptitud para ser tratados industrialmente, y en ciertos casos pueden ser conservados en un estado “inactivo” para su posterior utilización.

Uno de los grupos más importantes en el control biológico son los hongos entomopatógenos. Se encuentran en el reino Fungi, uno de los mayores grupos de microorganismos eucariotas en ecosistemas terrestres y acuáticos (Mueller & Schmidt, 2007), actualmente se encuentran descritas alrededor de 100.000 especies de hongos, lo cual representa una pequeña fracción de la diversidad estimada, entre 1,5 y 5 millones de especies (Hawksworth & Rossman, 1997; Blackwell, 2011).

Los hongos utilizados para el control biológico se ubican taxonómicamente dentro de las divisiones Zygomycota, Ascomycota, y Deuteromycota (Samson *et al.*, 1988), y también dentro

de Chytridiomycota y Oomycota, las cuales previamente se encontraban incluidas en el reino Fungi, hoy día considerados Protistas (Shah & Pell, 2003).

Los insectos, con 5.5 millones de especies estimadas (Stork *et al.* 2015), representan al grupo de eucariotas con mayor riqueza de especies. Forman relaciones estrechas con varias especies de hongos, incluyendo: relaciones endosimbióticas mutualistas (Sung, *et al.* 2005), hongos cultivados como fuente de alimentos para hormigas cortadoras de hojas (Little *et al.*, 2003), parásitos de transmisión vertical (Lucarotti & Klein, 1988), comensalismo, y agentes patógenos con efectos pronunciados sobre poblaciones de insectos (Araújo & Hughes 2016). Sin embargo, aunque se conoce que existen muchas asociaciones insecto-hongo, este tema se encuentra entre los menos estudiados dentro del campo de la diversidad de hongos, y probablemente contenga a una de las más grandes reservas de especies de hongos sin documentar (Vega & Blackwell, 2005).

Los hongos entomopatógenos comprenden un amplio rango de especies morfológica, filogenética, y ecológicamente diversas. Como parásitos, infestan una gran variedad de insectos, tanto larvas como adultos, y habitan desde bosques tropicales hasta desiertos. Sus hospedantes incluyen a 20 de los 31 Órdenes de insectos, en todas sus fases de crecimiento, con distintos hongos infestando a juveniles (larvas o ninfas), a etapas intermedias de metamorfosis, y/o a adultos. Tal cantidad de nichos resulta en una evolución considerable en cuanto a diversidad morfológica, creando así una gran biodiversidad, la mayor parte de la cual aún es desconocida. (Araújo & Hughes, 2016)

Todos los hongos entomopatógenos se transmiten a través de esporas. Existen dos tipos a considerar: las zoosporas o esporas sexuales, que son liberadas al ambiente y, al ser móviles, llegan activamente al insecto hospedante. Las zoosporas poseen nombres que las distinguen entre cada Orden dentro de los hongos y grupos afines, con sus características particulares.

En segundo lugar, las esporas asexuales mitóticas (llamadas “conidias” en todos los taxones) son frecuentemente liberadas de forma pasiva (Roberts & Humber, 1981).

Una característica prominente de los insectos es su cubierta de quitina, la cual debe ser penetrada por la mayoría de los hongos entomopatógenos y Oomycota. Luego del ingreso, algunos (por ejemplo, *Metarhizium* y *Beauveria* del orden Hypocreales, filo Ascomycota) crecen dentro del hospedante como cuerpos de hifas, multiplicándose a través de la gemación. La mayoría de las especies entomopatógenas dentro de Ascomycota tienen una fase parasítica bien desarrollada. Luego de matar al insecto, estos hongos son capaces de colonizar el cadáver al cambiar a una nutrición saprófita, manteniendo el crecimiento de las hifas (Araújo & Hughes, 2016).

El mecanismo de acción de los hongos a partir de su ingreso a la cavidad corporal del insecto conlleva a una multiplicación y colonización del hemocele del hospedante.

Algunas especies producen toxinas dentro del hospedante, y en dichos casos, la muerte ocurre con mayor rapidez que los que no producen toxinas. Luego el hongo atraviesa la capa del cadáver y produce más propágulos en la superficie (Roberts *et al.*, 1991).

La especificidad de hospedantes necesita mucha más investigación tanto desde el punto

de vista de los rangos de insectos afectados como de los factores bióticos y abióticos que son responsables de su extensión o restricción. Tal información permitiría el desarrollo de cepas con un potencial óptimo como agentes de plagas específicas o complejos de plagas y con efectos adversos mínimos sobre especies no-blanco (Roberts *et al.*, 1991).

Debido a la muda natural de la cutícula en los insectos, la infección sólo debe considerarse exitosa una vez que el hongo haya llegado a la hipodermis. En algunos casos, la tasa de infección es superior si el contacto ocurre justo antes de la muda, siempre que las hifas puedan invadir el líquido exuvial para llegar al nuevo tegumento. En otros casos, la acción fúngica es más avanzada cuando ocurre la ecdisis, debido a la lesión que se produce por la acción adherente del micelio entre la cutícula nueva y la precedente. Dichas lesiones se vuelven una puerta de entrada directa no sólo para el hongo, sino también para bacterias que pueden causar la muerte por septicemia. En cuanto a los insectos que logran sobrevivir, existen reportes que indican una resistencia disminuida a las bajas temperaturas, resultando en una mayor tasa de mortalidad durante la época de hibernación (Ferron 1978).

Luego de la muerte del insecto y completa invasión del cadáver por el hongo, el desarrollo posterior del mismo depende de la humedad relativa del ambiente. Es sólo cuando la atmósfera se encuentra saturada, que el hongo finalmente emergerá y producirá conidióforos, de lo contrario el cadáver permanece como una momia desecada.

La velocidad del desarrollo micelial depende de la temperatura, con los puntos óptimos siendo entre 20°C y 30°C generalmente. Temperaturas inferiores a 5°C o superiores a 35°C marcan los límites luego de los cuales el crecimiento es sub-óptimo. La temperatura necesaria para el desarrollo del hongo no es siempre igual a la requerida por la enfermedad. Sin embargo, la influencia de la temperatura sobre el insecto hospedante también debe ser tomada en cuenta, pues tiempos más cortos entre mudas causados por altas temperaturas podrían reducir el tiempo disponible para la penetración del hongo en el integumento (Ferron, 1978).

La simplicidad relativa de los insectos presenta una oportunidad para realizar investigaciones que sirven de base para ser extrapoladas hacia otros organismos sobre los cuales serían complicadas o poco éticas de realizar (Sandall & Fischer, 2019). Entre los insectos ya establecidos como modelos biológicos exitosos, se puede mencionar a *Drosophila melanogaster*, (Linnaeus 1758) (Diptera; Drosophilida) de gran importancia en estudios genéticos; *Bombyx mori* (Linnaeus 1758) (Lepidoptera; Bombycidae) sobre el cual se estudió a la primera feromona; y *Galleria mellonella* (Linnaeus 1758) (Lepidoptera; Pyralidae) utilizada para la investigación sobre varios hongos entomopatógenos (Lionakis, 2011).

La especie *G. mellonella*, comúnmente llamada polilla de la cera, es un insecto lepidóptero perteneciente al suborden Glossata y forma parte de la superfamilia Pyraloidea. Tiene hábitos nocturnos y distribución cosmopolita. Su ciclo de vida comprende cuatro etapas de desarrollo: huevo, oruga, pupa, y adulto. El ciclo completo puede llevar entre 1 a 4 meses, dependiendo de las condiciones climáticas. Las larvas son parásitos de las colmenas de abejas, estos se alimentan de la miel y la cera que conforma el panal. En investigaciones y condiciones de laboratorio se utilizan como modelo en ensayos “in vivo” debido

a sus características de crecimiento rápido bajo condiciones óptimas, y además pueden ser criadas en un rango de 25°C a 37°C, varios grados por encima que otros modelos entomológicos (Fuchs *et al.*, 2010; Browne & Kavanagh, 2013).

Las larvas de *G. mellonella* funcionan como una opción de modelos in vivo. Las larvas crecen rápidamente bajo condiciones óptimas, y pueden ser incubadas en un rango de 25°C a 37°C (Browne & Kavanagh, 2013; Fuchs *et al.*, 2010), lo cual las convierte en una opción atractiva en ambientes de rutinariamente alcanzan temperaturas elevadas, como lo es la provincia de Misiones.

Los hongos entomopatógenos en Misiones, con una biodiversidad de 52% de la biota argentina, son también un elemento importante y que puede contribuir al manejo de plagas insectiles (Bich *et al.*, 2015).

Dentro de las instituciones que poseen aislados y cepas de hongos entomopatógenos, se encuentra Biofábrica Misiones. La misma posee un cepario de microorganismos que se utilizan en el control biológico. Entre ellos, especies aisladas de las regiones misioneras, como *Metarhizium anisoplae* (Metchnikoff) Sorokin (Clavicipiceae; Hypocreales), que por el tiempo que llevan en conservación sobre medios artificiales como PDA y en crioconservación han disminuido sus potenciales virulentos y patogénicos con respecto a no realizar por largos periodos de tiempo su actividad parasítica sobre insectos en la naturaleza.

Debido a ello, es importante mejorar las propiedades entomopatógenicas de estos hongos como patogenicidad y virulencia para recuperar su nivel óptimo de funcionamiento como agentes de control biológico.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo General

Evaluar el uso de *Galleria mellonella* como modelo biológico para la reactivación de la cepa del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*.

Objetivos Específicos

1. Establecer una metodología de cría sucesiva de *G. mellonella* para la realización de ensayos con hongos entomopatógenos.
2. Reactivar la cepa *M. anisopliae* 100_01 a través de *G. mellonella* en pruebas microbiológicas de mejora de las cualidades y calidad de la cepa.
3. Elaborar protocolos de cría para *G. mellonella* y de reactivación de cepas de hongos entomopatógenos.

Hipótesis planteada

La reactivación del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* a través de la especie modelo *G. mellonella* nos permitiría mejorar su patogenicidad y virulencia como agentes de control biológico de plagas insectiles en comparación con el de su estado inactivo en cepario.

Predicciones:

1. La mortalidad de larvas se incrementará con la inoculación de cepas reactivas a través de un mayor número de pasos, hasta un óptimo.
2. La velocidad de infección aumentará a mayor número de pasos a través del sustrato biológico, hasta un óptimo.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones de Biofábrica Misiones, Ruta Nacional 12 km 7,5 Barrio Miguel Lanús, 3304 Posadas, Misiones, Argentina (coordenadas -27.4306974,-55.8909246). El periodo de trabajo fue durante los meses de noviembre del 2022 y abril del 2023.

Se escogieron estos meses debido a las temperaturas más elevada para conseguir un mejor resultado tanto en el crecimiento del hongo entomopatógeno y de la especie de insecto utilizada como hospedante.

El lugar de trabajo fue el Laboratorio de Bioinsumos, provisto de las herramientas necesarias como microscopios, cámara estéril, autoclave, luz UV, estufa para el crecimiento de colonias fúngicas, y todos los elementos para la correcta manipulación y establecimiento de los ensayos.

Para la realización del trabajo se utilizó la especie modelo *G. mellonella*, cuyos ejemplares fueron suministrados por apicultores locales de la provincia de Misiones en estado larval, a partir de colmenas en las cuales habían hallado a esta especie.

Una vez en el laboratorio se mantuvieron con el mismo panal hasta que llegaron a su estado de adulto, y se realizó una confirmación a través de claves y descripciones de la especie. (Paddock, 1918; Kwadha *et al.*, 2017)

Una segunda habitación fue utilizada para el almacenamiento del pie de cría, a la cual se le proveyó de una fuente de calor durante los días en que las temperaturas cayeron por debajo de los 20°C.

Cría de *G. mellonella*

Las larvas de diferentes instares continuaron su crecimiento en un recipiente de plástico cubierto para evitar su escape, y fueron alimentadas con una combinación de cera de abejas, y harina de maíz mezclada con miel. También se facilitaron recortes de cartón para su uso como escondite (Charrière & Imdorf, 1999).

Durante este proceso, aquellos individuos que entraran al estado de pupa y posteriormente emergieran como adultos fueron separados y transportados a un sector dedicado a la reproducción.

Los adultos fueron identificados y sexados en machos y hembras y agrupados en frascos de vidrio de boca ancha de 5 L de capacidad con distintos números de ejemplares de cada sexo (Tabla 1).

Tabla 1. Las agrupaciones en las relaciones de sexo expuestas en el ensayo. Cada línea de la columna izquierda representa a un tipo de agrupación. La columna de la derecha representa el número de frascos que existió para cada agrupación.

Machos:Hembras	# Frascos
1:1	6
2:1	6
3:1	1
4:1	4
5:1	2
6:1	1
1:2	2

Dentro de los frascos se colocaron recortes de papel de filtro en pares, de longitud tal que un extremo pudiera ser asegurado por la sujeción de una tapa de plástico y el extremo opuesto se mantuviera en contacto con el fondo del frasco (Figura 1) Los papeles eran previamente plegados y desdoblados repetidamente en forma de acordeón, con dobleces que simularan los espacios estrechos donde ovipositan las hembras (Charrière & Imdorf, 1999). Los frascos fueron abiertos diariamente para permitir la oxigenación de su interior.

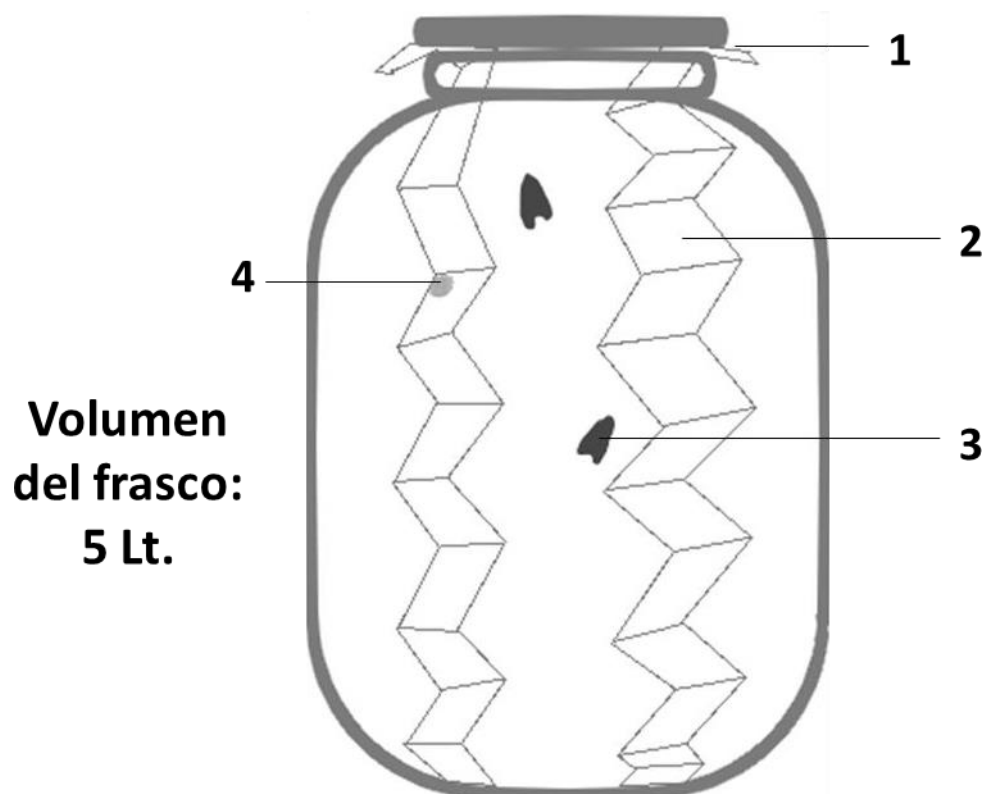


Figura 1. Representación de los frascos del área de reproducción. (1) Apertura para el intercambio de gases, (2) papel de filtro con pliegues, (3) adulto reproductor, (4) huevos agrupados.

Se cuantificó el número de oviposiciones realizadas para cada frasco con su respectiva

relación de sexos, hasta el final del ciclo de vida de las hembras de cada frasco (Tablas 2-4). Para cada conteo, el papel de filtro para las oviposiciones fue reemplazado en su totalidad. En los casos en los que las hembras colocaron sus huevos fuera de los lugares designados, se utilizó agua destilada y estéril para debilitar el pegamento que los mantenía unidos a la superficie en cuestión y así recuperarlos para el total.

Tabla 2. Oviposiciones según relaciones [macho:hembra] para los frascos I a VII.

FECHA	I	II	III	IV	V	VI	VII
	[2:1]	[3:1]	[4:1]	[5:1]	[2:1]	[4:1]	[1:2]
17/02/2022	445	50	103	568			
18/02/2022	132	284	11	0	1216		
21/02/2022	40	80	0	153	725	405	
22/02/2022	0	0	0	0	55	16	
23/02/2022	0	250		0	24	0	705
24/02/2022	0	61			10		410
25/02/2022	0	53			407		115
02/03/2022	123	0			200		176
03/03/2022					0		
04/03/2022					0		
TOTAL	740	778	114	721	2637	421	1406

Tabla 3. Oviposiciones según relaciones [macho:hembra] para los frascos VIII a XIV.

FECHA	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
	[1:1]	[1:2]	[2:1]	[1:1]	[1:1]	[4:1]	[4:1]
23/02/2022	570						
24/02/2022	40	705	155				
25/02/2022	0	700	11	970			
02/03/2022	0	325	15	210			
03/03/2022		25	0	0	1017	291	310
04/03/2022		0		0	150	80	14
08/03/2022							0
TOTAL	610	1755	181	1180	1167	371	324

Tabla 4. Oviposiciones según relaciones [macho:hembra] para los frascos XV a XXII.

FECHA	XV	XVI	XVII	XVIII [1:1]	XIX	XX	XXI	XXII
	[2:1]	[5:1]	[6:1]		[1:1]	[1:1]	[2:1]	[2:1]
03/03/2022	300							
04/03/2022	210	200						
08/03/2022	154	65	40					
09/03/2022	0	44	0	992				
10/03/2022	20	0	0	365				
14/03/2022	18	0	12	445	1370	387	600	
15/03/2022				37	35	131	80	0
16/03/2022				36	0	0	51	0
17/03/2022				33	0	18	22	0
18/03/2022				30	0	24	24	8
21/03/2022				0	0	0	0	0
TOTAL	702	309	52	1938	1405	560	777	8

Posteriormente se realizó una sumatoria de oviposiciones entre aquellos frascos que tuvieran la misma relación entre sexos y se obtuvo un promedio de los mismos (Tabla 5). Los huevos obtenidos fueron colocados en la sala de cría para continuar su ciclo.

Se cuantificaron 11296 huevos en total.

Tabla 5. Promedio de oviposiciones observadas para cada agrupación según la relación de sexos.

MACHO:HEMBRA	[1:1]	[2:1]	[3:1]	[4:1]	[5:1]	[6:1]	[1:2]
Media de oviposiciones	1143,3	840,83	778	307,5	515	52	1580,5

Experimentos de patogenicidad y virulencia

Se seleccionaron larvas del cuarto instar de *G. mellonella* para la inoculación con el hongo entomopatógeno. Las mismas debían medir un mínimo de 20 mm de longitud, generalmente correspondiendo a los últimos instares. La cepa del hongo entomopatógeno utilizada fue *Metarhizium anisopliae* 100_01, la cual fue proporcionada por Biofábrica Misiones.

Se establecieron dos tratamientos: uno para la inoculación, y un grupo de control.

Cada caja de Petri fue preparada con larvas de *G. mellonella* previamente descontaminadas mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio durante 30 segundos (Girotti, 2015).

Se utilizaron guantes de látex para evitar el contacto de las larvas con enzimas naturales encontradas en la piel humana.

La inoculación fue realizada mediante dos métodos simultáneos. A cada larva se le aplicó una película de agua de 2 mL con partículas de unidades formadoras de conidios (UFC) en suspensión de concentración 10^7 UFC/mL, desde una placa toque, por medio de un pincel de cerdas suave previamente esterilizado; con mayor hincapié sobre la zona de los espiráculos laterales.

El segundo método consistió en la colocación de un círculo de papel previamente esterilizado y embebido parcialmente en la misma suspensión en cada caja de Petri, con el cual las larvas entrarían en contacto al desplazarse normalmente por su superficie. Las larvas pertenecientes al grupo de control fueron pinceladas con agua destilada y estéril; y con círculos de papel embebidos en agua destilada y estéril.

Para evitar la manipulación innecesaria de las larvas inoculadas, las observaciones se realizaron cada dos días. De las mismas se registraron los siguientes datos:

- Comportamiento de las larvas
- Colores observables
- Cambios en la textura de la epidermis
- Mortalidad
- Cambio al estado de pupa
- Emergencia de micelio y/u conidióforos.

Se registraron los tiempos entre la inoculación con la suspensión de conidios de *M. anisopliae*, el tratamiento control con agua destilada y esterilizada, y la mortalidad o cambios observados en las larvas.

Con las larvas muertas, se realizó el siguiente procedimiento. Los cadáveres fueron apartados y almacenados en cámara húmeda, consistente en una placa de Petri con un algodón embebido en agua destilada y estéril y un papel de filtro redondo en el fondo. Todo ello como unidad, esterilizado a 121°C 1 atm por 15 minutos.

Estas cámaras húmedas se mantuvieron dentro de una estufa a 37°C hasta que pudiera apreciarse la presencia de UFC. A continuación, se tomaron muestras de esas UFC y se procedió a plantarlas en cajas de Petri previamente provistas de PDA. Una vez que el micelio creciera en ese ambiente y volviera a producir UFC, el proceso completo es repetido a partir de la inoculación

de las larvas utilizando estas nuevas UFC reactivadas.

En cada repetición de este procedimiento, se utilizan para la suspensión a las UFC obtenidas en el experimento previo.

Prueba de patogenicidad n°1

A partir del procedimiento explicado anteriormente, cada caja de Petri fue preparada y luego provista de una larva de *G. mellonella* acondicionada según el correspondiente tratamiento.

Se establecieron así un total de 20 cajas de Petri, siendo GM-1 a GM-10 inoculados el 5 de abril de 2022 (Lote 1), y GM-12 a GM-21 inoculados el 12 de abril de 2022 (Lote 2).

Los caracteres considerados fueron de tipo cualitativo:

- Coloración: el espectro de tonalidades de una larva saludable se encuentra en un rango muy pequeño de blanco-amarillo claro y café claro para las pupas, y los casos anómalos incluyeron aquellos de apariencia más pálida de la esperada y aquellos donde la tonalidad adquirió un aspecto amarronado más oscuro de lo habitual, muchas veces coincidente con una sintomatología de deshidratación.
- Apariencia: las cualidades consideradas anormales para los individuos del ensayo incluyeron una superficie corporal rugosa o de aspecto deshidratado, un ensanchamiento del plano corporal no coincidente con el esperado durante el crecimiento normal, un tamaño reducido para la edad del individuo, y la presencia de capullos de seda excesivamente densos a lo observado en el ámbito natural.
- Comportamiento: particularmente en el caso de las larvas, el registro de este factor se basó en la movilidad de las mismas, teniendo en cuenta tanto el estado laxo como su reacción luego de una perturbación realizada con una leve sacudida de la caja de Petri, para minimizar las posibilidades de contaminación.

También se asentaron los cambios de estados a pupa y adulto si ocurrieran, y la mortalidad y presencia confirmada de colonias de *M. anisopliae*.

Se tomaron los datos registrados de las observaciones a los 6, 13, 20, 30, y 42 días luego de la inoculación (ddi).

Posteriormente se tomaron muestras de UFC a partir de los cadáveres de las cajas GM-1, GM-9, GM-4, y GM-19, y se colocaron en nuevas cajas de Petri acondicionadas y provistas de PDA. Estas cajas fueron almacenadas en estufa a 37°C para la obtención de las colonias GM-1, GM-9, GM-4, y GM-19 que se utilizarían posteriormente.

Prueba de patogenicidad n°2

Se preparan con la misma metodología que en la Prueba n°1 dos placas de Petri con cinco larvas cada una. Una de las placas corresponde al grupo de Control, la otra a un grupo de Prueba de inoculación con *M. anisopliae*.

En este caso, las características observadas correspondieron al número de individuos que incurrieran un cambio de estado en un determinado tiempo, y a anomalías observadas durante toda la extensión de su ciclo de vida.

Prueba de patogenicidad n°3

Similar a la Prueba n°2, tres cajas de Petri fueron provistas de tres larvas con su respectivo acondicionamiento, y los tres grupos fueron inoculados con UFC de *M. anisopliae* obtenidos a partir de la colonia GM-19 del Ensayo n°1. Las inoculaciones fueron realizadas el día 4 de julio de 2022 y observadas periódicamente a lo largo de aproximadamente cinco semanas.

Nuevamente se tomaron como consideración los cambios de estado de larvas a pupas y adultos, la presencia de anomalías en cada estado de desarrollo, y su mortalidad según fuese aplicable.

Prueba de patogenicidad nº4

En cada una de 12 cajas de Petri se dispusieron dos larvas con su acondicionamiento correspondiente. Un grupo correspondió a las larvas de Control y las demás fueron inoculadas con UFC de las colonias GM-1, GM-9, y GM-4, obtenidas a partir del ensayo nº1. Se realizaron tres réplicas para cada uno de los casos. Todas las inoculaciones se realizaron el día 3 de octubre de 2022.

Se registraron el estado de larvas, pupas, o adultos, así también como cualquier presencia de anomalías, y su mortalidad a lo largo del estudio.

Cálculos de TL50 y TL95

Mediante un análisis de regresión logarítmico realizado en RStudio fue posible obtener aproximaciones para los tiempos letales TL50 y TL95. El Grupo 1 reúne a las larvas sobre las cuales se realizó el primer pase del entomopatógeno; y el Grupo 2 reúne a las larvas sobre las cuales se realizó el segundo pase.

Prueba de H de Kruskal-wallis

Para comparar la varianza entre los tres grupos consecutivos de larvas utilizados para el pase de *M. anisoplae*, se realizó una prueba de H de Kruskal-wallis, tomando como datos los días después de la inoculación que pasaron antes de que se registrara su mortalidad.

RESULTADOS

Experimento de cría

Los porcentajes registrados a partir de estos datos indicaron que las oviposiciones de las relaciones [1:1] representaron un 37,78% del total, el valor más elevado entre los grupos. Este fue seguido por la relación [2:1] con el 27,79%. En tercer lugar, la relación [1:2] con el 17,41%. Éste fue seguido de la relación [4:1] con 6,67%. Los grupos de la relación [5:1] fueron el 5,67%. Los de la relación [3:1] equivalieron a 4,29%. Por último, las oviposiciones de la relación [6:1] representaron a 0,29%, el menor de todos los valores (Figura 2).

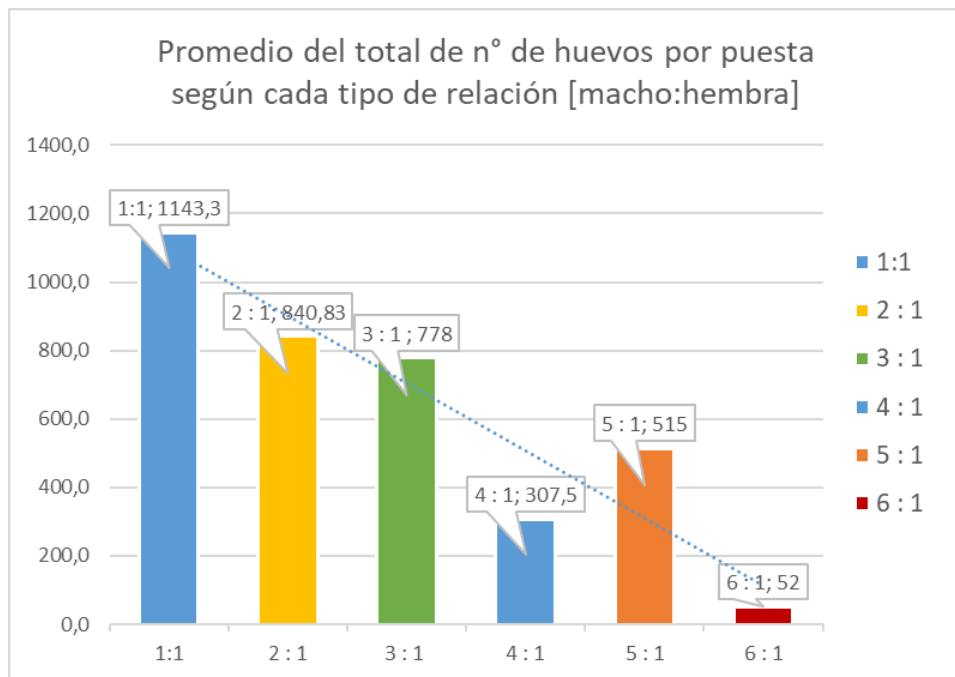


Figura 2. Comparación entre las medias del número de oviposiciones de los grupos de adultos reproductores según cada tipo de relación [macho:hembra] en los cuales los números relativos de las hembras eran iguales o inferiores a aquellos de los machos. La línea de puntos representa la tendencia negativa que se registró ante el incremento del número relativo de machos.

Experimentos de patogenicidad y virulencia

Prueba n°1

En cuanto a la observación de cada ejemplar del Lote 1 (Tabla 6) y el Lote 2 (Tabla 7), el intervalo entre los datos presentados fue seleccionado para proveer una ventana más comprensible ante los cambios de interés. Se destacan además las variaciones registradas con el paso del tiempo para el Lote 1 (Figura 3) y el Lote 2 (Figura 4).

Tabla 6. Registro de caracteres cualitativos observados (coloración, apariencia, comportamiento, fase de desarrollo) para cada caso de inoculación (números 1 a 10) realizado el 5 de abril de 2022.

GRUPO	144 hs (6 días)			312 hs (13 días)			480 hs (20 días)			720 hs (30 días)			1008 hs (42 días)		
	COLO R	APAR	COM P	COLO R	APA R	COM P	COLO R	APA R	COM P	COLOR	APAR	COMP	COLO R	APAR	COMP
GM-1	CN	P	CE	CN	P, SR	CE	CN	P, SR	CE	CN	P, SR	X	CRMa		
GM-2	CN	AE	CE	CN	P	CE	CO	P	CE	CO	IM	CE	D		
GM-3	CN	AN, CD	PM	CN	P	CE	CO	P	CE	CO	IH	CE	D		
GM-4	CN	AN	CE	CN	AN	PM	CO	P	CE	CO	P, SR	CE	CRMa		
GM-5	CN	AN	CE	CN	TR	PM	CO	TR	X	CO	TR, SR	X	CRMa		
GM-6	CN	AE	CE	CN	AE	CE	CN	P	CE	CN	IH	CE	D		
GM-7	CN	AE	PM	CN	AE	PM	CN	P	X	CN	P	X	X		
GM-8	CN	AN, CD	CE	CN	P	CE	CN	P	CE	CN	IH	CE	D		
GM-9	CN	AE	PM	CA	P	CE	CN	P, SR	CE	CN	P, SR	CE	CRMa		
GM-10	CN	P	CE	CN	P	CE	CN	IH, AN	CE	CN	IH	CE	D		

Referencias: CN: coloración normal; CO: coloración oscura; CA: coloración amarillenta; AN: aspecto normal; SR: superficie rugosa; AE: aspecto ensanchado; TR: tamaño reducido; CD: capullo de seda denso; P: estado pupal; IM: imago macho; IH: imago hembra; CE: comportamiento esperado; PM: poco móvil; X: individuo muerto; D: individuo descartado para este ensayo; CRMa: crecimiento de *Metarhizium anisopliae* detectado.

Tabla 7. Registro de caracteres cualitativos observados (coloración, apariencia, comportamiento, fase de desarrollo) para cada caso de inoculación (números 12 al 21) realizado el 12 de abril de 2022. El caso GM-4 fue descartado previo a la primera toma de datos debido a pérdida del individuo por motivos externos.

GRUPO	144 hs (6 días)			312 hs (13 días)			480 hs (20 días)			720 hs (30 días)			1008 hs (42 días)		
	COLOR	APAR	COMP	COLOR	APAR	COMP	COLOR	APAR	COMP	COLOR	APAR	COMP	COLOR	APAR	COMP
GM-12	CN	AN	CE	CN	P	CE	CN	P	CE	CN	IH, AN	CE	D		
GM-13	CN	P	CE	CN	P	CE	CN	IM, AN	CE	CN	IM, AN	CE	D		
GM-14	CN	P	CE	CN	P	CE	CN	IH, AN	CE	CN	IH, AN	CE	D		
GM-15	CN	P	CE	CN	P	CE	CN	IM, AN	CE	CN	IM, AN	CE	D		
GM-16	CN	P	CE	CN	P	CE	CN	IH, AN	CE	CN	IH, AN	CE	D		
GM-17	CN	AN	X	CRMa			CRMa			CRMa			CRMa		
GM-18	CN	P	CE	CN	P	CE	CN	IH, AN	CE	CO	IH, AN	CE	D		
GM-4	CN	P	CE	CN	P	CE	CN	P	CE	CO	P, TR	CE	CRMa		
GM-20	CN	AN	PM	CN	P, TR	CE	CN	IM, AN	CE	CN	IM, AN	CE	D		
GM-21	CN	AN	PM	CN	P	CE	CN	IH, AN	CE	CN	IH, AN	CE	D		

Referencias: CN: coloración normal; CO: coloración oscura; CA: coloración amarillenta; AN: aspecto normal; SR: superficie rugosa; AE: aspecto ensanchado; TR: tamaño reducido; CD: capullo de seda denso; P: estado pupal; IM: imago macho; IH: imago hembra; CE: comportamiento esperado; PM: poco móvil; X: individuo muerto; D: individuo descartado para este ensayo; CRMa: crecimiento de *Metarhizium anisopliae* detectado.

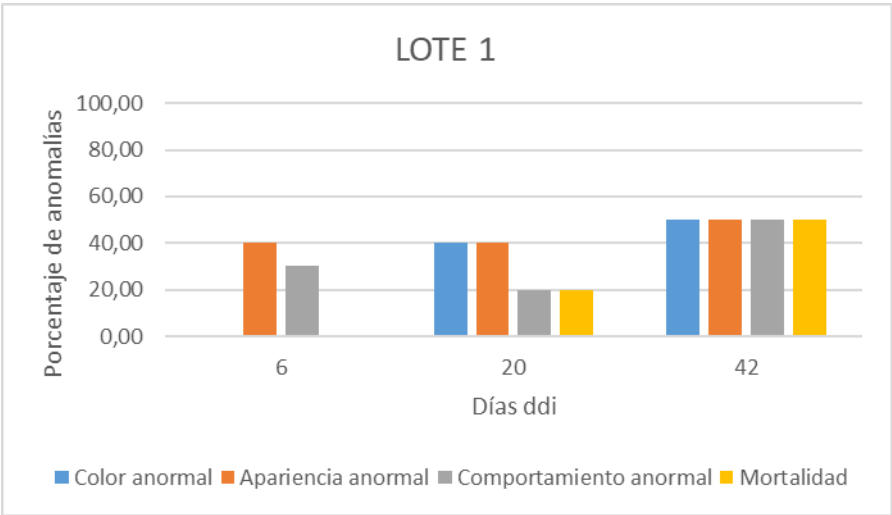


Figura 3. Porcentaje de anomalías observadas sobre el Lote 1 a las 144 horas, 480 horas, y 1008 horas luego de la inoculación.

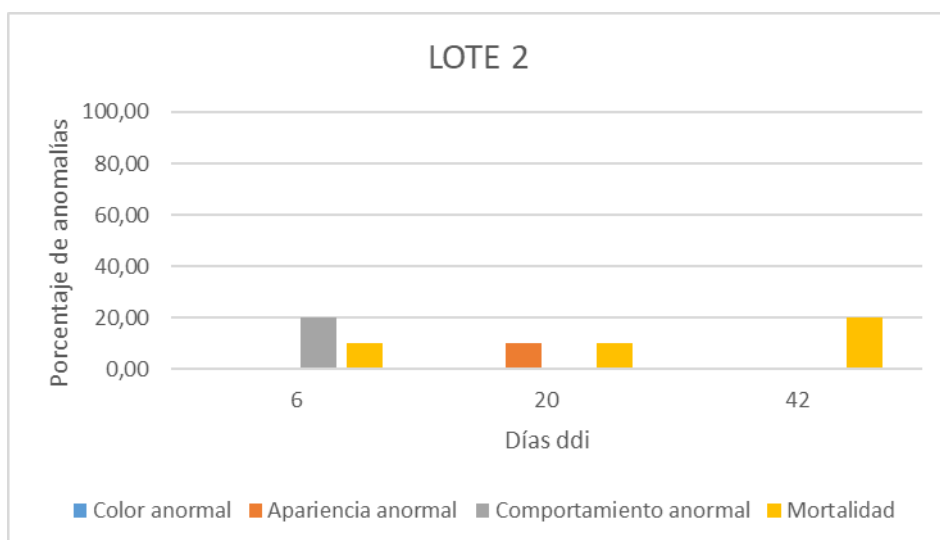


Figura 4. Porcentaje de anomalías observadas sobre el Lote 2 a las 144 horas, 480 horas, y 1008 horas luego de la inoculación.

De los 20 casos observados, 35% resultaron en la muerte del individuo inoculado, y 71,42% de ese porcentaje presentaron un claro crecimiento del hongo patógeno en su interior.

En el caso del Lote 1:

A los seis días después de la inoculación (ddi), los datos fueron los siguientes. La coloración fue normal para el 100% de la muestra (10 individuos). Un 40% presentaron un aspecto ensanchado, la cual fue la única anomalía de apariencia observada en este caso. Un 30% presentaron un comportamiento anormal, registrado en todos los casos como un nivel de motilidad por debajo del esperado. No se registraron casos de mortalidad.

A los 20 días ddi, los casos de coloración anormal fueron del 40%, en todos ellos la coloración se presentó como un café más oscuro del esperado dentro del rango normal. El porcentaje de casos con apariencia anormal fue del 30%, de los cuales un 66,67% presentaron una superficie rugosa, y el restante 33,34% presentó un tamaño reducido. No se registraron

anormalidades en el comportamiento. La mortalidad presente fue del 20%.

A los 42 días ddi, se registró una mortalidad del 50% de los ejemplares, y sobre este número se observó el crecimiento de micelio correspondiente a *M. anisopliae* en el 80%.

Para el caso del Lote 2:

A los seis días ddi, no se registraron particularidades sobre la coloración o el aspecto de ninguno de los 10 individuos. Sobre un 20% se registraron casos de comportamiento anormal, con un registro del nivel de motilidad más reducido de lo esperado. También se registró la mortalidad de un 10% de los individuos.

A los 20 días ddi, no hubo registros con respecto a una coloración anormal o a un comportamiento inesperado. Se registró anormalidades de aspecto sobre un 10%, en este caso un tamaño más reducido de lo esperado durante el estado de pupa. La mortalidad se mantuvo al 10%, y sobre este cadáver se observó el crecimiento de micelio de *M. anisopliae*.

A los 42 días ddi, el 80% de los ejemplares se registraron en estado adulto, y se observó la mortalidad del restante 20%, sobre los cuales además se registró la presencia de micelio de *M. anisopliae*.

Prueba n°2

Para el caso del grupo de Control, a transición al estado de pupa ocurrió sólo para un 20% a los 17 días ddi, otro 20% a los 23 días ddi, y el restante 60% de las larvas no cambiaron de estado durante la duración del ensayo (total de 48 días). El registro de anormalidades (tanto en apariencia y color como comportamentales) en las larvas iniciando a los 13 días coincidió con los individuos que realizaron este cambio de estado a los 17 y 23 días.

En cuanto al grupo de Prueba, se observaron anormalidades sobre >50% de las larvas a los seis días ddi, y un cambio de estado a pupa de >50% a los nueve días. El 80% de los individuos llegó al estado adulto luego de 25 días ddi (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de fases y anomalías para los casos de larvas inoculadas con *M. anisopliae* 100_01 y aquellas inoculadas con agua destilada (Control) en la fecha 19 de abril de 2022.

Fecha	Prueba				Control			
	L. Normales	L. Anormales	Pupas	Imagos	Larvas Normales	Larvas Anormales	Pupas	Imagos
19/04/2022	100,00	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00
20/04/2022	80,00	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00
21/04/2022	60,00	20,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00
25/04/2022		80,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00
26/04/2022		80,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00
27/04/2022		80,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00
28/04/2022		20,00	60,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00
29/04/2022		20,00	60,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00
02/05/2022		20,00	60,00	0,00	80,00	20,00	0,00	0,00
03/05/2022		20,00	60,00	0,00	80,00	20,00	0,00	0,00
04/05/2022		20,00	60,00	0,00	80,00	20,00	0,00	0,00
05/05/2022		20,00	60,00	0,00	80,00	20,00	0,00	0,00
06/05/2022		20,00	60,00	0,00		80,00	20,00	0,00
09/05/2022		20,00	60,00	0,00		80,00	20,00	0,00
10/05/2022		20,00	40,00	20,00		80,00	20,00	0,00
11/05/2022			40,00	40,00		80,00	0,00	20,00
12/05/2022			20,00	60,00		60,00	20,00	20,00
13/05/2022				80,00		60,00	20,00	20,00
16/05/2022						60,00		40,00
17/05/2022						60,00		40,00
19/05/2022						60,00		40,00
20/05/2022						60,00		40,00
25/05/2022						60,00		40,00
27/05/2022						60,00		40,00
31/05/2022						60,00		40,00
01/06/2022						60,00		40,00
02/06/2022						60,00		40,00
03/06/2022						60,00		40,00
06/06/2022						60,00		40,00

El grupo de Prueba presentó una aceleración en el cambio de estado hacia pupa (Figura 5) e imago (Figura 6), completando su ciclo cuando el grupo de control aún presentaba a >50% de sus individuos en estado larval.

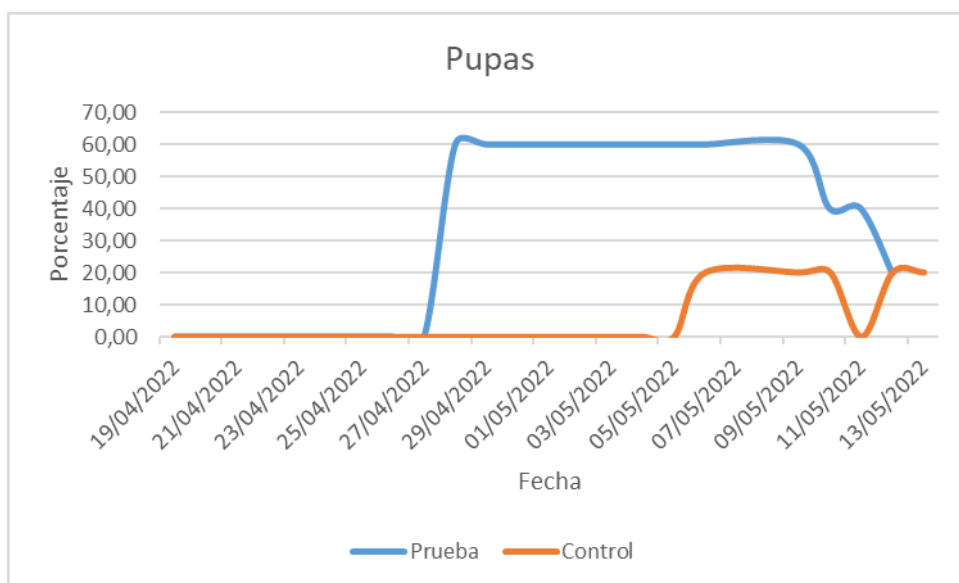


Figura 5. Tiempos observados para los porcentajes de individuos del ensayo nº2 en Prueba y Control para pasar a la fase de pupa.

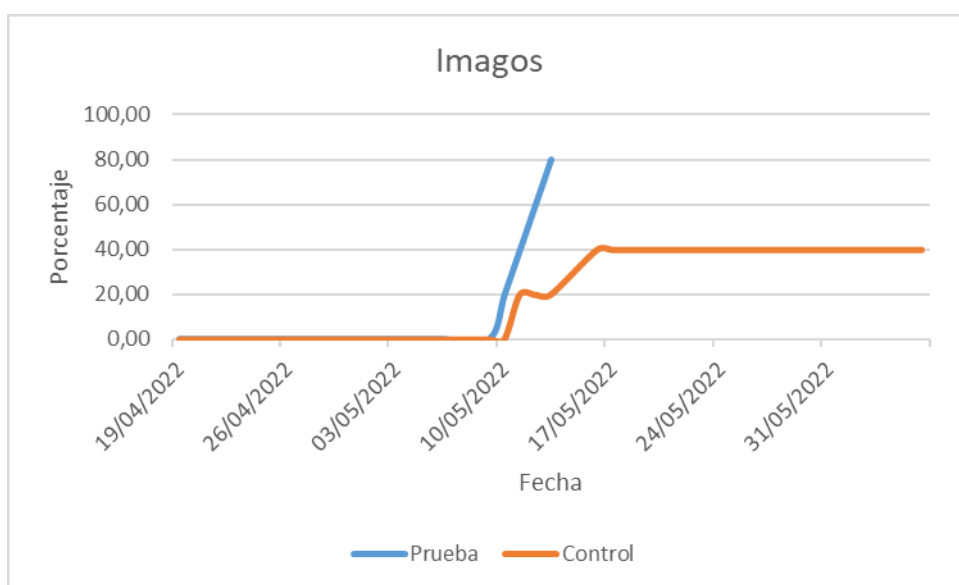


Figura 6. Tiempos observados para los porcentajes de individuos del ensayo nº2 en Prueba y Control para pasar a la fase de imago.

Aunque en un principio parece contraintuitivo para el control de esta plaga, vale apuntar que el desarrollo acelerado causó una disminución sobre el único periodo de alimentación de *M. anisopliae*, puesto que tanto pupas como imagos carecen de piezas bucales

Prueba nº3

Dentro del grupo I, un 100% de los individuos presentaron anomalías en su estado larval a los 9 días posteriores a la inoculación con UFC de la colonia GM-4. De ese total, un 33,34% se mantuvieron en estado larval hasta el día 14 en el cual se registraron en estado pupal; 33,34% cambiaron a su estado de pupa al llegar el día 11 (Figura 7). Del total, 66,67% llegaron a la fase adulta a los 31 días ddi (Figura 8) y el restante 33,34% presentó mortalidad antes

de completar el cambio de estado (Tabla 9 y Figura 10).

Tabla 9. Porcentaje de individuos para cada fase del desarrollo y presencia o ausencia de anomalías o mortalidad, correspondiente al grupo I inoculado con UFC del GM-4 el día 4 de julio de 2022.

GRUPO I (%)						
Fecha	N	A	P	I	X	D
04/07/2022	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
13/07/2022	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15/07/2022	0,00	33,33	33,33	0,00	33,33	0,00
18/07/2022	0,00	0,00	66,67	0,00	33,33	0,00
20/07/2022	0,00	0,00	66,67	0,00	33,33	0,00
22/07/2022	0,00	0,00	66,67	0,00	33,33	0,00
04/08/2022	0,00	0,00	33,33	33,33	33,33	0,00
05/08/2022	0,00	0,00	0,00	66,67	33,33	0,00
Referencias: N: individuo vivo normal, A: individuo vivo con características anormales, P: Pupa, X: individuo muerto, D: individuo descartado por motivos ajenos al estudio						

En el grupo II se registraron anomalías sobre el 33,34% en su estado larval a los 14 días desde el inicio del ensayo, y un cambio de estado a pupa a los 30 días del mismo (Tabla 10 y Figura 7). No se registraron cambios de estado a adulto ni mortalidad alguna antes de la finalización del ensayo a los 31 días.

Tabla 10. Porcentaje de individuos para cada fase del desarrollo y presencia o ausencia de anomalías o mortalidad, correspondiente al grupo II inoculado con UFC del GM-4 el día 4 de julio de 2022.

GRUPO II (%)						
Fecha	N	A	P	I	X	D
04/07/2022	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
13/07/2022	33,33	0,00	0,00	0,00	0,00	66,67
15/07/2022	33,33	0,00	0,00	0,00	0,00	66,67
18/07/2022	0,00	33,33	0,00	0,00	0,00	66,67
20/07/2022	0,00	33,33	0,00	0,00	0,00	66,67
22/07/2022	0,00	33,33	0,00	0,00	0,00	66,67
04/08/2022	0,00	0,00	33,33	0,00	0,00	66,67
05/08/2022	0,00	0,00	33,33	0,00	0,00	66,67
Referencias: N: individuo vivo normal, A: individuo vivo con características anormales, P: Pupa, X: individuo muerto, D: individuo descartado por motivos ajenos al estudio						

Sobre el grupo III se registró una mortalidad de larvas del 33,34% a los 11 días posteriores a la inoculación; un 33,34% de cambio de estado a pupas luego de 16 días y su completa mortalidad luego de 31 días (Figuras 7 y 9); y el restante 33,34% completó su desarrollo hasta el estado adulto a los 30 días (Tabla 11 y Figura 8).

Tabla 11. Porcentaje de individuos para cada fase del desarrollo y presencia o ausencia de anomalías o mortalidad, correspondiente al grupo III inoculado con UFC del GM-4 el día 4 de julio de 2022.

GRUPO III (%)						
Fecha	N	A	P	I	X	D
04/07/2022	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
13/07/2022	66,67	0,00	0,00	0,00	33,33	0,00
15/07/2022	66,67	0,00	0,00	0,00	33,33	0,00
18/07/2022	66,67	0,00	0,00	0,00	33,33	0,00
20/07/2022	33,33	0,00	33,33	0,00	33,33	0,00
22/07/2022	33,33	0,00	33,33	0,00	33,33	0,00
04/08/2022	0,00	33,33	0,00	33,33	33,33	0,00
05/08/2022	0,00	0,00	0,00	33,33	66,67	0,00

Referencias: N: individuo vivo normal, A: individuo vivo con características anormales, P: Pupa, X: individuo muerto, D: individuo descartado por motivos ajenos al estudio

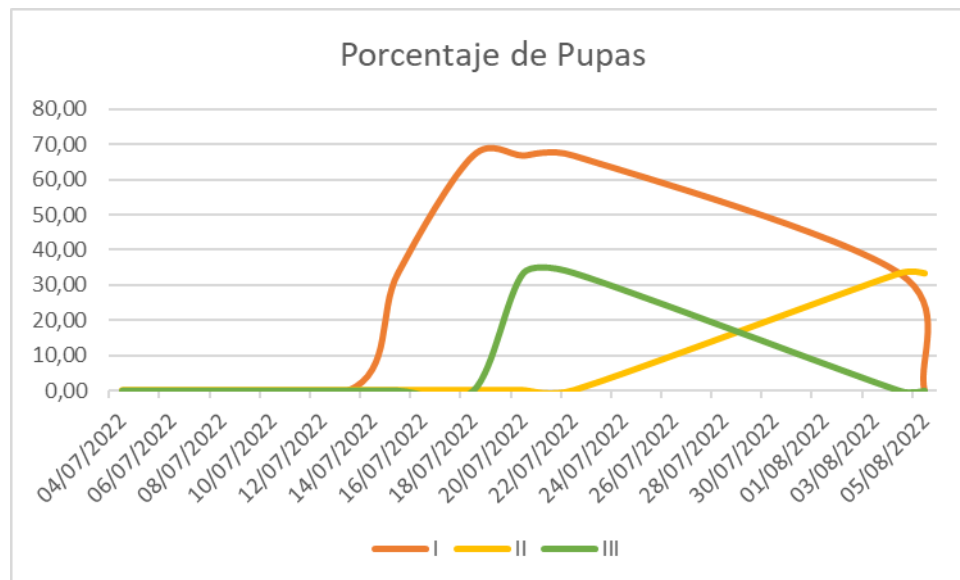


Figura 7. Porcentaje de individuos que cambiaron a la fase de pupa para cada uno de los grupos de inoculación.

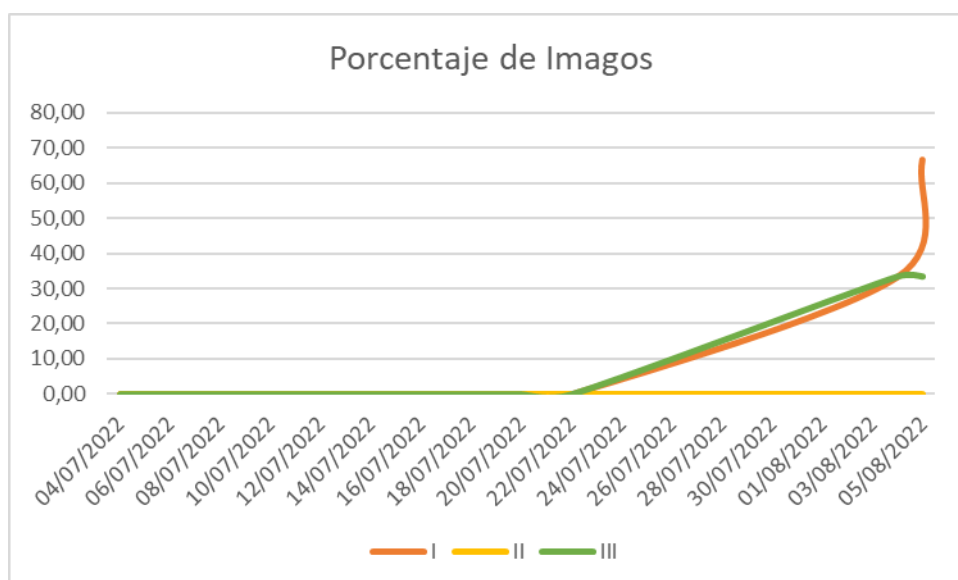


Figura 8. Porcentaje de individuos que cambiaron a la fase de imago para cada uno de los grupos de inoculación.

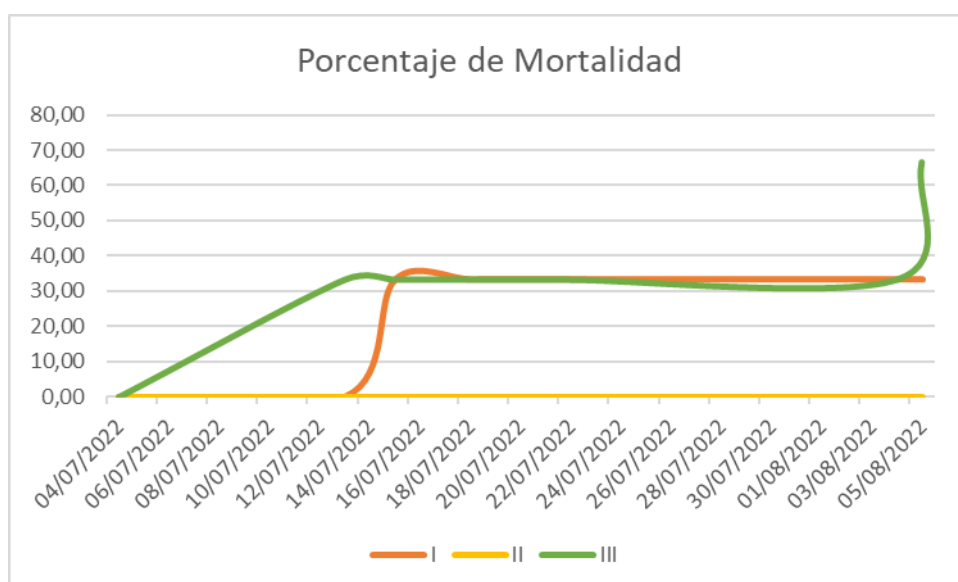


Figura 9. Porcentaje de individuos presentaron mortalidad para cada uno de los grupos de inoculación.

Del total estudiado, el porcentaje de mortalidad fue de 42,86%.

Prueba n°4

Los lotes del grupo Control mantuvieron un comportamiento muy similar entre sí. Sobre ninguna de las muestras se presentaron anomalías durante el estado larval. Se registró el cambio de estado a pupa para >50% de los individuos a los 21 días luego del inicio del experimento, y tampoco se observaron anomalías en este estado. El 50% de los individuos totales continuaron al estado adulto a los 32 días, y el restante 50% aún se encontraba en su estado de pupa al momento de finalizar el estudio luego de 35 días (Tabla 12 y Figura 10).

Tabla 12. Porcentaje de individuos para el grupo de Control a lo largo de la Prueba n°4. Referencias: (N) larvas normales, (A) larvas con presencia de anomalías, (P) pupa normal, (F) pupa con presencia de anomalías, (X) individuo muerto, (M) individuo con crecimiento de *M. anisopliae*, (D) individuo descartado del estudio.

CONTROL								
Fecha	N%	A%	P%	F%	I%	X%	M%	D%
03/10/2022	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
05/10/2022	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
09/10/2022	83,33	0,00	16,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12/10/2022	83,33	0,00	16,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14/10/2022	83,33	0,00	16,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17/10/2022	83,33	0,00	16,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19/10/2022	83,33	0,00	16,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
21/10/2022	83,33	0,00	16,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24/10/2022	33,33	0,00	66,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
26/10/2022	0,00	0,00	83,33	0,00	16,67	0,00	0,00	0,00
28/10/2022	0,00	0,00	66,67	0,00	33,33	0,00	0,00	0,00
31/10/2022	0,00	0,00	66,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
02/11/2022	0,00	0,00	66,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
04/11/2022	0,00	0,00	50,00	0,00	16,67	0,00	0,00	0,00
07/11/2022	0,00	0,00	50,00	0,00	16,67	0,00	0,00	0,00

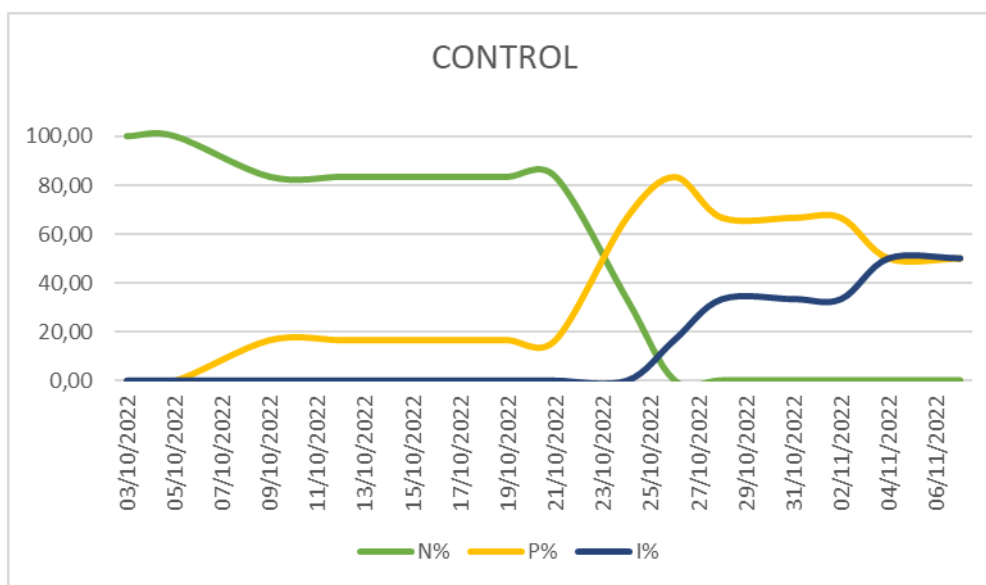


Figura 10. Porcentaje de larvas normales (N%), pupas (P%), e imágos (I%) para el grupo de Control a lo largo del experimento.

En cuanto a los lotes inoculados con la suspensión de conidias provenientes de la colonia GM-1, la transición a la etapa de pupa ocurrió a los nueve días ddi, un tiempo relativamente corto a comparación de los 14 promedio esperados en estado salvaje. De dicho porcentaje, 33,33% de las pupas presentaron anomalías observables. A los 25 días luego del inicio del ensayo, un 50% del total habían llegado al estado adulto, y 33,33% del total habían muerto en el estado

de pupa. El restante 16,67% completó el ciclo al estado adulto pasados los 28 días (Tabla 13 y Figura 11).

Porcentaje de mortalidad: 33,34%.

Tabla 13. Porcentaje de individuos para el tratamiento con esporas en suspensión de la colonia GM-1 a lo largo de la Prueba n°4. Referencias: (N) larvas normales, (A) larvas con presencia de anormalidades, (P) pupa normal, (F) pupa con presencia de anormalidades, (X) individuo muerto, (M) individuo con crecimiento de *M. anisopliae*, (D) individuo descartado del estudio

GM-1								
Fecha	N%	A%	P%	F%	I%	X%	M%	D%
03/10/2022	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
05/10/2022	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
09/10/2022	66,67	0,00	33,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12/10/2022	0,00	0,00	66,67	33,33	0,00	0,00	0,00	0,00
14/10/2022	0,00	0,00	66,67	33,33	0,00	0,00	0,00	0,00
17/10/2022	0,00	0,00	66,67	33,33	0,00	0,00	0,00	0,00
19/10/2022	0,00	0,00	66,67	33,33	0,00	0,00	0,00	0,00
21/10/2022	0,00	0,00	66,67	33,33	0,00	0,00	0,00	0,00
24/10/2022	0,00	0,00	66,67	33,33	0,00	0,00	0,00	0,00
26/10/2022	0,00	0,00	66,67	33,33	0,00	0,00	0,00	0,00
28/10/2022	0,00	0,00	16,67	0,00	50,00	33,33	0,00	0,00
31/10/2022	0,00	0,00	0,00	0,00	33,33	0,00	0,00	0,00
02/11/2022	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
04/11/2022	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
07/11/2022	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

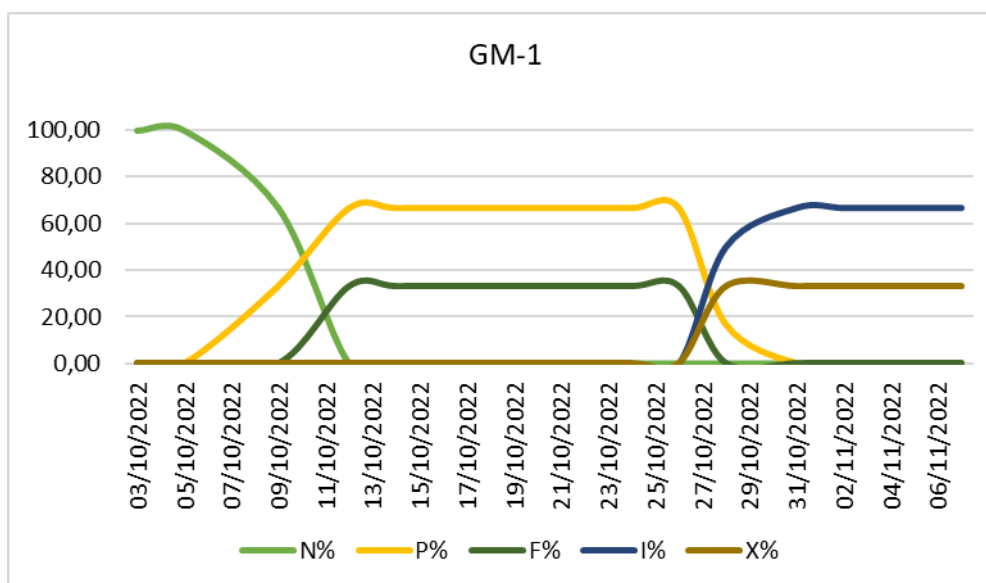


Figura 11. Porcentaje de larvas normales (N%), pupas (P%), pupas anormales (F%), imagos (I%), y mortalidad (X%) para el tratamiento con conidias de la colonia GM-1 a lo largo del experimento.

Para el caso de los individuos inoculados a partir de la suspensión de conidias de la colonia GM-9, el estado larval presentó particularidades de interés. A los dos días ddi, se produjo la mortalidad de un 16,67% de las larvas en estudio, y el crecimiento de micelio fúngico correspondiente a *M. anisopliae* sobre la superficie de sus cadáveres a los 14 días ddi. El restante

66,67%, completaron el cambio de estado a pupa luego de 11 días ddi, y un 25% de ese porcentaje (16,67% del total) presentaron anormalidades observables como una superficie rugosa o un tamaño reducido.

Para los 14 días ddi, 33,33% del total de individuos presentaron mortalidad antes de que se completara su ciclo, 50% de ellos (16,67% del total) durante el estado de pupa. El 100% de los cadáveres presentaron crecimiento fúngico de *M. anisopliae*, 50% de ellos a los 12 días de registrada su mortalidad (14 días ddi) y el restante 50% a los 15 días del registro de su mortalidad (30 días ddi). Sólo un 50% del total de individuos en estudio completaron su ciclo hasta el imago (Tabla 14 y Figura 12).

Porcentaje de mortalidad: 33,34%

Tabla 14. Porcentaje de individuos para el tratamiento con esporas en suspensión de la colonia GM-9 a lo largo de la Prueba nº4. Referencias: (N) larvas normales, (A) larvas con presencia de anomalías, (P) pupa normal, (F) pupa con presencia de anomalías, (X) individuo muerto, (M) individuo con crecimiento de *M. anisopliae*, (D) individuo descartado del estudio.

GM-9								
Fecha	N%	A%	P%	F%	I%	X%	M%	D%
03/10/2022	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
05/10/2022	83,33	0,00	0,00	0,00	0,00	16,67	0,00	0,00
09/10/2022	33,33	16,67	33,33	0,00	0,00	16,67	0,00	0,00
12/10/2022	16,67	16,67	50,00	0,00	0,00	16,67	0,00	0,00
14/10/2022	0,00	16,67	66,67	0,00	0,00	16,67	0,00	0,00
17/10/2022	0,00	16,67	33,33	16,67	0,00	16,67	16,67	0,00
19/10/2022	0,00	16,67	33,33	16,67	0,00	16,67	16,67	0,00
21/10/2022	0,00	16,67	33,33	16,67	0,00	16,67	16,67	0,00
24/10/2022	0,00	16,67	16,67	16,67	16,67	16,67	16,67	0,00
26/10/2022	0,00	16,67	16,67	16,67	16,67	16,67	16,67	0,00
28/10/2022	0,00	16,67	0,00	0,00	50,00	16,67	16,67	0,00
31/10/2022	0,00	16,67	0,00	0,00	16,67	16,67	16,67	0,00
02/11/2022	0,00	0,00	0,00	0,00	16,67	16,67	33,33	0,00
04/11/2022	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
07/11/2022	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

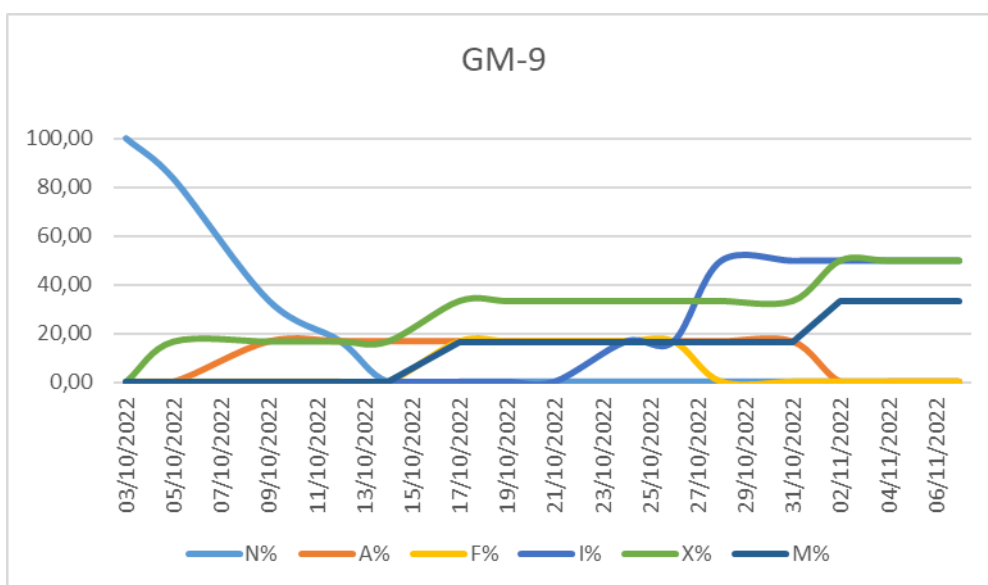


Figura 12. Porcentaje de larvas normales (N%), larvas anormales (A%), pupas anormales (F%), imagos (I%), mortalidad (X%), y presencia de crecimiento de *M. anisopliae* (M%) para el tratamiento con conidias de la colonia GM-9 a lo largo del experimento.

Para los individuos inoculados con conidias en suspensión de la colonia GM-4, a los dos días posteriores a la inoculación, se presentó una mortalidad en el 16,67%, seguido de un casi inmediato crecimiento de hifas de *M. anisopliae*. En ese mismo tiempo, otro 16,67% del total estudiado cambiaron a su estado de pupa, y 6 días luego del inicio del ensayo ese número se

elevó a 33,34%. La mortalidad de un 50% del total de individuos ya podía observarse a los 16 días luego del inicio del experimento, llegando a un 66,67% al terminar el ensayo. Del total de cadáveres, un 75% (50% del total) presentaron crecimiento micelar del entomopatógeno, y de este porcentaje, 66,67% (33,34% del total) se encontraban aún en estado larval. Sólo un 33,34% del total de individuos en estudio sobrevivieron y completaron su ciclo hasta el estado adulto (Tabla 15 y Figura 13).

Porcentaje de mortalidad: 66,67%

Tabla 15. Porcentaje de individuos para el tratamiento con esporas en suspensión de la colonia GM-4 a lo largo de la Prueba nº4. Referencias: (N) larvas normales, (A) larvas con presencia de anomalías, (P) pupa normal, (F) pupa con presencia de anomalías, (X) individuo muerto, (M) individuo con crecimiento de *M. anisopliae*, (D) individuo descartado del estudio.

GM-4								
Fecha	N%	A%	P%	F%	I%	X%	M%	D%
03/10/2022	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
05/10/2022	66,67	0,00	16,67	0,00	0,00	16,67	16,67	0,00
09/10/2022	16,67	16,67	33,33	0,00	0,00	33,33	33,33	0,00
12/10/2022	16,67	16,67	33,33	0,00	0,00	33,33	33,33	0,00
14/10/2022	16,67	16,67	33,33	0,00	0,00	33,33	33,33	0,00
17/10/2022	16,67	16,67	33,33	0,00	0,00	33,33	33,33	0,00
19/10/2022	0,00	16,67	33,33	0,00	0,00	50,00	50,00	0,00
21/10/2022	0,00	16,67	33,33	0,00	0,00	50,00	50,00	0,00
24/10/2022	0,00	16,67	16,67	0,00	16,67	50,00	50,00	0,00
26/10/2022	0,00	16,67	16,67	0,00	16,67	50,00	50,00	0,00
28/10/2022	0,00	16,67	0,00	0,00	33,33	50,00	50,00	0,00
31/10/2022	0,00	0,00	0,00	0,00	33,33	66,67	50,00	0,00
02/11/2022	0,00	0,00	0,00	0,00	33,33	66,67	50,00	0,00
04/11/2022	0,00	0,00	0,00	0,00	33,33	66,67	50,00	0,00
07/11/2022	0,00	0,00	0,00	0,00	33,33	66,67	50,00	0,00

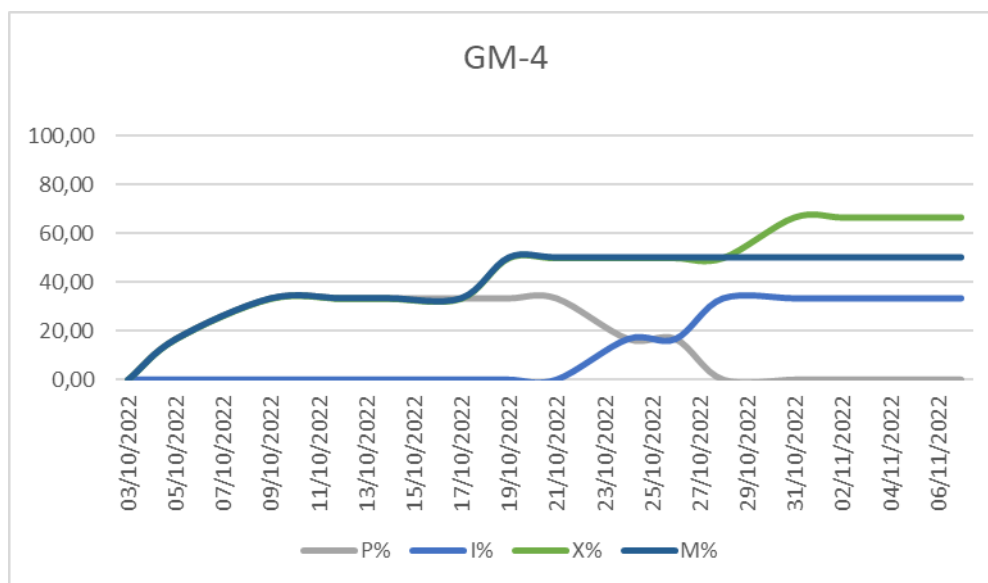


Figura 13. Porcentaje de pupas normales (P%), imagos (I%), mortalidad (X%), y presencia de crecimiento de *M. anisopliae* (M%) para el tratamiento con conidias de la colonia GM-4 a lo largo del experimento.

Cálculos de TL50 y TL95

Se calcularon los siguientes tiempos letales (Figura 14).

Los tiempos para el Grupo 1 fueron un LT50 de 21,58 días y un LT95 de 44,72 días. Los tiempos para el Grupo 2 fueron un LT50 de 11,36 días y un LT95 de 31,79 días.

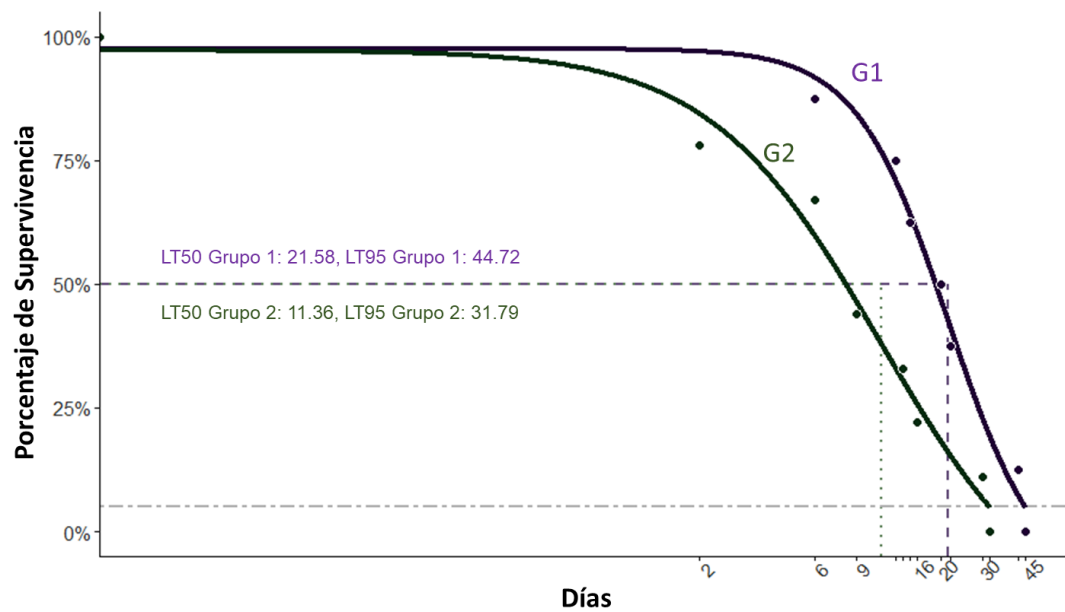


Figura 14. Representación del análisis de regresión logarítmica para la obtención de LT50 y LT95. La curva superior corresponde al Grupo 1 y la inferior al Grupo 2.

Prueba de H de Kruskal-wallis

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Nivel significativo: 0,05

Grados de libertad: 2

H: 1,57

H ajustada: 1,59

DISCUSIÓN

Cría de *G. mellonella*

En los grupos de relación de sexos que poseían más machos que hembras, se puede observar claramente una tendencia a la disminución en el número de oviposiciones a medida que el número relativo de los machos se volvía superior al de las hembras. En otras palabras, a mismo número relativo de hembras, un mayor número relativo de machos correspondía a una relación negativa en cuanto al número de puestas.

Existen múltiples posibles explicaciones para este fenómeno. Un número relativo de machos superior dentro de una cierta área podría causar un incremento en el tiempo que éstos utilizan compitiendo entre sí, disminuyendo el tiempo total dedicado al apareamiento. Sin embargo, y a diferencia la mayoría de las polillas, *G. mellonella* es particular en que son los machos quienes atraen a las hembras a través de una señal olfato-química. Durante la búsqueda de pareja, los machos generan un aleteo que las hembras pueden percibir y contestar de la misma manera. Ante el aleteo de las hembras, los machos liberan sus feromonas para atraerlas (Wojda *et al.*, 2020).

Estudios por parte de Spangler (1987) muestran un incremento en el aleteo realizado por machos para atraer hembras cuando éstos se encuentran cerca unos de otros o cerca de otros insectos (a excepción de abejas hospedantes). Es posible que el espacio en los frascos cerrados donde se mantuvieron a los adultos durante nuestro ensayo no fuera ideal para la correcta percepción de estas señales acústicas y/o químicas, o que la hembra no fuese tan exitosa en aislar el rastro de un macho particular. Futuros experimentos sobre la reproducción de *G. mellonella* podrían analizar estas posibilidades.

El estrés causado sobre la hembra también se debe considerar. La interferencia causada por los machos podría conllevar a una disminución en la tasa de oviposición, como lo ha comparado Gibbs *et al.* (2005) en *Pararge aegeria* con otras especies de polilla; *P. aegeria* es capaz de cambiar entre estrategias de oviposición dependiendo del tiempo disponible para la elección de una planta huésped, con presencia de machos que lo hicieran limitante (muchos huevos pequeños), o ante la ausencia de ellos (pocos huevos de gran tamaño). Esta estrategia no se ha observado en *G. mellonella*, por lo cual debe considerarse la posibilidad de que existiera un comportamiento alternativo.

Por último, es posible que una hembra ya apareada o grávida no responda al aleteo de los machos en la misma manera en que lo hace una hembra virgen, lo que disminuiría la tasa de liberación de la feromona por parte de los machos (Spangler, 1987).

Ensayos de patogenicidad y virulencia

Durante los primeros ensayos, se observó una clara diferencia entre los números de larvas que llegaron a su estado adulto y el porcentaje de mortalidad registrado. Este es un resultado esperado debido al estado inactivo de *M. anisopliae* como patógeno dentro del cepario, lo que causa una disminución en su nivel de virulencia y patogenicidad.

Aun así, la inoculación de las larvas con esporas en suspensión parece preceder a

eventos de ecdisis y una consecuente aceleración del cambio de estado a pupa. Larvas obtenidas de los mismos grupos de huevos, de tamaño comparable pero inoculadas con agua destilada y estéril, continuaron su desarrollo previo al cambio de estado por un mínimo de 20 días.

A diferencia de ellas, aquellas utilizadas dentro del ensayo con el entomopatógeno experimentaron veloces cambios de una o más exuvias, en múltiples casos conllevando a un cambio de estado hacia pupa en pocos días. El tiempo mínimo observado para que las larvas inoculadas con la suspensión de esporas cambiaran a un estado de pupa fue de dos días. Este comportamiento coincide con una de las estrategias post-contacto observadas en varias especies de insectos para evitar la infección por hongos entomopatógenos (Kim & Roberts, 2012).

Además, un ensayo realizado por Meylaers *et al.* (2007) sobre la respuesta inmune de *G. mellonella* ante infecciones bacterianas registró una diferencia significativa para cada estado de desarrollo, con el estado pupal presentando el nivel más efectivo, pero también acotando que acortó los tiempos de desarrollo, de manera similar a lo observado en nuestro estudio.

Una prueba de H de Kruskal-wallis denotó que no existieron diferencias significativas en los tiempos de mortalidad entre nuestros tres pases consecutivos por las larvas, lo cual también puede observarse a través de un gráfico de caja y bigotes (Figura 15).

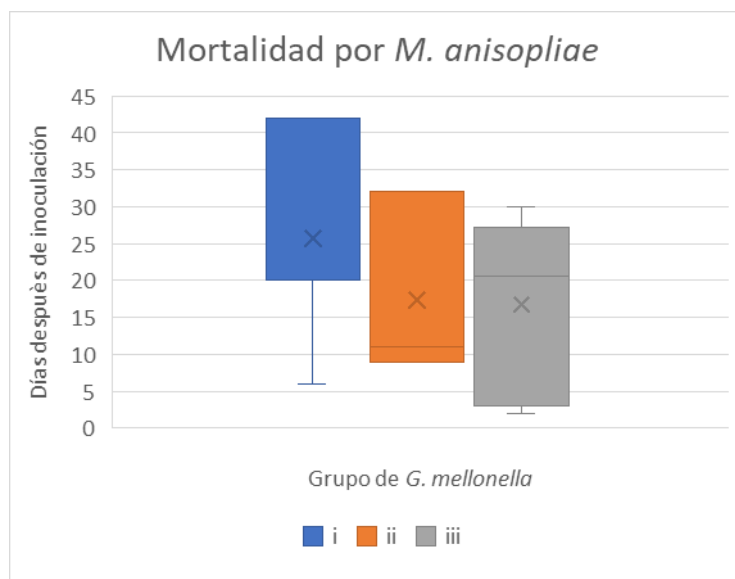


Figura 15. Comparación de la varianza del tiempo desde la inoculación hasta la mortalidad en los grupos (I, II, III) utilizados para los pases consecutivos de *M. anisopliae* a través de *G. mellonella*.

Una posible explicación para estos resultados sería que el número de pases que realizamos fue demasiado bajo para que se presentaran valores lo suficientemente diferentes. Otro posible factor es el uso de *G. mellonella* en sí; si bien *M. anisopliae* tiende a un rango amplio de hospedantes, estudios por parte de Schrank & Vainstein (2010) han determinado que las toxinas de ciertas cepas son más específicas hacia determinados organismos. Los insectos hospedantes de este entomopatógeno se encuentran mayormente bajo el orden Coleoptera, y

ciertos grupos genéticos de *M. anisoplae* pertenecientes a ambientes tropicales y subtropicales han registrado una preferencia hacia Coleoptera, Orthoptera, y Hemiptera (Zimmerman, 2007).

Si bien se presentaron claras diferencias en nuestros tiempos TL50 y TL95 para los dos grupos considerados, un ensayo que procurara más pases del entomopatógeno a través de las larvas ayudaría a corroborar y solidificar estos resultados.

Sería de interés para ensayos futuros determinar el comportamiento en ambos grupos de adultos, y registrar si estas variaciones afectan otros procesos de interés como la morfología de los individuos y su tasa de fertilidad.

CONCLUSIONES

La elaboración de un pie de cría resultó exitoso a corto plazo, sin embargo, la falta de un control adecuado sobre las condiciones de temperatura y humedad causó que las tasas de emergencia y crecimiento aún fueran influenciadas por las condiciones externas. Si bien *G. mellonella* es de mantenimiento relativamente sencillo, un habitáculo condicionado para evitar cambios inesperados probablemente elevaría el éxito y la velocidad para conseguir larvas de instares apropiados para la experimentación.

Aun así, podemos confirmar que *G. mellonella* es un excelente candidato como modelo biológico para el trabajo con cepas de hongos entomopatógenos en la provincia de Misiones.

En cuanto a la virulencia de nuestra cepa de *M. anisopliae*, observamos una marcada diferencia entre nuestros resultados del primer y segundo pase a través del hospedador. El registro de comportamientos de evasión de patógenos como la ecdisis y una metamorfosis acelerada en relación al promedio esperado demuestran que nuestras larvas reaccionaron ante la presencia del entomopatógeno, y la aceleración de los mismos durante el segundo pase parecen indicar un incremento en el nivel de virulencia y patogenicidad del hongo a comparación de su estado inicial en el cepario, por lo cual nuestra hipótesis se confirma.

Finalmente, el protocolo de cría para *G. mellonella* fue establecido y se encuentra a disposición para su utilización en Biofábrica S.A. bajo el número de protocolo PtBI0002.

BIBLIOGRAFÍA

- Álcazar Alba, M. D.; J. E. Belda Suárez; P. Barranco Vega; & T. Cabello García. 2000. Parasitoides de especies plaga en hortícolas de invernaderos de Almería. *Agricultura*.
- Araújo, J.; & D. Hughes. 2016. Diversity of Entomopathogenic Fungi. *Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi*, pp.1-39.
- Badii, M. H.; & J. L. Abreu. 2006. Control biológico una forma sustentable de control de plagas (Biological control a sustainable way of pest control). *Daena: International Journal of Good Conscience*, 1(1), 82-89.
- Blackwell, M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American journal of botany*, 98(3), 426-438.
- Bich, G. A.; M. L., Castrillo; M. R., Silva; G. V., Díaz; L. L., Villalba; P. D., Zapata; & M. G., Medvedeff. 2015. Hongos entomopatógenos en la provincia de Misiones: Revisión. *Revista de Ciencia y Tecnología*, (23), 54–58.
https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-75872015000100009
- Browne, N., & K. Kavanagh. 2013. Developing the potential of using *Galleria mellonella* larvae as models for studying brain infection *Bylisteria monocytogenes*. *Virulence*, 4(4), 271–272.
<https://doi.org/10.4161/viru.24174>
- Charrière, Jean-Daniel; & A. Imdorf. 1999. Protection of honey combs from wax moth damage. *American Bee Journal*. 139. 627-630.
- Ferron, P. 1978. Biological Control of Insect Pests by Entomogenous Fungi. *Annual Review of Entomology*, 23(1), pp.409-442.
- Fuchs, B. B.; E., O'Brien; J. B., El Khoury; & E., Mylonakis. 2010. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence*, 1(6), 475–482.
<https://doi.org/10.4161/viru.1.6.12985>
- Gibbs, M.; L. A. Lace; M. J., Jones; & A. J., Moore. 2005. Egg size-number trade-off and a decline in oviposition site choice quality: Female Pararge Aegeria butterflies pay a cost of having males present at oviposition. *Journal of Insect Science*, 5(1).
<https://doi.org/10.1093/jis/5.1.39>
- Girotti, N. 2015. Guidelines for using sodium hypochlorite as a disinfectant for biological waste. Western University Canada. <https://www.uwo.ca/animal-research/doc/bleach-sop.pdf>
- Hawksworth, D. L.; & A. Y., Rossman. 1997. Where are all the undescribed fungi?. *Phytopathology*, 87(9), 888-891.
- Kim, J. J.; & D. W., Roberts. 2012. The relationship between conidial dose, moulting and insect developmental stage on the susceptibility of cotton aphid, *Aphis gossypii*, to conidia of *Lecanicillium attenuatum*, an entomopathogenic fungus. *Biocontrol Science and Technology*, 22(3), 319-331.
- Kwadha, C. A.; G. O. Ong'amo; P. N. Ndegwa; S. K. Raina; & A. T., Fombong. 2017. The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. *Insects*, 8(2), 61.
<https://doi.org/10.3390/insects8020061>
- Mueller, G.M. & J.P. Schmit. 2007. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodivers Conserv* 16, 1–5. <https://doi.org/10.1007/s10531-006-9117-7>
- Paddock, F. B. 1918. *The beemoth or waxworm* (No. 231). Texas Agricultural and Mechanical

College System.

- Pozo-Velázquez, E. 2020. ABC de los Bioinsumos Agrícolas, Editorial GESICAP, Ecuador, 130 pp. 85 cit. 47 ref.
- Little, A. E.; T, Murakami.; U. G, Mueller.; & C. R, Currie. 2003. The infrabuccal pellet piles of fungus-growing ants. *Naturwissenschaften*, 90(12), 558-562.
- Lucarotti, C. J., & M. B., Klein. 1988. Pathology of *Coelomomyces stegomyiae* in adult *Aedes aegypti* ovaries. *Canadian journal of botany*, 66(5), 877-884.
- Meylaers K; D., Freitag; & L., Schoofs. 2007. Immunocompetence of *Galleria mellonella*: sex- and stage-specific differences and the physiological cost of mounting an immune response during metamorphosis. *J Insect Physiol.*; 53(2):146-56. doi: 10.1016/j.jinsphys.2006.11.003. Epub 2006 Nov 21. PMID: 17198709.
- Roberts, D. W.; & R. A, Humber. 1981. Entomogenous fungi. *Biology of conidial fungi*, 2(201), e236.
- Roberts, D.; J., Fuxa; R., Gaugler; M., Goerrel; R., Jaques; & J., Maddox. 1991. Use of pathogens in insect control. *Handbook of Pest Management in Agriculture*, 2, 243-278.
- Samson, R. A.; H. C., Evans; & J. P, Latgé. 1988. Taxonomy of entomopathogenic fungi. In *Atlas of entomopathogenic fungi* (pp. 5-16). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Sandall, E. L., & B., Fischer. 2019. Be a professional: Attend to the Insects. *American Entomologist*, 65(3), 176–179. <https://doi.org/10.1093/ae/tmz044>
- Schrank, A. & M. H., Vainstein. 2010. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56(7), 1267–1274. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.008>
- Shah, P.; & J., Pell. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5-6), pp.413-423.
- Spangler, H. G. 1987. Acoustically mediated pheromone release in *Galleria Mellonella* (lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Insect Physiology*, 33(7), 465–468. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(87\)90109-0](https://doi.org/10.1016/0022-1910(87)90109-0)
- Stork, N.; J., McBroom; C., Gely; & A., Hamilton. 2015. New approaches narrow global species estimates for beetles, insects, and terrestrial arthropods. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(24), pp.7519-7523.
- Sung-Oui, S. U. H.; J. V., McHugh; D. D., Pollock; & M., Blackwell. 2005. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. *Mycological research*, 109(3), 261-265.
- Vega, F. E.; & M., Blackwell. 2005. *Insect-fungal associations: ecology and evolution*. Oxford University Press.
- Wojda, I.; B., Staniec; M., Sulek; & J., Kordaczuk. 2020. The greater wax moth *Galleria mellonella*: Biology and use in immune studies. *Pathogens and Disease*, 78(9). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa057>
- Zimmermann, G. 2007. "Review on Safety of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*". *Biocontrol Science and Technology* 17 (9): 879–920. doi:10.1080/09583150701593963.

ANEXO I: Tablas

Tabla 1. Las agrupaciones en las relaciones de sexo expuestas en el ensayo. Cada línea de la columna izquierda representa a un tipo de agrupación. La columna de la derecha representa el número de frascos que existió para cada agrupación.

Machos:Hembras	# Frascos
1:1	6
2:1	6
3:1	1
4:1	4
5:1	2
6:1	1
1:2	2

Tabla 2. Oviposiciones cuantificadas según relaciones [macho:hembra] para los frascos I a VII.

FECHA	I	II	III	IV	V	VI	VII
	[2:1]	[3:1]	[4:1]	[5:1]	[2:1]	[4:1]	[1:2]
17/02/2022	445	50	103	568			
18/02/2022	132	284	11	0	1216		
21/02/2022	40	80	0	153	725	405	
22/02/2022	0	0	0	0	55	16	
23/02/2022	0	250		0	24	0	705
24/02/2022	0	61			10		410
25/02/2022	0	53			407		115
02/03/2022	123	0			200		176
03/03/2022					0		
04/03/2022					0		
TOTAL	740	778	114	721	2637	421	1406

Tabla 3. Oviposiciones cuantificadas según relaciones [macho:hembra] para los frascos VIII a XIV.

FECHA	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
	[1:1]	[1:2]	[2:1]	[1:1]	[1:1]	[4:1]	[4:1]
23/02/2022	570						
24/02/2022	40	705	155				
25/02/2022	0	700	11	970			
02/03/2022	0	325	15	210			
03/03/2022		25	0	0	1017	291	310
04/03/2022		0		0	150	80	14
08/03/2022							0
TOTAL	610	1755	181	1180	1167	371	324

Tabla 4. Oviposiciones cuantificadas según relaciones [macho:hembra] para los frascos XV a XXII.

FECHA	XV	XVI	XVII	XVIII [1:1]	XIX	XX	XXI	XXII
	[2:1]	[5:1]	[6:1]		[1:1]	[1:1]	[2:1]	[2:1]
03/03/2022	300							
04/03/2022	210	200						
08/03/2022	154	65	40					
09/03/2022	0	44	0	992				
10/03/2022	20	0	0	365				
14/03/2022	18	0	12	445	1370	387	600	
15/03/2022				37	35	131	80	0
16/03/2022				36	0	0	51	0
17/03/2022				33	0	18	22	0
18/03/2022				30	0	24	24	8
21/03/2022				0	0	0	0	0
TOTAL	702	309	52	1938	1405	560	777	8

Tabla 5. Promedio de oviposiciones observadas para cada agrupación según la relación de sexos.

MACHO:HEMBRA	[1:1]	[2:1]	[3:1]	[4:1]	[5:1]	[6:1]	[1:2]
Media de oviposiciones	1143,3	840,83	778	307,5	515	52	1580,5

Tabla 6. Registro de caracteres cualitativos observados (coloración, apariencia, comportamiento, fase de desarrollo) para cada caso de inoculación (números 1 a 10) realizado el 5 de abril de 2022.

GRUPO	144 hs (6 días)			312 hs (13 días)			480 hs (20 días)			720 hs (30 días)			1008 hs (42 días)		
	COLOR	APAR	COMP	COLOR	APAR	COMP	COLOR	APAR	COMP	COLOR	APAR	COMP	COLOR	APAR	COMP
GM-1	CN	P	CE	CN	P, SR	CE	CN	P, SR	CE	CN	P, SR	X	CRMa		
GM-2	CN	AE	CE	CN	P	CE	CO	P	CE	CO	IM	CE	D		
GM-3	CN	AN, CD	PM	CN	P	CE	CO	P	CE	CO	IH	CE	D		
GM-4	CN	AN	CE	CN	AN	PM	CO	P	CE	CO	P, SR	CE	CRMa		
GM-5	CN	AN	CE	CN	TR	PM	CO	TR	X	CO	TR, SR	X	CRMa		
GM-6	CN	AE	CE	CN	AE	CE	CN	P	CE	CN	IH	CE	D		
GM-7	CN	AE	PM	CN	AE	PM	CN	P	X	CN	P	X	X		
GM-8	CN	AN, CD	CE	CN	P	CE	CN	P	CE	CN	IH	CE	D		
GM-9	CN	AE	PM	CA	P	CE	CN	P, SR	CE	CN	P, SR	CE	CRMa		
GM-10	CN	P	CE	CN	P	CE	CN	IH, AN	CE	CN	IH	CE	D		
Referencias: CN: coloración normal; CO: coloración oscura; CA: coloración amarillenta; AN: aspecto normal; SR: superficie rugosa; AE: aspecto ensanchado; TR: tamaño reducido; CD: capullo de seda denso; P: estado pupal; IM: imago macho; IH: imago hembra; CE: comportamiento esperado; PM: poco móvil; X: individuo muerto; D: individuo descartado para este ensayo; CRMa: crecimiento de <i>Metarhizium anisopliae</i> detectado.															

Tabla 7. Registro de caracteres cualitativos observados (coloración, apariencia, comportamiento, fase de desarrollo) para cada caso de inoculación (números 12 al 21) realizado el 12 de abril de 2022. El caso GM-4 fue descartado previo a la primera toma de datos debido a pérdida del individuo por motivos externos.

GRUPO	144 hs (6 días)			312 hs (13 días)			480 hs (20 días)			720 hs (30 días)			1008 hs (42 días)		
	COLOR	APAR	COMP	COLOR	APAR	COMP	COLOR	APAR	COMP	COLOR	APAR	COMP	COLOR	APAR	COMP
GM-12	CN	AN	CE	CN	P	CE	CN	P	CE	CN	IH, AN	CE	D		
GM-13	CN	P	CE	CN	P	CE	CN	IM, AN	CE	CN	IM, AN	CE	D		
GM-14	CN	P	CE	CN	P	CE	CN	IH, AN	CE	CN	IH, AN	CE	D		
GM-15	CN	P	CE	CN	P	CE	CN	IM, AN	CE	CN	IM, AN	CE	D		
GM-16	CN	P	CE	CN	P	CE	CN	IH, AN	CE	CN	IH, AN	CE	D		
GM-17	CN	AN	X	CRMa			CRMa			CRMa			CRMa		
GM-18	CN	P	CE	CN	P	CE	CN	IH, AN	CE	CO	IH, AN	CE	D		
GM-4	CN	P	CE	CN	P	CE	CN	P	CE	CO	P, TR	CE	CRMa		
GM-20	CN	AN	PM	CN	P, TR	CE	CN	IM, AN	CE	CN	IM, AN	CE	D		
GM-21	CN	AN	PM	CN	P	CE	CN	IH, AN	CE	CN	IH, AN	CE	D		
Referencias: CN: coloración normal; CO: coloración oscura; CA: coloración amarillenta; AN: aspecto normal; SR: superficie rugosa; AE: aspecto ensanchado; TR: tamaño reducido; CD: capullo de seda denso; P: estado pupal; IM: imago macho; IH: imago hembra; CE: comportamiento esperado; PM: poco móvil; X: individuo muerto; D: individuo descartado para este ensayo; CRMa: crecimiento de <i>Metarhizium anisopliae</i> detectado.															

Tabla 8. Porcentaje de fases y anormalidades para los casos de larvas inoculadas con *M. anisopliae* 100_01 y aquellas inoculadas con agua destilada (Control) en la fecha 19 de abril de 2022.

Fecha	Prueba				Control			
	L. Normales	L. Anormales	Pupas	Imagos	Larvas Normales	Larvas Anormales	Pupas	Imagos
19/04/2022	100,00	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00
20/04/2022	80,00	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00
21/04/2022	60,00	20,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00
25/04/2022		80,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00
26/04/2022		80,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00
27/04/2022		80,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00
28/04/2022		20,00	60,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00
29/04/2022		20,00	60,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00
02/05/2022		20,00	60,00	0,00	80,00	20,00	0,00	0,00
03/05/2022		20,00	60,00	0,00	80,00	20,00	0,00	0,00
04/05/2022		20,00	60,00	0,00	80,00	20,00	0,00	0,00
05/05/2022		20,00	60,00	0,00	80,00	20,00	0,00	0,00
06/05/2022		20,00	60,00	0,00		80,00	20,00	0,00
09/05/2022		20,00	60,00	0,00		80,00	20,00	0,00
10/05/2022		20,00	40,00	20,00		80,00	20,00	0,00
11/05/2022			40,00	40,00		80,00	0,00	20,00
12/05/2022			20,00	60,00		60,00	20,00	20,00
13/05/2022				80,00		60,00	20,00	20,00
16/05/2022						60,00		40,00
17/05/2022						60,00		40,00
19/05/2022						60,00		40,00
20/05/2022						60,00		40,00
25/05/2022						60,00		40,00
27/05/2022						60,00		40,00
31/05/2022						60,00		40,00
01/06/2022						60,00		40,00
02/06/2022						60,00		40,00
03/06/2022						60,00		40,00
06/06/2022						60,00		40,00

Tabla 9. Porcentaje de individuos para cada fase del desarrollo y presencia o ausencia de anomalías o mortalidad, correspondiente al grupo I inoculado con UFC del GM-4 el día 4 de julio de 2022.

GRUPO I (%)						
Fecha	N	A	P	I	X	D
04/07/2022	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
13/07/2022	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15/07/2022	0,00	33,33	33,33	0,00	33,33	0,00
18/07/2022	0,00	0,00	66,67	0,00	33,33	0,00
20/07/2022	0,00	0,00	66,67	0,00	33,33	0,00
22/07/2022	0,00	0,00	66,67	0,00	33,33	0,00
04/08/2022	0,00	0,00	33,33	33,33	33,33	0,00
05/08/2022	0,00	0,00	0,00	66,67	33,33	0,00
Referencias: N: individuo vivo normal, A: individuo vivo con características anormales, P: Pupa, X: individuo muerto, D: individuo descartado por motivos ajenos al estudio						

Tabla 10. Porcentaje de individuos para cada fase del desarrollo y presencia o ausencia de anomalías o mortalidad, correspondiente al grupo II inoculado con UFC del GM-4 el día 4 de julio de 2022.

GRUPO II (%)						
Fecha	N	A	P	I	X	D
04/07/2022	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
13/07/2022	33,33	0,00	0,00	0,00	0,00	66,67
15/07/2022	33,33	0,00	0,00	0,00	0,00	66,67
18/07/2022	0,00	33,33	0,00	0,00	0,00	66,67
20/07/2022	0,00	33,33	0,00	0,00	0,00	66,67
22/07/2022	0,00	33,33	0,00	0,00	0,00	66,67
04/08/2022	0,00	0,00	33,33	0,00	0,00	66,67
05/08/2022	0,00	0,00	33,33	0,00	0,00	66,67
Referencias: N: individuo vivo normal, A: individuo vivo con características anormales, P: Pupa, X: individuo muerto, D: individuo descartado por motivos ajenos al estudio						

Tabla 11. Porcentaje de individuos para cada fase del desarrollo y presencia o ausencia de anomalías o mortalidad, correspondiente al grupo III inoculado con UFC del GM-4 el día 4 de julio de 2022.

GRUPO III (%)						
Fecha	N	A	P	I	X	D
04/07/2022	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
13/07/2022	66,67	0,00	0,00	0,00	33,33	0,00
15/07/2022	66,67	0,00	0,00	0,00	33,33	0,00
18/07/2022	66,67	0,00	0,00	0,00	33,33	0,00
20/07/2022	33,33	0,00	33,33	0,00	33,33	0,00
22/07/2022	33,33	0,00	33,33	0,00	33,33	0,00
04/08/2022	0,00	33,33	0,00	33,33	33,33	0,00
05/08/2022	0,00	0,00	0,00	33,33	66,67	0,00
Referencias: N: individuo vivo normal, A: individuo vivo con características anormales, P: Pupa, X: individuo muerto, D: individuo descartado por motivos ajenos al estudio						

Tabla 12. Porcentaje de individuos para el grupo de Control a lo largo de la Prueba n°4. Referencias: (N) larvas normales, (A) larvas con presencia de anomalías, (P) pupa normal, (F) pupa con presencia de anomalías, (X) individuo muerto, (M) individuo con crecimiento de *M. anisopliae*, (D) individuo descartado del estudio.

CONTROL								
Fecha	N%	A%	P%	F%	I%	X%	M%	D%
03/10/2022	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
05/10/2022	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
09/10/2022	83,33	0,00	16,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12/10/2022	83,33	0,00	16,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14/10/2022	83,33	0,00	16,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17/10/2022	83,33	0,00	16,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19/10/2022	83,33	0,00	16,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
21/10/2022	83,33	0,00	16,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24/10/2022	33,33	0,00	66,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
26/10/2022	0,00	0,00	83,33	0,00	16,67	0,00	0,00	0,00
28/10/2022	0,00	0,00	66,67	0,00	33,33	0,00	0,00	0,00
31/10/2022	0,00	0,00	66,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
02/11/2022	0,00	0,00	66,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
04/11/2022	0,00	0,00	50,00	0,00	16,67	0,00	0,00	0,00
07/11/2022	0,00	0,00	50,00	0,00	16,67	0,00	0,00	0,00

Tabla 13. Porcentaje de individuos para el tratamiento con esporas en suspensión de la colonia GM-1 a lo largo de la Prueba n°4. Referencias: (N) larvas normales, (A) larvas con presencia de anomalías, (P) pupa normal, (F) pupa con presencia de anomalías, (X) individuo muerto, (M) individuo con crecimiento de *M. anisopliae*, (D) individuo descartado del estudio.

GM-1								
Fecha	N%	A%	P%	F%	I%	X%	M%	D%
03/10/2022	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
05/10/2022	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
09/10/2022	66,67	0,00	33,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12/10/2022	0,00	0,00	66,67	33,33	0,00	0,00	0,00	0,00
14/10/2022	0,00	0,00	66,67	33,33	0,00	0,00	0,00	0,00
17/10/2022	0,00	0,00	66,67	33,33	0,00	0,00	0,00	0,00
19/10/2022	0,00	0,00	66,67	33,33	0,00	0,00	0,00	0,00
21/10/2022	0,00	0,00	66,67	33,33	0,00	0,00	0,00	0,00
24/10/2022	0,00	0,00	66,67	33,33	0,00	0,00	0,00	0,00
26/10/2022	0,00	0,00	66,67	33,33	0,00	0,00	0,00	0,00
28/10/2022	0,00	0,00	16,67	0,00	50,00	33,33	0,00	0,00
31/10/2022	0,00	0,00	0,00	0,00	33,33	0,00	0,00	0,00
02/11/2022	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
04/11/2022	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
07/11/2022	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 14. Porcentaje de individuos para el tratamiento con esporas en suspensión de la colonia GM-9 a lo largo de la Prueba nº4. Referencias: (N) larvas normales, (A) larvas con presencia de anormalidades, (P) pupa normal, (F) pupa con presencia de anormalidades, (X) individuo muerto, (M) individuo con crecimiento de *M. anisopliae*, (D) individuo descartado del estudio.

GM-9								
Fecha	N%	A%	P%	F%	I%	X%	M%	D%
03/10/2022	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
05/10/2022	83,33	0,00	0,00	0,00	0,00	16,67	0,00	0,00
09/10/2022	33,33	16,67	33,33	0,00	0,00	16,67	0,00	0,00
12/10/2022	16,67	16,67	50,00	0,00	0,00	16,67	0,00	0,00
14/10/2022	0,00	16,67	66,67	0,00	0,00	16,67	0,00	0,00
17/10/2022	0,00	16,67	33,33	16,67	0,00	16,67	16,67	0,00
19/10/2022	0,00	16,67	33,33	16,67	0,00	16,67	16,67	0,00
21/10/2022	0,00	16,67	33,33	16,67	0,00	16,67	16,67	0,00
24/10/2022	0,00	16,67	16,67	16,67	16,67	16,67	16,67	0,00
26/10/2022	0,00	16,67	16,67	16,67	16,67	16,67	16,67	0,00
28/10/2022	0,00	16,67	0,00	0,00	50,00	16,67	16,67	0,00
31/10/2022	0,00	16,67	0,00	0,00	16,67	16,67	16,67	0,00
02/11/2022	0,00	0,00	0,00	0,00	16,67	16,67	33,33	0,00
04/11/2022	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
07/11/2022	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 15. Porcentaje de individuos para el tratamiento con esporas en suspensión de la colonia GM-4 a lo largo de la Prueba nº4. Referencias: (N) larvas normales, (A) larvas con presencia de anormalidades, (P) pupa normal, (F) pupa con presencia de anormalidades, (X) individuo muerto, (M) individuo con crecimiento de *M. anisopliae*, (D) individuo descartado del estudio.

GM-4								
Fecha	N%	A%	P%	F%	I%	X%	M%	D%
03/10/2022	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
05/10/2022	66,67	0,00	16,67	0,00	0,00	16,67	16,67	0,00
09/10/2022	16,67	16,67	33,33	0,00	0,00	33,33	33,33	0,00
12/10/2022	16,67	16,67	33,33	0,00	0,00	33,33	33,33	0,00
14/10/2022	16,67	16,67	33,33	0,00	0,00	33,33	33,33	0,00
17/10/2022	16,67	16,67	33,33	0,00	0,00	33,33	33,33	0,00
19/10/2022	0,00	16,67	33,33	0,00	0,00	50,00	50,00	0,00
21/10/2022	0,00	16,67	33,33	0,00	0,00	50,00	50,00	0,00
24/10/2022	0,00	16,67	16,67	0,00	16,67	50,00	50,00	0,00
26/10/2022	0,00	16,67	16,67	0,00	16,67	50,00	50,00	0,00
28/10/2022	0,00	16,67	0,00	0,00	33,33	50,00	50,00	0,00
31/10/2022	0,00	0,00	0,00	0,00	33,33	66,67	50,00	0,00
02/11/2022	0,00	0,00	0,00	0,00	33,33	66,67	50,00	0,00
04/11/2022	0,00	0,00	0,00	0,00	33,33	66,67	50,00	0,00
07/11/2022	0,00	0,00	0,00	0,00	33,33	66,67	50,00	0,00

ANEXO II: Figuras

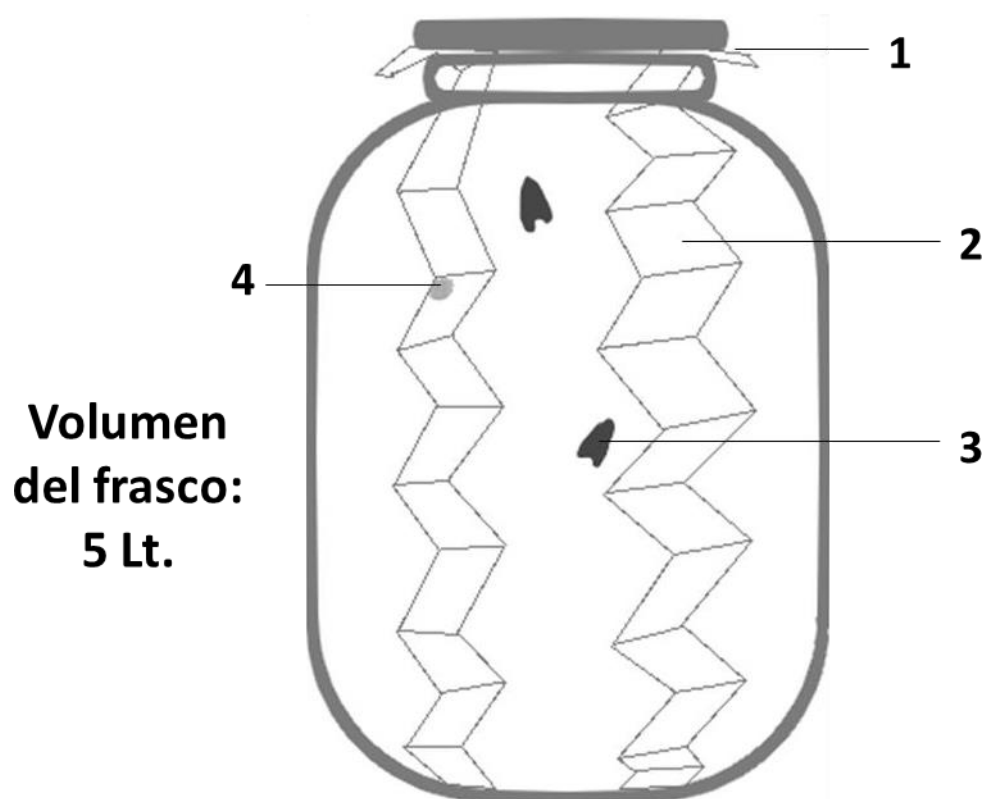


Figura 1. Representación de los frascos del área de reproducción. (1) Apertura para el intercambio de gases, (2) papel de filtro con pliegues, (3) adulto reproductor, (4) huevos agrupados.

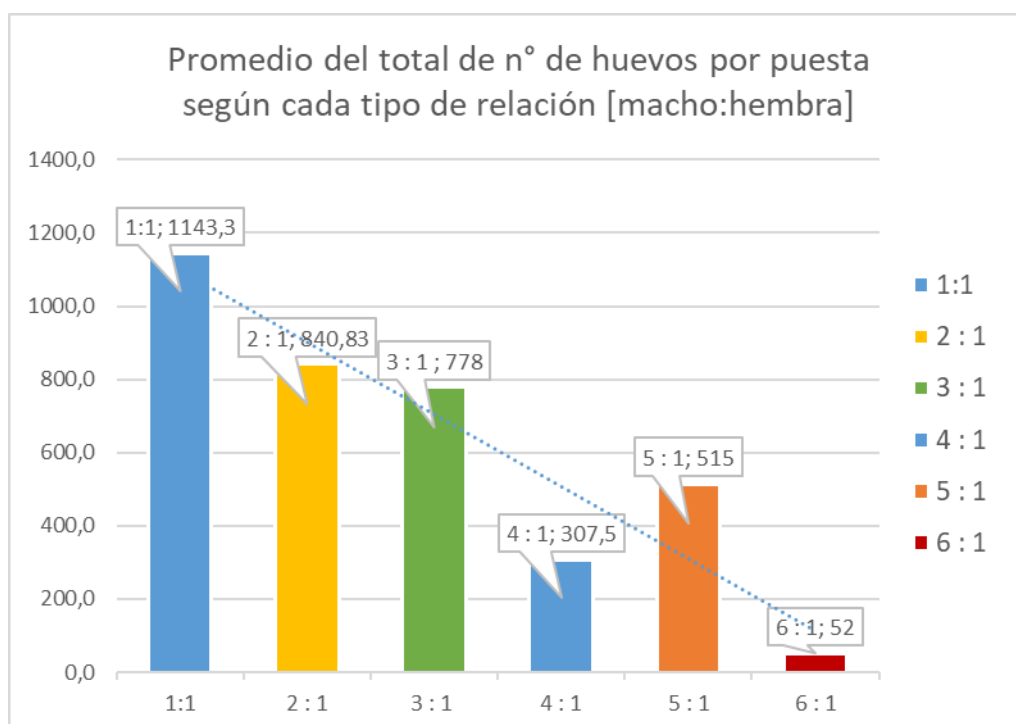


Figura 2. Comparación entre las medias del número de oviposiciones de los grupos de adultos reproductores según cada tipo de relación [macho:hembra] en los cuales los números relativos de las hembras eran inferiores a aquellos de los machos. La línea de puntos representa la tendencia negativa que se registró ante el incremento del número relativo de machos.

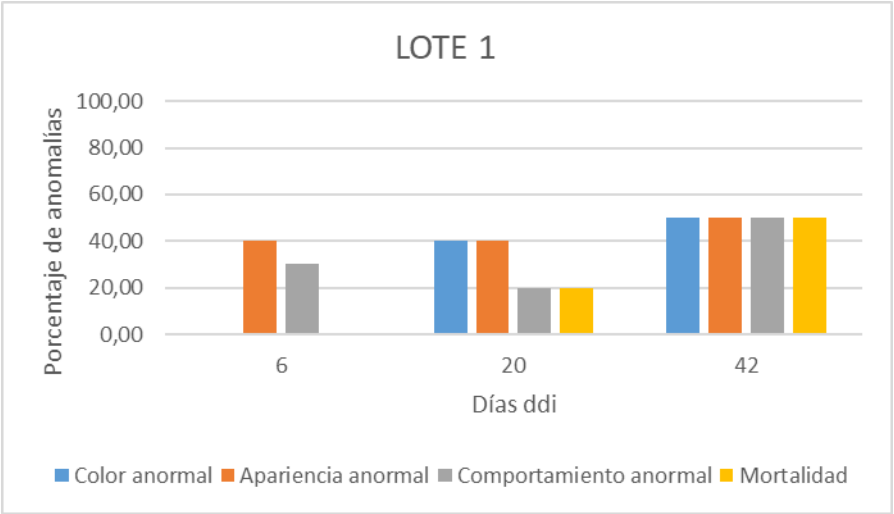


Figura 3. Porcentaje de anomalías observadas sobre el Lote 1 a las 144 horas, 480 horas, y 1008 horas luego de la inoculación.

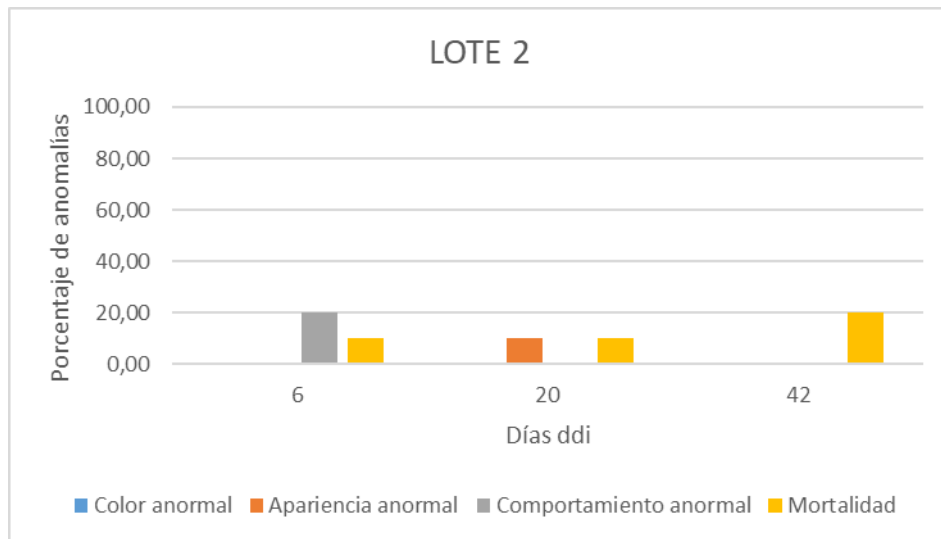


Figura 4. Porcentaje de anomalías observadas sobre el Lote 2 a las 144 horas, 480 horas, y 1008 horas luego de la inoculación.

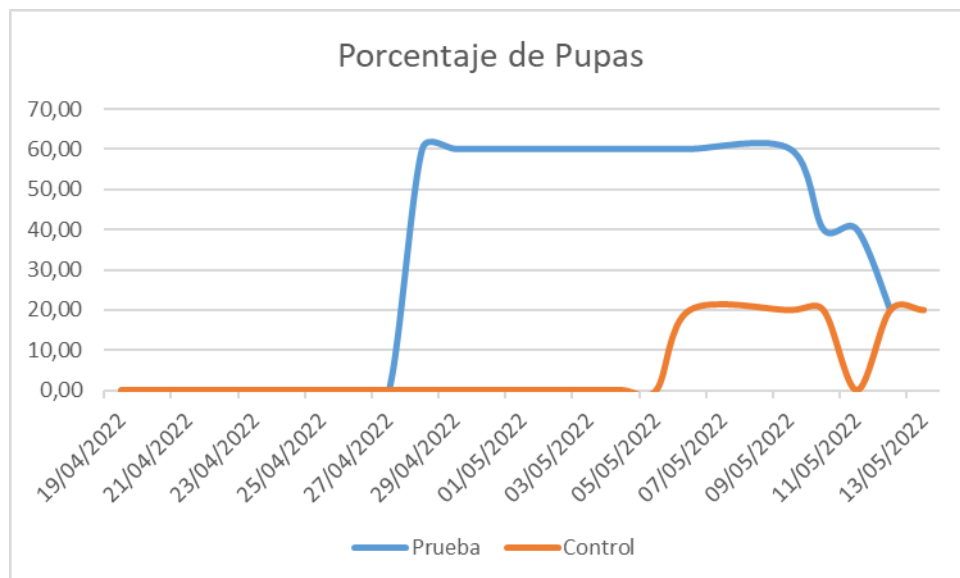


Figura 5. Tiempos observados para los porcentajes de individuos del ensayo n°2 en Prueba y Control para pasar a la fase de pupa.

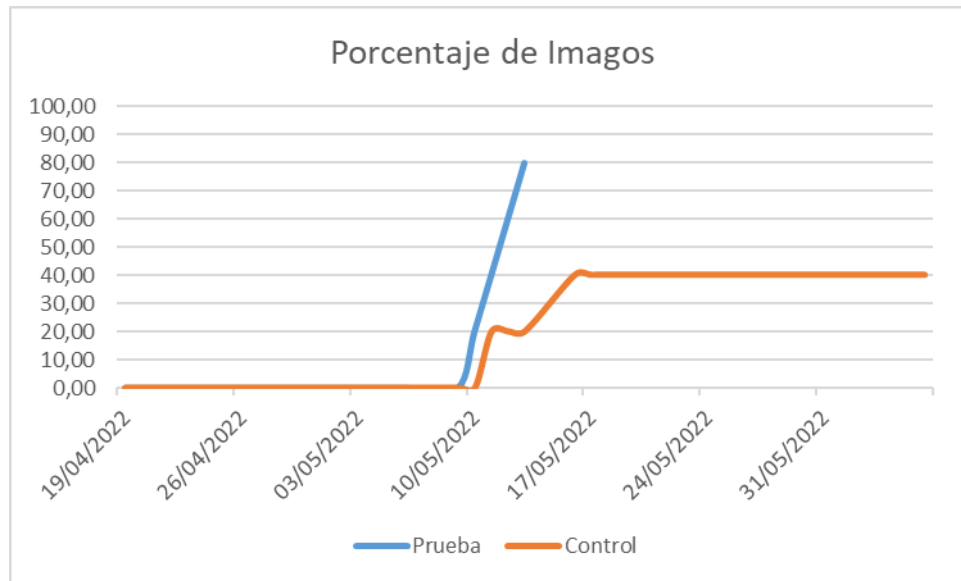


Figura 6. Tiempos observados para los porcentajes de individuos del ensayo n°2 en Prueba y Control para pasar a la fase de imago.

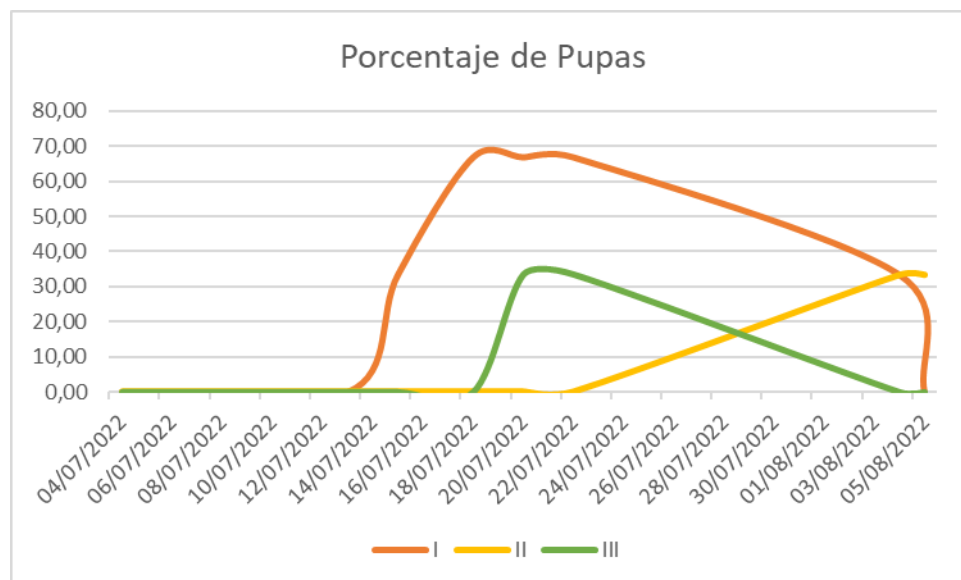


Figura 7. Porcentaje de individuos que cambiaron a la fase de pupa para cada uno de los grupos de inoculación del ensayo n°3.

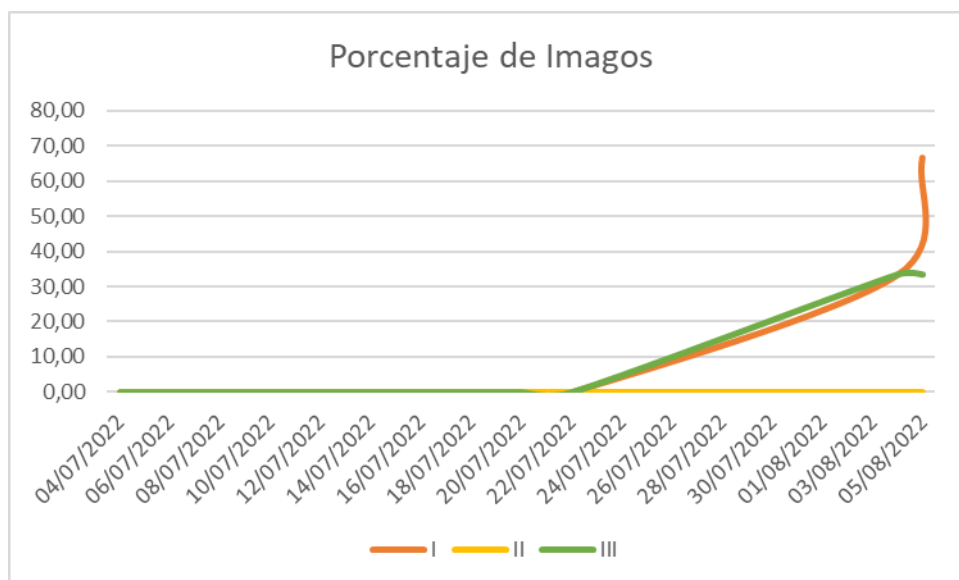


Figura 8. Porcentaje de individuos que cambiaron a la fase de imago para cada uno de los grupos de inoculación del ensayo n°3.

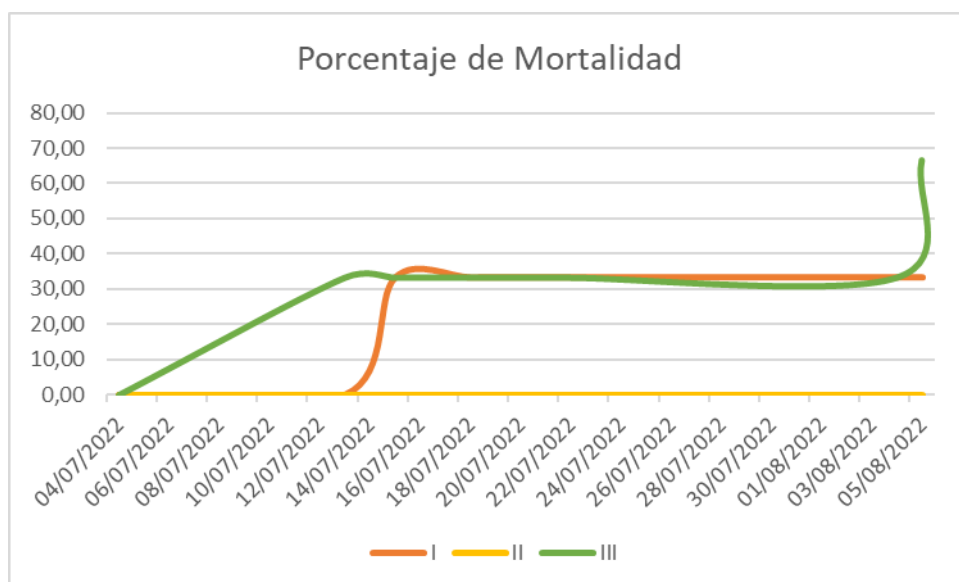


Figura 9. Porcentaje de individuos presentaron mortalidad para cada uno de los grupos de inoculación del ensayo n°3.

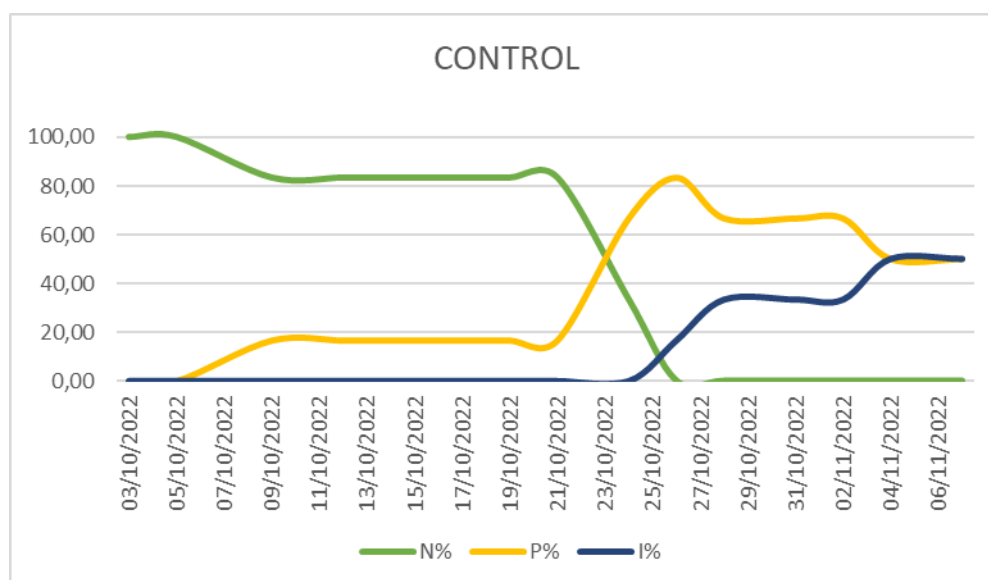


Figura 10. Porcentaje de larvas normales (N%), pupas (P%), e imagos (I%) para el grupo de Control a lo largo del experimento.

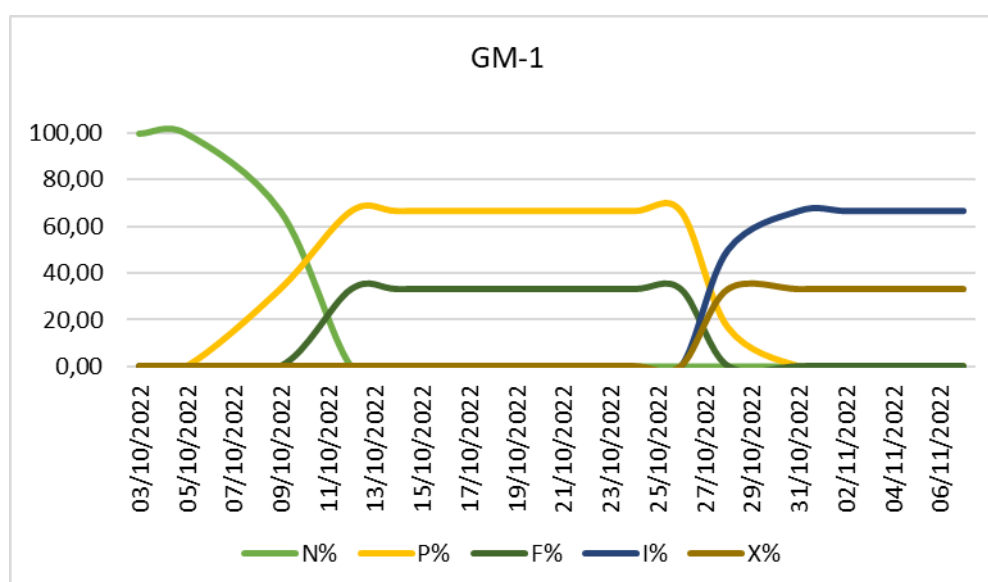


Figura 11. Porcentaje de larvas normales (N%), pupas (P%), pupas anormales (F%), imagos (I%), y mortalidad (X%) para el tratamiento con conidias de la colonia GM-1 a lo largo del experimento.

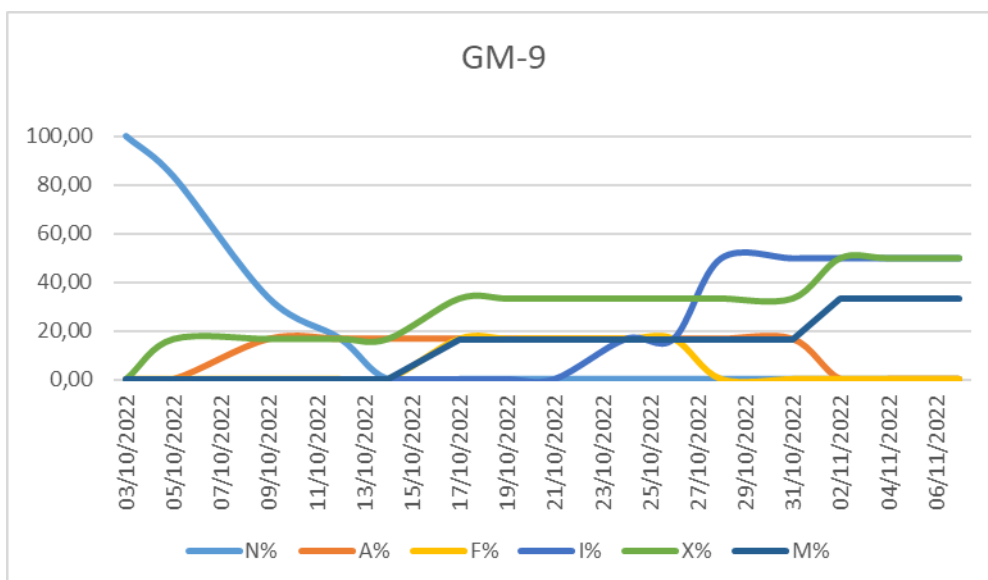


Figura 12. Porcentaje de larvas normales (N%), larvas anormales (A%), pupas anormales (F%), imagos (I%), mortalidad (X%), y presencia de crecimiento de *M. anisoplae* (M%) para el tratamiento con conidias de la colonia GM-9 a lo largo del experimento.

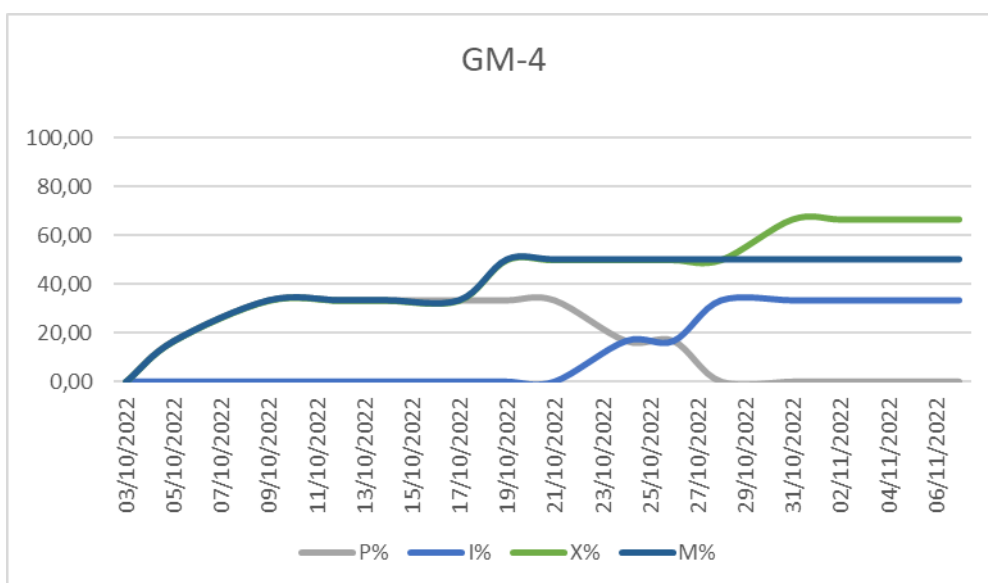


Figura 13. Porcentaje de pupas normales (P%), imagos (I%), mortalidad (X%), y presencia de crecimiento de *M. anisoplae* (M%) para el tratamiento con conidias de la colonia GM-4 a lo largo del experimento.

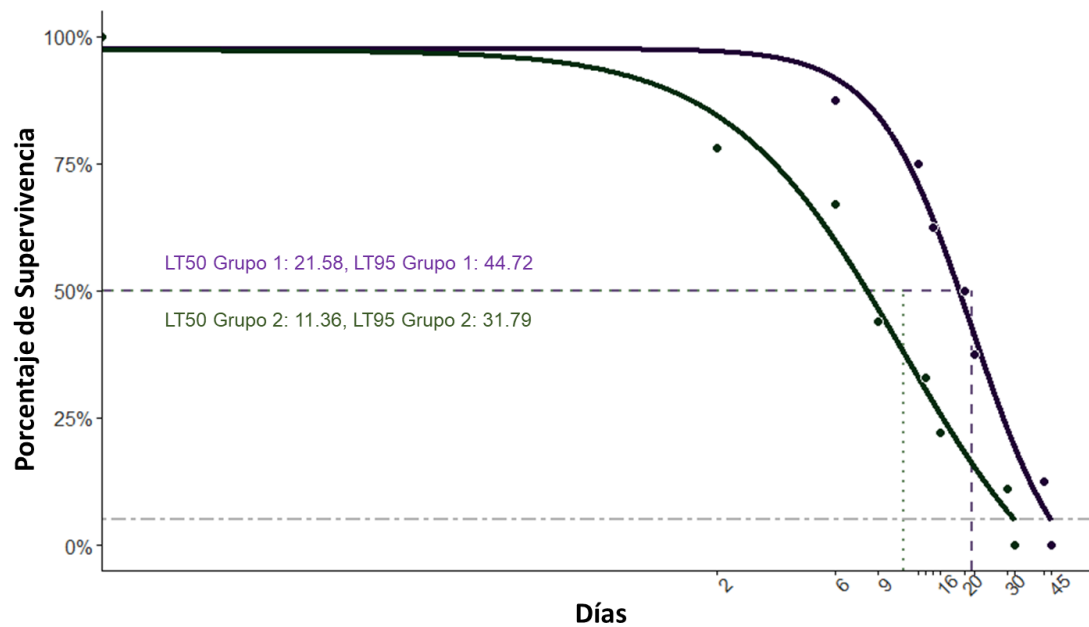


Figura 14. Representación del análisis de regresión logarítmica para la obtención de LT50 y LT95. La curva superior corresponde al Grupo 1 y la inferior al Grupo 2.

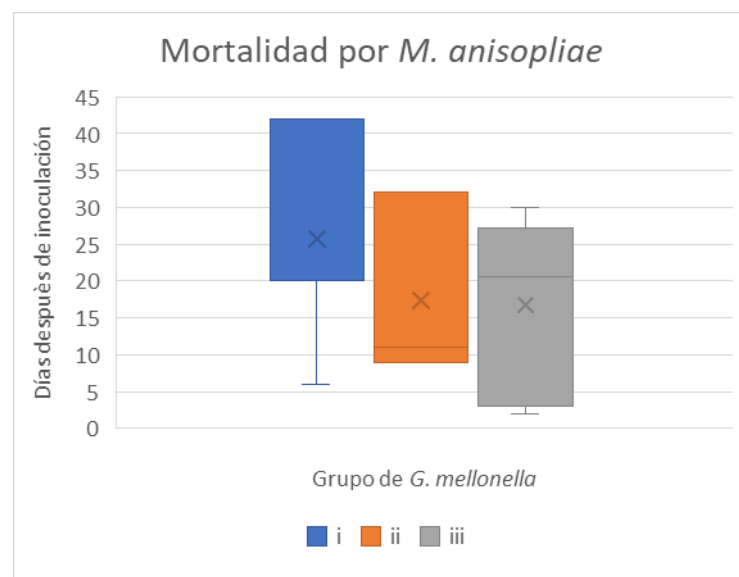


Figura 15. Comparación de la varianza del tiempo desde la inoculación hasta la mortalidad en los grupos (I, II, III) utilizados para los pases consecutivos de *M. anisopliae* a través de *G. mellonella*.