



Facultad de Ciencias
EXACTAS



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

INIBIOLP

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata
"Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner"

**DINÁMICA DE COLONIZACIÓN DE *BEAVERIA*
BASSIANA DURANTE SU ESTABLECIMIENTO
COMO ENDÓFITO EN *GLYCINE MAX***

Theo Alberto Mochen

2025



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

Trabajo Final de Laboratorio de Procesos Biotecnológicos
Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular:

Dinámica de colonización de *Beauveria bassiana* durante
su establecimiento como endófito en *Glycine max*

Estudiante: Theo Alberto Mochen

Directora: Dra. Carla Huarte Bonnet

Tutora: Ing. Daysi Espín Sánchez

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas de
La Plata (INIBIOLP)

2025

Este trabajo fue posible gracias al apoyo de la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC - PBA) gracias al otorgamiento de la Beca de Entrenamiento BENTRE24.

Este trabajo fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP) bajo la dirección de la Dra. Carla Huarte Bonnet y la tutoría de la Ing. Daysi Espín Sánchez.

Agradecimientos

A mi familia, por su amor y apoyo incondicional, y por siempre haber fomentado mi curiosidad y el amor por la ciencia. A mi mamá, mi papá, y Guille por estar ahí en cada paso, por escucharme, acompañarme, y sostenerme cuando más lo necesité. A Li, por alentarme y apoyarme a distancia desde Mar del Plata.

Al hermoso grupo de amigos que me regaló la facultad, por todas las juntadas, las rondas de mates y galletitas compartidos, y las reuniones de estudio que me ayudaron a llegar hasta aquí.

Al INIBIOLP por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de realizar el Trabajo Final en sus instalaciones y proporcionarme los medios y el espacio necesarios para su realización, y a todo el equipo y personal del L12 por la buena onda y disposición siempre. En especial a mi directora y mi tutora, Carli y Daysi, por acompañarme durante cada paso del recorrido del Trabajo Final, por su paciencia, apoyo, y siempre estar dispuestas a ayudarme y escuchar mis dudas e inquietudes.

Al gobierno de la provincia y a la CIC por financiar esta Tesis de Grado mediante la otorgación de la Beca de Entrenamiento BENTRE24.

A la UNLP y la Facultad de Ciencias Exactas, por permitirme realizar mis estudios, y a todos los docentes que formaron parte de este recorrido de cinco años por la Facultad, por ayudarme a formarme y a crecer, no sólo como biotecnólogo, pero también como persona.

A todos, mi más sincero agradecimiento. Muchas gracias por todo.

“Las semillas son invisibles. Duermen en el secreto de la tierra hasta que a una de ellas se le ocurre despertarse.”

~ Antoine de Saint-Exupéry - ‘El Principito’

ÍNDICE

ABREVIATURAS UTILIZADAS	7
INTRODUCCIÓN	8
Soja: Un Panorama Global	8
Importancia de la Soja en Argentina	8
La Planta de Soja	9
Plagas	11
Plagas Típicas en Soja	12
Plaguicidas	13
Control Biológico de Plagas	14
Hongos Entomopatógenos	16
Hongos Entomopatógenos Endófitos	19
<i>Beauveria bassiana</i>	21
Establecimiento de <i>B. bassiana</i> como Endófito en Soja	23
OBJETIVOS	25
Objetivo General	25
Objetivos Específicos	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Cultivo y mantenimiento de cepas de <i>B. bassiana</i>	26
Obtención y cuantificación de polvo de conidios	28
Bioensayo de mortalidad de <i>T. castaneum</i> frente a conidios de <i>B. bassiana</i>	30
Métodos de esterilización de semillas de soja	32
Inoculación de semillas de soja	33
Ensayo de germinación de semillas inoculadas	33
Cultivo, mantenimiento, y seguimiento de parámetros morfológicos de soja	34
Detección y seguimiento de endofitismo	36
Recolección y análisis de datos	38
Herramientas y recursos informáticos	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
Bioensayo de mortalidad de <i>T. castaneum</i> frente a conidios de <i>B. bassiana</i>	39
Métodos de esterilización de semillas de soja	44
Ensayo de germinación de semillas inoculadas	49

Seguimiento de parámetros morfológicos de soja	52
Detección y seguimiento de endofitismo	55
CONCLUSIONES	61
REFERENCIAS.....	62

ABREVIATURAS UTILIZADAS

MIP: Manejo Integrado de Plagas

EPF: “Entomopathogenic Fungi” (Hongos Entomopatógenos)

DM3810: Don Mario 3810 (Variedad de soja utilizada)

INIBIOLP: Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

PDA: “Potato Dextrose Agar” (Agar Papa)

NaClO: Hipoclorito de Sodio

EtOH: Etanol

Bb: *Beauveria bassiana*

2860: Cepa ARSEF 2860 de *Beauveria bassiana*, cepa *wild type* en este estudio

BbG4: Cepa recombinante GFP de *Beauveria bassiana*

BbG6: Cepa recombinante GFP de *Beauveria bassiana*

BbR5: Cepa recombinante RFP de *Beauveria bassiana*

INTRODUCCIÓN

Soja: Un Panorama Global

Glycine max, comúnmente conocido como soja, no es solo una planta: es uno de los pilares de la agricultura moderna. Con alrededor de 140 millones de hectáreas cultivadas a nivel mundial, ocupa el cuarto lugar en producción global luego del arroz, el maíz y el trigo (FAO). Desde sus inicios, el cultivo de la soja ha desempeñado un papel esencial en la transición de la humanidad hacia la agricultura. Los primeros registros escritos de su cultivo datan del 900 a.C. en China, donde su importancia agrícola y económica quedó documentada. Tras su domesticación, la soja se extendió rápidamente por Asia, llegando a Corea, Japón y, con el tiempo, al resto del mundo (Norberg y Deutsch, 2023).

En los últimos años, el cultivo de soja ha experimentado un crecimiento extraordinario en términos de producción y productividad, impulsado por el aumento de la demanda mundial y precios atractivos. Este avance ha sido posible gracias a la introducción de procesos innovadores, como la biotecnología y la capacitación agrícola moderna, la introducción de maquinaria masiva y la creación de cadenas de valor complejas que integran las etapas productivas, financieras y comerciales (Rocha y Villalobos, 2012). Este progreso no solo busca satisfacer la demanda global en términos de cantidad, sino también garantizar una alta calidad del grano. Por ello, mantener el buen estado del cultivo resulta crucial para evitar pérdidas en rendimiento y calidad.

Importancia de la Soja en Argentina

En los últimos cincuenta años, Argentina se ha consolidado como uno de los principales productores de soja a nivel mundial, ocupando el tercer lugar después de Brasil y Estados Unidos. La mayor parte de la soja producida en el país se destina al mercado internacional, del total, se exporta el 16% de los granos enteros, el 92% de los granos triturados y el 67% del aceite de soja (Bianchi y Szpak, 2017).

Hasta fines de la década de 1970, el cultivo de soja tenía un rol marginal en la producción agropecuaria argentina. Sin embargo, a partir de la década de 1980, este comenzó a

expandirse rápidamente gracias a la disponibilidad de nuevos terrenos cultivables en la zona de La Pampa, y el desarrollo de nuevas variedades modificadas genéticamente en la década de 1990 (Klein y Vidal Luna, 2021). En la campaña 1971/1972, la soja cubría 79.800 hectáreas, y solo una década después ya superaba los 2 millones de hectáreas. Para la campaña 1986/1987, la soja había desplazado al maíz en importancia, y en 1991/1992 también al trigo, convirtiéndose en el cultivo principal del país (Cadenazzi, 2009). En la campaña 2023/2024, la superficie sembrada alcanzó los 16,5 millones de hectáreas, con una producción estimada en 48 millones de toneladas (Ministerio de Economía; Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca; Argentina 2023). En la actualidad, la soja es el cultivo predominante en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba, donde representa más del 40% del área cultivada total.

La Planta de Soja

Glycine max (*G. max*) es una planta leguminosa (Fabaceae). Sus semillas poseen un alto contenido de aceite, y es alta en proteínas. Su germinación ocurre en 48 horas, bajo condiciones de crecimiento ideales. Los cotiledones proporcionan nutrición a la plántula durante los primeros 7 días. La primera hoja “verdadera” se desarrolla como un par de folíolos (o un bifolio). Posteriormente, los nudos maduros producen hojas trifoliadas, con tres folíolos por hoja. Sus hojas, tallos y vainas están cubiertos por finos pelos grises. Las flores nacen en la axila de la hoja y son de color blanco o púrpura rosado (Purcell y Ashlock, 2014).

Durante su desarrollo, la planta de soja pasa por varios estadios fenológicos. Estos se pueden dividir en dos etapas: vegetativa (V) y reproductiva (R), como se muestra en la figura 1.1.

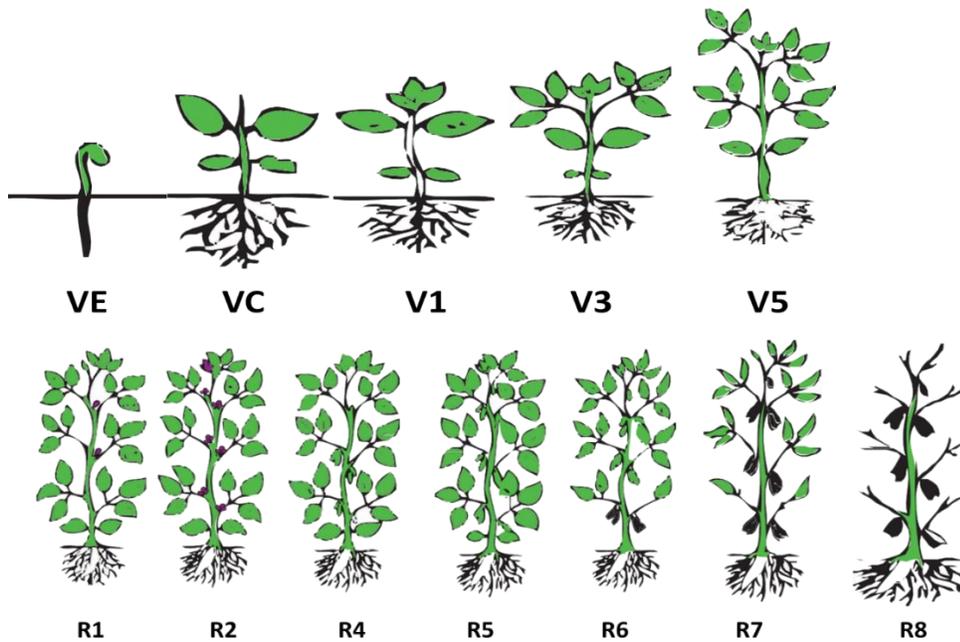


Figura 1.1: Estadios fenológicos de la planta de soja (*G. max*) (Rubén y Toledo, 2006).

La fase VE se refiere a la fase de emergencia, el hipocótilo empuja al epicótilo y a los cotiledones haciéndolos emerger. En la VC, la fase cotiledonar, los cotiledones se despliegan completamente y emerge el bifolio, cuyos bordes no se tocan. Los estadios siguientes se denominan con una V seguido del número de nudos. Sólo se considera que se llegó al siguiente estadio cuando las hojas están completamente desplegadas, y sus bordes no se tocan (Figura 1.2). Al inicio de la floración comienza la fase reproductiva con R1. En el estadio R2 las flores están completamente desarrolladas. Entre R3 y R4 se forman las vainas que contendrán las semillas, y entre R5 y R6 se forman las semillas. A partir de este momento las hojas comienzan a ponerse amarillas y a caerse. Entre R7 y R8 la planta madura completamente, perdiendo la coloración verde y quedando sólo las vainas (Rubén y Toledo, 2006).

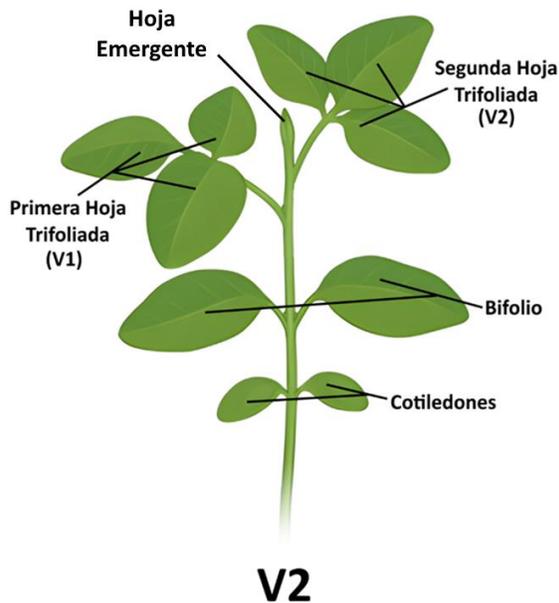


Figura 1.2: Esquema de una planta de soja en estadio de crecimiento V2. Elaboración propia.

Plagas

En el contexto de cultivos agrícolas, se define como plaga a cualquier organismo - ya sean insectos, agentes patógenos, o malezas - cuya densidad poblacional supera los niveles aceptables para un cultivo, afectando negativamente la calidad y la producción, generando pérdidas económicas (Vitti y Sosa, 2006).

Para el caso de artrópodos plaga, estos pueden clasificarse de varias formas (Fit et al., 2019):

- Según su incidencia, se pueden clasificar en: clave (siempre se encuentran en cantidades que producen daños significativos en la producción), ocasionales (sólo alcanzan niveles perjudiciales ocasionalmente, en condiciones ambientales desfavorables), potenciales (normalmente no afectan la producción debido a su bajo nivel), o migratorias (no se encuentran geográficamente en el agrosistema, pero pueden provocar daños si llegaran a la zona).

- Según el nivel y tipo de daño, se pueden clasificar como defoliadoras (consumen hojas), cortadoras (cortan tallos al ras del suelo), barrenadoras (taladran ramas y troncos de árboles), y minadoras (forman túneles dentro del tejido de las hojas).
- Según la parte vegetal afectada, en directas (afectan la parte cosechable de la planta) e indirectas (afectan partes no cosechables).
- Según el estado de desarrollo dañino, puede ser inmaduro (larva), adulto, o ambos.

Plagas Típicas en Soja

Desde su germinación hasta la madurez, los insectos plaga son uno de los principales factores que afectan al cultivo de soja, alimentándose de recursos presentes en la planta y de este modo limitando su crecimiento y rendimiento, causando pérdidas significativas (Lucarelli y Trumper, 2015; Russo, Scorsetti, et al., 2019). Según los informes más recientes, a nivel país se calcula una pérdida de alrededor del 10% de la producción anual por acción de insectos plaga en este cultivo (Pelizza et al., 2018).

Como se observa en la figura 1.3, durante las etapas vegetativa y reproductiva temprana del cultivo, principalmente predominan los picudos (orden Coleoptera) y orugas (Lepidoptera). Durante la etapa reproductiva tardía (más específicamente en la fructificación) es más común encontrar la presencia de chinches (Hemiptera) (Fit et al., 2019).

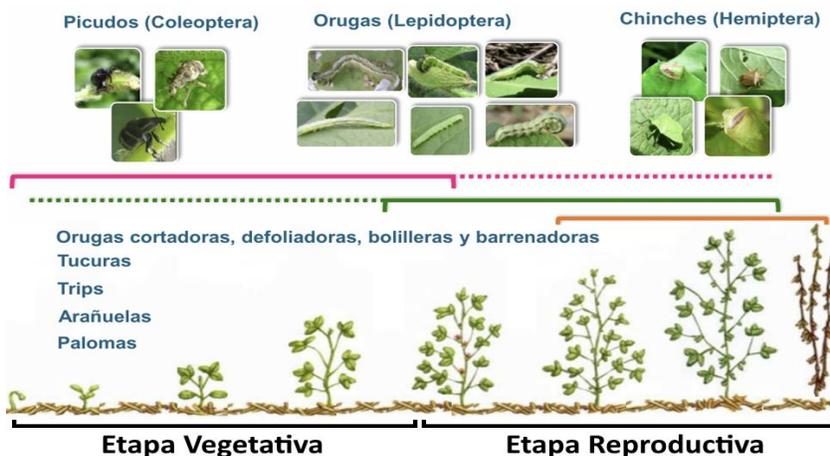


Figura 1.3: Plagas típicas de soja a lo largo de su desarrollo (Fit et al., 2019)

Entre las plagas más abundantes en el cultivo de la soja, se encuentran las orugas defoliadoras (Lepidoptera: Noctuidae). Éstas causan daños directos e indirectos en las plantas, principalmente mediante consumo foliar durante el estado vegetativo y reproductivo. Estos daños provocan una disminución en la capacidad de realizar fotosíntesis e intercepción de luz, lo cual conlleva a pérdidas de material almacenado en hoja, acortamiento del período de llenado de granos, y mermas en el rendimiento (Lucarelli y Trumper, 2015; Russo et al., 2016; Urretabizkaya et al., 2010; Vitti y Sosa, 2006).

Plaguicidas

El control de plagas y el manejo del eco-agrosistema es clave para evitar pérdidas en rendimiento y producción en los cultivos. Desde los '70, se han desarrollado estrategias químicas y biológicas a nivel internacional para el control de plagas; sin embargo, hasta la actualidad la herramienta más utilizada en el país sigue siendo el control químico mediante plaguicidas (Demetrio et al., 2012).

Según la FAO, el término plaguicida puede usarse para referirse a “...insecticidas, aceites minerales, herbicidas, fungicidas, bactericidas, reguladores del crecimiento de las plantas, rodenticidas y cualquier otra sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o [sustancias] que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en sus cuerpos o sobre ellos.” (FAO, n.d.). Para este estudio, se utilizará ‘plaguicida’ o ‘insecticida’ para referirse específicamente a aquellos plaguicidas químicos que tienen como blanco insectos plaga de plantas.

El crecimiento acelerado de la producción y desarrollo del cultivo de soja viene acompañado de un aumento significativo en el uso de pesticidas (Ronco et al., 2008), y la mayoría de estos son de amplio espectro. Si bien en la modernidad parecieran ser necesarios para lograr cumplir con las demandas económicas del mercado, su uso

indiscriminado no es deseado y se considera problemático. Esto se debe a su baja especificidad, toxicidad residual para el ambiente y para la inocuidad del producto cosechado, persistencia y bioacumulación, y efectos negativos en la salud humana. Asimismo, el uso excesivo de estos insecticidas puede producir un aumento de la incidencia de plagas, a causa de la ruptura de los mecanismos de control naturales, generando una prevalencia de poblaciones resistentes a dichos plaguicidas (Gonzalez et al., 2010).

Entre los insecticidas más utilizados destacan dos: la cipermetrina, un compuesto piretroide que representa más del 50% del consumo total, y el clorpirifos, un compuesto organofosforado (SENASA, Registro nacional de terapéutica vegetal). La venta y aplicación de estos pesticidas en zonas rurales es libre, y se aplica sin supervisión ni control. Tanto la cipermetrina como el clorpirifos son neurotóxicos de amplio espectro, clasificados por su toxicidad dérmica y oral como moderadamente tóxicos, y altamente tóxicos para peces, anfibios, e invertebrados acuáticos. Ambos presentan una moderada persistencia en el suelo, y se han detectado en arroyos adyacentes a cultivos de soja luego de eventos de lluvia (Ronco et al., 2008; SENASA, n.d.; Venturino y Álvarez, 2021).

Control Biológico de Plagas

Para abordar la problemática del uso excesivo de plaguicidas se impulsó la búsqueda de alternativas más ecológicas y compatibles con el ambiente, y de menor toxicidad (Bamisile et al., 2021).

El control de plagas es, posiblemente, el mayor desafío de la producción agrícola. El Manejo Integrado de Plagas (MIP) es un sistema que combina diversas técnicas de control dentro de una estrategia integral. Su objetivo es regular las poblaciones de plagas considerando su hábitat y dinámica poblacional, manteniéndolas en niveles bajos que no generen daños económicos. Este enfoque se basa en un análisis costo-beneficio y busca equilibrar los intereses de los productores, la sociedad y el medio ambiente. (FONTAGRO et al., 2021; Litwin et al., 2020; Samal et al., 2023).

Las técnicas más comunes en el MIP incluyen diversas estrategias. Las principales técnicas se describen a continuación (FONTAGRO et al., 2021):

- **Control genético:** Consiste en el uso de estrategias como la macho-esterilidad y otras tácticas similares para reducir la población de plagas.
- **Control fitogenético:** Se basa en el uso de variedades de cultivos que son resistentes a las plagas, reduciendo así su impacto.
- **Control cultural:** Incluye prácticas que dificultan la supervivencia o el daño causado por las plagas, como la rotación de cultivos.
- **Control biológico:** Se enfoca en favorecer el desarrollo de enemigos naturales de las plagas, ya sean organismos que se encuentran naturalmente en el cultivo o que son introducidos artificialmente.
- **Control etológico:** Utiliza trampas, atrayentes, feromonas y repelentes para modificar el comportamiento de las plagas y reducir su incidencia.
- **Control físico:** Implica la destrucción de plagas mediante métodos físico-mecánicos, como el uso de barreras o la aplicación de temperaturas extremas.
- **Control legal:** Consiste en la implementación de normativas y legislación que prohíben prácticas dañinas o el uso de productos peligrosos. También puede incluir la obligación de ciertos procedimientos, como la eliminación de residuos agrícolas que puedan favorecer la proliferación de plagas.
- **Control químico:** Se aplica según criterios de mínima y oportuna utilización, priorizando la eficiencia y reduciendo el impacto ambiental.

De estas estrategias, nos enfocaremos específicamente en el control biológico. El control biológico también se puede definir como la reducción de la cantidad de enfermedad causada por patógenos, mediante la acción de uno o más organismos, huéspedes o antagonistas, que puede ser llevada a cabo de manera natural o a través de la alteración del entorno. Estos organismos pueden ser otros insectos que actúan como parasitoides o depredadores, o bien microorganismos entomopatógenos como hongos, bacterias o virus (Islam et al., 2021; Vega, 2018).

Entre las principales ventajas frente a los pesticidas químicos tradicionales se destacan la ausencia de residuos químicos y la preservación de microorganismos benéficos asociados al cultivo, entre otras (Lacey et al., 2015). No obstante, su adopción comercial a gran escala enfrenta limitaciones debido a su susceptibilidad a condiciones ambientales bióticas y abióticas. Es decir, interacciones que resultan prometedoras en condiciones de laboratorio o invernadero pueden perder eficacia en campo debido a factores ambientales o biológicos (Heimpel y Mills, 2017).

Los últimos registros indican que, en Argentina, actualmente hay más de 3900 formulados en el SENASA, entre insecticidas, fungicidas, herbicidas, antibióticos, acaricidas, entre otros. Sin embargo, solo 11 de ellos son productos biológicos. Entre los de actividad insecticida, se encuentran siete formulados de *Bacillus thuringiensis*, seis de *B. thuringiensis var. kurstaki*, uno basado en el virus de la granulosis de *Cydia pomonella* y uno de *Beauveria bassiana*. Ninguno de estos productos está disponible para uso doméstico o en superficies pequeñas, y la información sobre sus aplicaciones recomendadas es limitada (Rivera y Wright, 2014).

Hongos Entomopatógenos

Dentro del control biológico de insectos plaga se destacan los hongos entomopatógenos (o EPF, por su sigla en inglés). Los EPF actúan como agentes patógenos de insectos debido a su capacidad de infectar, y si se dan las condiciones adecuadas, causar la muerte de ciertas especies de insectos; invadiendo y colonizando su cuerpo. Estos hongos pueden infectar diversas especies de insectos plaga, como lepidópteros, pulgones, trips, entre otros, sin representar un riesgo significativo para organismos no blanco o insectos beneficiosos (Bamisile et al., 2021; Mutune et al., 2016).

Tradicionalmente, los hongos entomopatógenos se consideraron exclusivamente patógenos de artrópodos. Pero se ha descubierto que muchos de ellos actúan también como endófitos, antagonistas de enfermedades vegetales, colonizadores de la rizosfera y promotores del crecimiento vegetal (Lacey et al., 2015).

Los EPF son capaces de infectar insectos plaga en distintas etapas de su ciclo de vida, desde la fase larval hasta la adultez. Actualmente, se han identificado más de 700 especies pertenecientes a aproximadamente 90 géneros, incluidos miembros de *Oomycetes*, *Chytridiomycota*, *Microsporidia*, *Entomophthoromycota*, *Basidiomycota* y *Ascomycota* (Humber, 2012). Los géneros más utilizados son *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria*, *Hirsutella* y *Lecanicillium* (Bamisile et al., 2021; Khachatourians y Qazi, 2008).

Para su aplicación, los hongos entomopatógenos se preparan en formulados compuestos por el hongo, que puede encontrarse en forma de conidios o blastosporos, en polvo o en suspensión, combinados con otros componentes que aumentan su persistencia y virulencia. Estos productos están disponibles en formatos líquidos, polvos solubles en agua o preparados en aceite. Actualmente, se comercializan para su uso masivo en Norteamérica, Europa y África contra plagas específicas (Islam et al., 2021).

La aplicación de hongos entomopatógenos para control biológico de plagas de cultivos de interés puede darse principalmente por dos mecanismos: inoculación o inundación. En la inoculación se aplican pequeñas cantidades del hongo al inicio de la temporada, permitiendo que este crezca a lo largo de la temporada y se establezca en el cultivo. La inundación consiste en la aplicación de grandes cantidades del hongo en períodos cortos de tiempo, de un modo similar a un insecticida químico. Este último método se denomina “micoinsecticida” o “micopesticida” (Mutune et al., 2016; Shah y Pell, 2003).

Los agentes de control biológico fúngicos presentan un modo de infección único; a diferencia de otros organismos entomopatógenos, los EPF pueden invadir al insecto directamente a través de su cutícula (Roberts y Hajek, 1992).

La infección comienza con la adhesión de las esporas a la cutícula, transportadas pasivamente por corrientes de viento o agua (Gabarty et al., 2014). Cuando los conidios se depositan sobre la superficie del insecto, se adhieren y germinan, desencadenando cascadas de reconocimiento y activación enzimática tanto en el insecto como en el hongo (Shah y Pell, 2003; Sharma et al., 2023). Dadas las condiciones adecuadas, el conidio germina y forma una estructura especializada llamada tubo germinal, que penetra la

cutícula, concentrando energía física (presión mecánica) y química (degradación enzimática, como proteasas, lipasas, quitinanas) en un área pequeña para garantizar el ingreso eficiente (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013). Factores ambientales como la temperatura, humedad y luz solar también pueden afectar la adhesión, germinación, penetración y crecimiento.

Luego de la penetración, el hongo ingresa y se distribuye en la hemolinfa. Este se alimenta de los nutrientes presentes en la hemolinfa, crece y produce toxinas, provocando la muerte del insecto en un plazo de entre 3 y 7 días desde la infección (Figuras 1.4 y 1.5). Finalmente, luego de la muerte del insecto, el hongo vuelve a emerger y produce nuevas esporas en el cadáver, que se diseminan y continúan su ciclo de vida en otros huéspedes (Brivio y Mastore, 2020; Islam et al., 2021; Mascarin y Jaronski, 2016; Sánchez-Pérez et al., 2014; Shah y Pell, 2003).

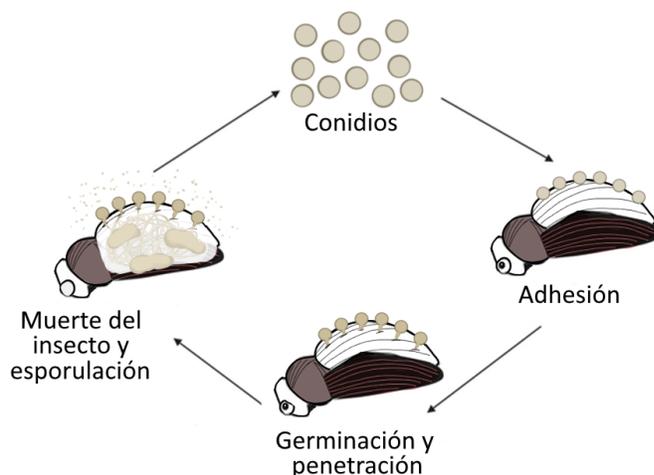


Figura 1.4: Ciclo de vida de un hongo entomopatógeno.

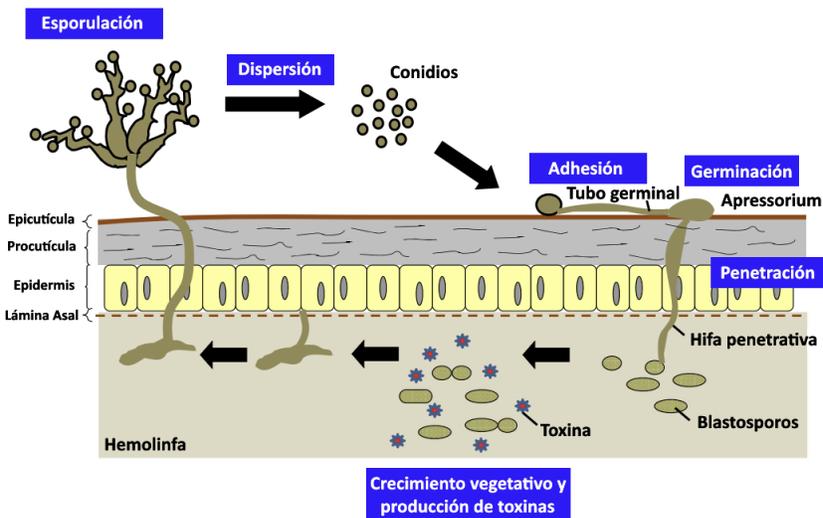


Figura 1.5: Diagrama de infección del hongo entomopatógeno *B. bassiana* (Mascarin y Jaronski, 2016).

Hongos Entomopatógenos Endófitos

La adopción comercial a gran escala de los hongos entomopatógenos enfrenta limitaciones debido a su susceptibilidad a condiciones ambientales adversas, como cambios en la humedad, la exposición a la luz UV y las variaciones de temperatura, así como por dificultades en la aplicación y alcance. Para superar estas limitaciones, se podría aprovechar la capacidad natural de algunos hongos entomopatógenos para comportarse como endófitos, lo que podría mejorar su eficacia como agentes de control biológico al protegerlos de los factores ambientales y evitar las dificultades en su aplicación (Bamisile et al., 2021).

El endofitismo se define como la colonización asintomática de tejidos vegetales aparentemente saludables. Se consideran hongos endófitos a aquellos capaces de habitar tejidos vivos de las plantas durante parte de su ciclo de vida sin causar efectos negativos. Esta categoría abarca un amplio rango de relaciones simbióticas, que incluyen el parasitismo, el comensalismo y el mutualismo. En este intercambio, la planta proporciona al hongo un sustrato, nutrientes y protección, mientras que el hongo contribuye con

sustancias y metabolitos que fortalecen las defensas de la planta y favorecen su crecimiento (Stone et al., 2004).

Los hongos endófitos pueden aislarse de diversas partes de la planta (Figura 1.6), como semillas, hojas, tallos y raíces. Para estudiar el endofitismo, se seleccionan plantas que se vean saludables y libres de patógenos, prefiriéndose, en general, el uso de tejidos jóvenes (Selim, 2012).

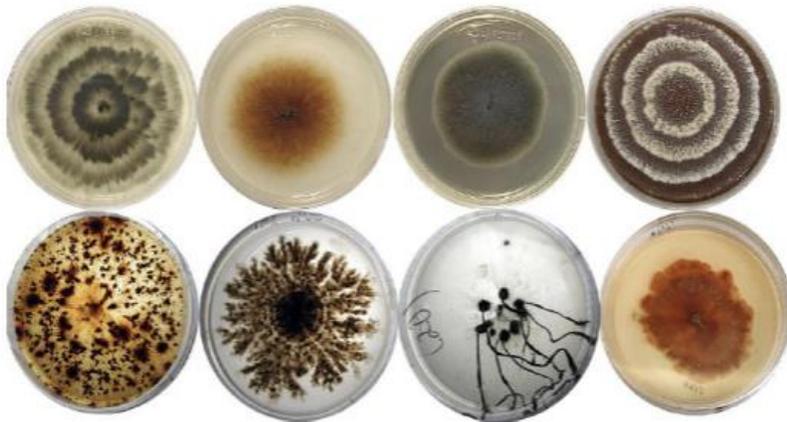


Figura 1.6: Varios hongos endófitos Ascomycetes aislados de angiospermas y coníferas en Norteamérica y Panamá (Selim, 2012).

Recientemente, ha aumentado el interés por el rol ecológico de los hongos entomopatógenos endófitos ya que se cree que estos puedan también promover el crecimiento de las plantas en las que habitan (Impullitti y Malvick, 2013). Los hongos entomopatógenos endófitos pueden beneficiar a las plantas de manera indirecta, al defenderlas de insectos plaga, y/o de forma directa al promover su crecimiento. Ciertos hongos endófitos mejoran parámetros morfológicos de las plantas que colonizan, como la germinación de semillas, la longitud de las raíces, el área y número de hojas, y la altura, entre otros. (Russo, 2016). Se ha reportado que, como endófitos, estos hongos también pueden detener la alimentación de los insectos y la puesta de huevos (Mutune et al., 2016; Muvea et al., 2018).

Beauveria bassiana

Los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* forman el 70% de la totalidad de hongos entomopatógenos usados en control biológico disponibles comercialmente (Mascarin y Jaronski, 2016).

Beauveria bassiana es un hongo entomopatógeno de aspecto hialino y de conidios esféricos entre 1,5 y 5,5 μm de diámetro, y paredes lisas (Figura 1.7); perteneciente a la clase Deuteromycetes. Es la forma anamorfa (o asexual) de *Cordyceps bassiana* (Rehner et al., 2011; Sinha et al., 2016).

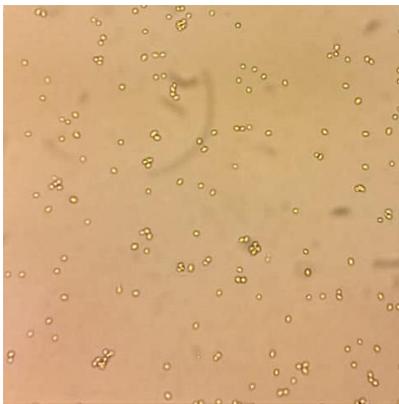


Figura 1.7: Conidios de *Beauveria bassiana* observadas en microscopio. Aumento: 100X.

Beauveria bassiana (*B. bassiana*) es capaz de infectar varios insectos, incluyendo caelíferos, coleópteros, pulgones, moscas blancas, entre otros (Sinha et al., 2016). Este hongo entomopatógeno causa la enfermedad de la muscardina blanca, la cual recibe este nombre debido a la apariencia del micelio blanco que emerge del insecto (Figura 1.8) tras su infección (Sandhu et al., 2012).



Figura 1.8: *B. bassiana* emergiendo desde cadáver de *T. castaneum*. Fuente: “*Mortal dance - The Sinister Beauty of the Infection*”, Lautaro Preisegger, Daysi Espín Sánchez, Carla Huarte-Bonnet, 2024.

En *B. bassiana*, como en todos los hongos entomopatógenos, la principal vía de infección es el contacto cuticular. Sin embargo, en ciertos insectos la cutícula presenta una barrera para los patógenos: esta puede estar recubierta de secreciones con lípidos, proteínas, u otros compuestos antifúngicos de defensa. Algunos tenebroides, como *Tribolium castaneum*, presentan resistencia por la producción de compuestos derivados de quinonas, que poseen actividades antimicrobianas contra ciertos hongos filamentosos, actuando como fungistáticos y afectando negativamente la germinación y el crecimiento de hongos como *B. bassiana* (Pedrini et al., 2015). Para superar esta barrera, se ha propuesto una ruta alternativa: la entrada del hongo entomopatógeno por vía oral o respiratoria, seguida de su adhesión a la cavidad bucal o al tracto intestinal, como se muestra en la figura 1.9. La capacidad de *B. bassiana* para infectar tanto por vía cuticular como oral lo convierte en un desafío mayor para el sistema inmunológico del insecto y, por ende, en un candidato prometedor como alternativa a los pesticidas químicos (Mannino et al., 2019). La ruta de infección oral evita la barrera de la cutícula (da Silva et al., 2015; Pedrini et al., 2010, 2015), evitando así los mecanismos de resistencia a los entomopatógenos. La exploración y aprovechamiento de estas vías alternativas podría aumentar la eficacia del uso de hongos entomopatógenos como herramienta de control biológico (Mannino et al., 2019).

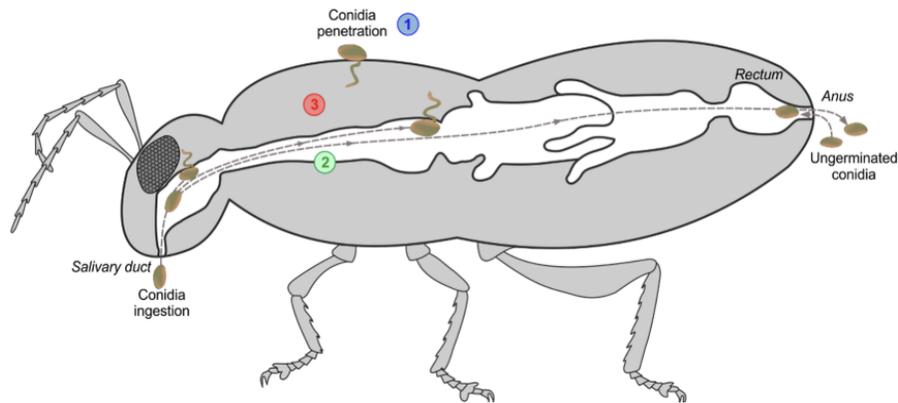


Figura 1.9: Diagrama propuesto de infección oral de *B. bassiana* (Mannino et al., 2019).

Establecimiento de *B. bassiana* como Endófito en Soja

Se ha reportado que *B. bassiana* es capaz de establecerse como endófito y promover el crecimiento de la planta de soja (Russo et al., 2019), algodón (Lopez y Sword, 2015), maíz (Kuzhuppillymyal-Prabhakarankutty et al., 2020; Russo, 2016), tomate (Nishi et al., 2021), frutilla (Canassa et al., 2020), pepino (Shaalán et al., 2021), pimienta de cayena (Yusniwati et al., 2023), uva viti-vinífera (Mantzoukas et al., 2021), lechuga (Macuphe et al., 2021), frijol común (Afandhi et al., 2019), yuca (Greenfield et al., 2016), entre otros.

B. bassiana puede ser aplicado por aspersión foliar (Allegrucci et al., 2017; Corrêa et al., 2020; Nishi et al., 2021; Russo, Scorsetti, et al., 2019) o de suelo (Greenfield et al., 2016), por irrigación radicular mediante inyección en suelo (Wei et al., 2020), por cobertura de folios con pincel (Marassatto, 2022), o inoculación por inmersión con suspensión de conidios de semillas (Allegrucci et al., 2017; Canassa et al., 2019; Clifton et al., 2018) y raíces (Allegrucci et al., 2017; Canassa et al., 2020; Russo et al., 2015).

En soja, se demostró que, como endófito, *B. bassiana* produce un efecto bioestimulante: este logró mejorar el rendimiento, y los parámetros de crecimiento y desarrollo de la soja: su altura, número de hojas, longitud de raíces, germinación de semillas, llenado de vainas, entre otros (Russo, 2016; Russo, et al., 2019). Se verificó que *B. bassiana* inoculado en soja se mantuvo como endófito en la planta y pudo recuperarse desde diversas partes del tejido vegetal hasta 28 días después de su inoculación (Russo, et al., 2019).

La inoculación de *B. bassiana* en soja para su establecimiento como endófito es una alternativa al enfoque inundativo usado comúnmente en hongos entomopatógenos (Mutune et al., 2016). Plantas colonizadas por *B. bassiana* pueden reducir el daño causado por varios insectos plaga (Jaber y Ownley, 2018). Al establecerse como endófito en soja, *B. bassiana* es capaz de actuar como entomopatógeno del insecto plaga *Helicoverpa gelotopon*, afectando significativamente su supervivencia, crecimiento, parámetros reproductivos, y preferencias alimentarias, al ser alimentados con hojas previamente inoculadas y de este modo ingresando por la vía oral (Russo, Scorsetti, et al., 2019).

Entonces, el potencial de *B. bassiana* endófito es doble: por un lado, puede favorecer el crecimiento y el rendimiento de la planta de soja; por otro lado, también es capaz de disminuir la preferencia y el consumo de sus hojas por insectos plaga, o directamente disminuir la población de estos al causar su muerte.

En la búsqueda de nuevos métodos de aplicación para la inoculación de plantas con hongos entomopatógenos endófitos que sean sencillos y económicos para facilitar su uso comercial en campo, se exploró una alternativa a los métodos de inoculación previamente mencionados, la cual consiste en la adhesión de polvo de conidios a las semillas mediante técnicas de recubrimiento. Este método, utilizado tradicionalmente para proteger las semillas de enfermedades y plagas (Lacey et al., 2015), permite recubrirlas con microorganismos beneficiosos. Kabaluk y Ericsson (2007), lograron establecer *Metarhizium spp.* como endófito en maíz utilizando esta técnica.

En este estudio, se exploró este método alternativo de inoculación de *G.max* con *B. bassiana*. Se propuso estudiar el endofitismo de una cepa de *B. bassiana* de referencia, así como cepas recombinantes con genes reporteros fluorescentes verde y rojo, utilizando la técnica de adhesión de polvo de conidios en semillas, aun no estudiada en el sistema *G. max-B. bassiana*.

De esta manera, a partir del establecimiento de estas cepas recombinantes como endófitos por esta metodología, se espera poder contribuir en el estudio de la dinámica de colonización fúngica en plantas de soja a través de su visualización por microscopía de fluorescencia.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Avanzar en el conocimiento de la interacción y dinámica del endofitismo entre el hongo entomopatógeno *B. bassiana* y la planta de soja *G. max*.

Objetivos Específicos

- Evaluar la efectividad de diversos métodos de esterilización de semillas de soja.
- Evaluar la capacidad endofítica y bioestimulante de *B. bassiana* ARSEF 2860 inoculadas por adhesión de conidios secos en semillas de soja.
- Comparar la patogenicidad de las cepas recombinantes ARSEF 2860-GFP y ARSEF 2860-RFP con la cepa ARSEF-2860 *wild type* frente a insectos modelo (*Tribolium castaneum*).
- Seleccionar una cepa candidata de cada reportero para su utilización en ensayos de endofitismo.
- Evaluar la capacidad endofítica y bioestimulante de las cepas recombinantes candidatas de *B. bassiana* inoculadas por adhesión de conidios secos en semillas de soja.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo y mantenimiento de cepas de *B. bassiana*

Se utilizaron las siguientes cepas de *B. bassiana* para este estudio:

Cepa	Abreviatura	Característica
<i>B. bassiana</i> ARSEF 2860	2860	<i>Wild Type</i>
<i>B. bassiana</i> GFP_4	BbG4	Cepa recombinante que expresa el gen de la proteína verde fluorescente.
<i>B. bassiana</i> GFP_6	BbG6	Cepa recombinante que expresa el gen de la proteína verde fluorescente.
<i>B. bassiana</i> RFP_5	BbR5	Cepa recombinante que expresa el gen de la proteína roja fluorescente.

Tabla 1: Cepas de *B. bassiana* utilizadas.

La cepa *wild type* (ARSEF 2860, WDCM 112) fue cedida por el Dr. Richard Humber, USDA, Cornell University, USA. Las cepas recombinantes fueron creadas por Daysi Espín Sánchez en el laboratorio de bioproducción INIA en Las Brujas, Uruguay. Estas cepas fueron obtenidas por transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando el plásmido pcGen, que posee el gen de resistencia a la geneticina, con su correspondiente gen reportero GFP o mCherry. En la figura 2.1 se muestra el plásmido que se utilizó para transformar las cepas RFP. El constructo utilizado para los candidatos GFP es similar, pero contiene la secuencia del gen que expresa GFP en lugar de mCherry.

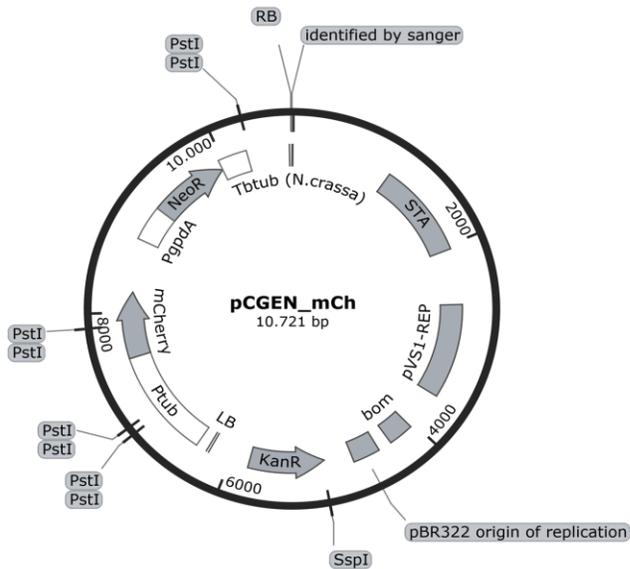


Figura 2.1: Plásmido pCGEN_mCh que se utilizó para transformar *B. bassiana*, conteniendo la secuencia del gen de RFP mCherry.

Se conservaron cultivos stock de las cepas de *B. bassiana* en placas de PDA casero, refrigeradas a 4°C.

Para preparar 1000mL del medio PDA casero, se utilizaron 200 gramos de papa, lavada, pelada, y cortada en cubos pequeños. Se hirvieron en 1L de agua destilada por 25 minutos. Se recolectó el extracto líquido de papa, haciéndolo pasar por un filtro. A continuación, al filtrado se le agregaron 20 gramos de dextrosa y 15 gramos de agar, y se completó el volumen con agua destilada para llevar a 1 litro. Esta mezcla se esterilizó en autoclave, y una vez enfriada se agregó ampicilina para llevar a una concentración final de 75 µg/mL, mezclando y vertiendo en placas Petri inmediatamente.

Se realizaron repiques frecuentes de los cultivos. Para ello, se tomó micelio de una placa de stock fresco del hongo (Figura 2.2), y se sembró con ansa en una nueva placa de medio PDA. Las placas se incubaron en estufa a 26 °C durante 14 días.

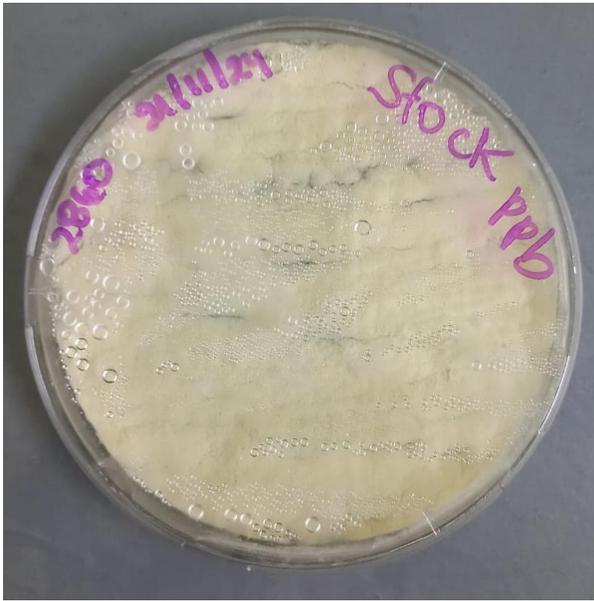


Figura 2.2: Placa de PDA con cultivo de *B. bassiana* 2860.

Para mantener su capacidad infectiva óptima, *B. bassiana* fue periódicamente pasado por insecto, lo que consistió en infectar varios ejemplares del insecto modelo *Tribolium castaneum* (*T. castaneum*) y tras realizar una cámara húmeda del insecto muerto, utilizar el micelio emergente para realizar repiques.

Obtención y cuantificación de polvo de conidios

A partir de un cultivo de *B. bassiana* con 14 días, se utilizó una espátula para levantar el crecimiento fúngico y se depositó en una placa de vidrio pequeña. A continuación, se llenó otra placa de vidrio de mayor diámetro con perlas de sílica, y dentro de esta se colocó la placa de Petri pequeña, cubriendo con la tapa de la placa de mayor tamaño. Se dejó secar en estufa a 26 °C durante aproximadamente 7 días o hasta verificar que este se disgregara fácilmente con una espátula. En los casos en los que el crecimiento fúngico presentaba humedad excesiva, se renovaron las perlas de sílica a mitad del proceso de secado. Una vez seco, se trituró con la espátula hasta obtener un polvo fino, El polvo se almacenó en tubos Falcon de 15 mL (Figura 2.3) y se registró el peso obtenido. Los tubos se refrigeraron a 4°C hasta su uso.



Figura 2.3: Tubo Falcon de 15ml con polvo de *B. bassiana*.

Para la cuantificación del polvo de conidios, se pesó una pequeña cantidad de polvo en balanza analítica, y a continuación se colocó en un Eppendorf de 1,5 mL. Se agregó 1 mL de Tween 0,05% para diluir, y esta suspensión se cuantificó por recuento en cámara de Neubauer Maireinfeld de 0,0025 mm² de área y 0,100 mm de profundidad (Figura 2.4).



Figura 2.4: Cámara de Neubauer utilizada.

La fórmula utilizada para obtener la concentración (conidios/mL) de la muestra es la siguiente:

$$\left(\sum \# \text{conidios por cuadrante} \right) * 10^4 * \text{factor de dilución}$$

Bioensayo de mortalidad de *T. castaneum* frente a conidios de *B. bassiana*

Con el objetivo de evaluar si la inserción de GFP y RFP no dirigida en las cepas recombinantes modificó la capacidad infectiva, se evaluó la patogenicidad de estas frente a la cepa *wild type* y se incluyó un control negativo.

Se utilizó *Tribolium castaneum* como insecto plaga modelo para evaluar la patogenicidad de las cepas recombinantes.

En la siguiente figura se muestran los estados de desarrollo de este insecto:

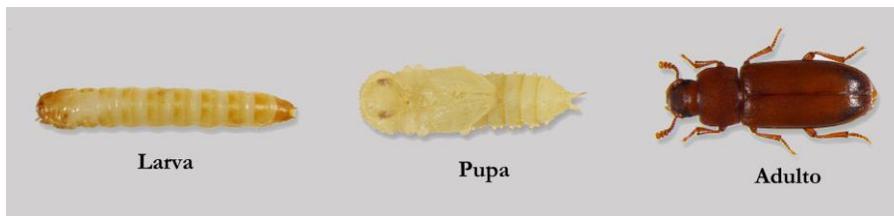


Figura 2.5: Ejemplares larva, pupa y adulto de *T. castaneum*.

Los insectos, tanto adultos como larvas, se conservaron en un sustrato sólido rico en nutrientes, con los componentes indicados en la tabla 2. Los mismos fueron mantenidos en frascos de vidrio a 27 ± 2 °C, en oscuridad y humedad relativa $70 \pm 5\%$ en las instalaciones del insectario del INIBIOLP. De esta colonia, mantenida rutinariamente, se tomaron los especímenes para realizar el bioensayo a continuación.

Componente	Concentración (%)
Harina	85%
Leche en polvo	5%
Levadura	5%
Germen de trigo	5%

Tabla 2: Composición de sustrato para insectos.

Para los bioensayos se colocaron 10 individuos adultos o larvas de *T. castaneum* no sexados en placas de vidrio de 6 cm de diámetro y 1 cm de profundidad conteniendo 0,5 gramos de sustrato fúngico (Figura 2.6), compuestos de harina y polvo de conidios previamente cuantificado, de manera que cada placa tuviera 1×10^9 conidios totales, con la cantidad de harina suficiente para completar 0,5 g.

Se ensayaron 5 condiciones: dos candidatos GFP (BbG4 y BbG6), un candidato RFP (BbR5), la cepa *wild type* (ARSEF 2860) y un control negativo (solo harina) tanto para adultos como para larvas.

Todas las placas se incubaron en estufa a 26 °C. Durante 15 días, se registró diariamente la mortalidad, retirando los ejemplares muertos. Estos se separaron, almacenaron y rotularon en sobres de papel aluminio para su posterior evaluación en cámaras húmedas.



Figura 2.6: Placas de vidrio con *T. castaneum* adultos y mezcla de harina y polvo de conidios.

Se realizaron tres réplicas técnicas por condición, resultando en un total de seis placas por condición: tres con adultos y tres con larvas. Se realizaron tres repeticiones del ensayo completo, independientes en el tiempo.

Al finalizar el ensayo de mortalidad, se prosiguió a realizar las cámaras húmedas de los insectos muertos. Los insectos se esterilizaron superficialmente: primero, se lavaron los ejemplares durante 15 segundos en etanol al 70%. Luego, se sumergieron durante 10 segundos en lavandina comercial al 10%, y finalmente se enjuagaron durante 1 minuto y 30

segundos en agua destilada estéril. Posteriormente, se dejaron secar sobre papel de filtro estéril.

A continuación, se colocaron los individuos desinfectados en placas con agar-agua (con 15 g/L de agar y 75 ug/mL de ampicilina), para permitir el crecimiento del hongo en el exterior de los cadáveres. Los insectos se distribuyeron en cuadrantes previamente rotulados. Se utilizó una placa para cada tratamiento, para evitar contaminación cruzada.

Las placas se incubaron en estufa a 26 °C. Tras 8 días de incubación, se procedió a evaluar y cuantificar el número de insectos que dieron positivo para infección con *B. bassiana* al observar crecimiento fúngico hialino característico de la especie.

Métodos de esterilización de semillas de soja

Se utilizó la variedad DM3810 de soja (*G. max*) para todos los ensayos. Las semillas se mantuvieron refrigeradas a 4 °C.



Figura 2.7: Semillas de *G. max* DM3810.

Siguiendo metodologías de Costa-Catala et al. (2024), Davoudpour et al. (2020), Escamilla et al. (2019); se evaluaron tres métodos de esterilización de semillas: el primero consistió en una solución de NaClO al 2% p/v, el segundo una solución de NaClO al 3% p/v, y por último una combinación de EtOH al 70% v/v seguido de NaClO al 2% p/v.

Las semillas fueron colocadas en frascos de vidrio estériles conteniendo las soluciones para cada tratamiento, hasta quedar completamente cubiertas de líquido, por 10 minutos

para cada condición. Luego de la esterilización, las semillas fueron transferidas a frascos que contenían agua destilada estéril para eliminar residuos de las soluciones previamente utilizadas y finalmente se secaron en placas de vidrio con papel de filtro estéril.

Las semillas ya esterilizadas y secas se sembraron en placas de medio PDA, colocando 3 semillas por placa para cada tratamiento, por triplicado. Estas se incubaron en estufa a 26 °C, y se evaluaron parámetros a los 3, 5, y 6 días.

A los 3 y 5 días se midió la longitud de la raíz con una regla y el grado de contaminación, sin abrir las placas. El grado de contaminación se estableció cualitativamente, con valores entre 0 y 4, siendo 0 no contaminado y 4 la máxima contaminación observada. En el día 6 se abrieron las placas para medir la longitud de la raíz con mayor precisión, y también se contó el número de raíces secundarias. Se realizaron tres repeticiones independientes en el tiempo del ensayo. La evaluación de estos datos permitió seleccionar el mejor método de esterilización para los ensayos posteriores.

Inoculación de semillas de soja

Se colocaron las semillas previamente esterilizadas con NaClO al 2% (como se describe en la sección Métodos de esterilización de semillas de soja) en placas de vidrio de 6 cm de diámetro, y se cubrieron con 5,4 µL de adherente (aceite vegetal, de girasol) por semilla, agitando para homogeneizar. A continuación, se agregó 0,005 g de polvo de conidios por semilla (sabiendo que la concentración para todas las cepas estudiadas es del orden de 1×10^{11} conidios/g), agitando nuevamente para homogeneizar y cubrirlas por completo.

Las cepas utilizadas para la inoculación fueron la *wild type*, y las cepas recombinantes BbG4 y BbR5. Para el control negativo, se agregó únicamente el adherente.

Ensayo de germinación de semillas inoculadas

Para cada condición a evaluar, se utilizaron 9 semillas previamente esterilizadas e inoculadas con polvo de conidios. Se utilizó la misma metodología utilizada en el apartado de esterilización para la determinación de la longitud de raíz y número de raíces secundarias, solo que en este caso se evaluaron los distintos tratamientos de inoculación. Se realizaron tres repeticiones del ensayo independientes en el tiempo.

Cultivo, mantenimiento, y seguimiento de parámetros morfológicos de soja

Para el cultivo en invernadero de las plantas de soja, se utilizó un sustrato compuesto de tierra, vermiculita, y perlita en una proporción 1:1:1. Previo a su uso, el sustrato fue colocado en bolsas plásticas termorresistentes y se tinalizó en autoclave durante 1 hora, este proceso se repitió tres veces en tres días (1 vez cada 24 horas). Posteriormente, el sustrato se almacenó en bolsas a 4 °C hasta su uso.

Las semillas previamente esterilizadas e inoculadas con el hongo fueron inicialmente sembradas en almacigueras de 8x8 celdas. Se llenó la almaciguera con sustrato hasta la mitad de su volumen, luego se colocó una semilla en cada celda, y finalmente se cubrió de sustrato hasta el borde de la almaciguera.

Las almacigueras se colocaron sobre bandejas plásticas, utilizando una almaciguera y bandeja para cada tratamiento, y estas se colocaron en estantes en el invernadero del INIBIOLP, con condiciones controladas de temperatura y humedad. Se comprobó que las bandejas mantuvieran una cantidad de agua aproximada de entre 2-3 mm de altura. Por cada almaciguera se agregaron 500 ml de agua.

Se controló la temperatura y humedad del invernadero usando un termohigrómetro ThermPro TP393B. Las plantas fueron expuestas a un fotoperiodo de 12 horas utilizando luces AgroGlix 250 (500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ / 92LED).

Para el riego se utilizó agua de canilla, reposada por 24 horas para decloración y esta fue colocada por aspersión sobre las plantas y también en la base de las almacigueras sobre la bandeja.

Alrededor de una semana después la siembra, se observó la germinación de las plantas (Figura 2.8). En ese momento se trasplantaron las plántulas a vasos de telgopor de 150 cm^3 , los cuales también se colocaron en bandejas (Figura 2.9).



Figura 2.8: Almaciguera con plántulas.



Figura 2.9: Plántulas recién trasplantadas. Izq: Control sin inocular. Der: Inoculadas con 2860.

A partir de su trasplante, y cada 3 días, se midieron los parámetros morfológicos de las plantas: número de hojas (emergentes y desarrolladas) y altura. Cuando las plantas fueron extraídas para realizar el reaislamiento, se midió la longitud de su raíz.

A continuación, en la figura 2.10, se observan las plantas a los 10 días de la siembra, algunas ya en el estadio VC:



Figura 2.10: Plantas a los 10 días después de siembra. Izq: Control sin inocular. Der: Inoculadas con 2860.

Las hojas se consideraron desarrolladas cuando estaban completamente abiertas y sus bordes no se tocaban. Caso contrario, se consideran emergentes, como se muestra en la figura 1.1. La altura se midió con una regla, desde la base hasta su ápice. La longitud de raíz se midió con regla, desde la parte del tallo de transición de color verde a blanco, hasta la punta de la raíz primaria. Se siguieron los parámetros de crecimiento hasta el estadio V3. Debido a los tiempos de la puesta a punto de los experimentos, del tiempo de aprendizaje y de la duración de los ensayos en invernadero, y de acuerdo con los tiempos y objetivos del trabajo final, se decidió realizar una sola réplica biológica para estos ensayos

Detección y seguimiento de endofitismo

Cuando las plantas alcanzaron estadios vegetativos V1, V2, y V3 se extrajeron 5 plantas para cada estadio, respectivamente, para evaluar el endofitismo de *B. bassiana* en los distintos tejidos vegetales. Se lavaron las plantas con abundante agua corriente hasta limpiar toda la tierra de la raíz.

Para cada planta, se cortaron trifolios enteros (para V1 y V2) o 2 folios de cada trifolio (para V3), segmentos de tallo y raíz primaria de alrededor de 6 cm cada una, siguiendo el esquema de la planta mostrado en la figura 1.2.

Los segmentos de tejido vegetal se esterilizaron en superficie por inmersión sucesiva en frascos de vidrio estériles. Primero se sumergieron en una solución de EtOH al 70% por dos minutos, seguido de una solución de lavandina comercial estándar de 35 g/L diluida al 50% (equivalente a 1,75% NaClO p/v) por otros dos minutos, y finalmente dos enjuagues en agua destilada estéril.

Los frascos se cambiaron entre distintos tratamientos para minimizar la contaminación cruzada.

A continuación, se secaron los segmentos esterilizados en placas de vidrio con papel de filtro estéril. Una vez secos, se descartaron los bordes externos y se disectaron con tijera. Todo el proceso se realizó en esterilidad.

A continuación, los folios y segmentos de tallo y raíz se cortaron en 6 secciones de tamaño homogéneo.

Los segmentos se colocaron en placas con PDA, previamente rotuladas y separando zonas de la placa entre hoja, tallo y raíz; por estadío. Las placas se incubaron a 25 °C por entre 8 y 12 días, o hasta observar crecimiento. Pasado este tiempo, se evaluó el crecimiento de *B. bassiana* desde los fragmentos cortados (Figura 2.11).

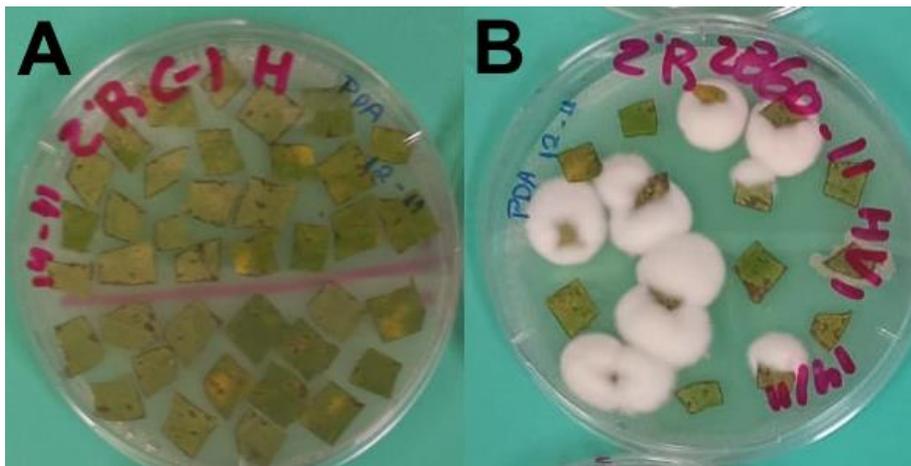


Figura 2.11: Fragmentos de hoja en PDA a los 9 de incubación. A) Fragmentos de hoja Control (sin inocular), B) Fragmentos de hoja inoculada con 2860.

Recolección y análisis de datos

Se realizaron tres repeticiones independientes en el tiempo del bioensayo de mortalidad de *T. castaneum* hongo-insecto. Se normalizaron las muertes según Abbott (Abbott, 1925) (Figura 2.12), y se realizó un promedio de las tres repeticiones. Se realizó un análisis 2-way de ANOVA para estos datos, seguido del post-test de Tukey. Se analizaron los resultados de los tres sets de insectos muertos para el ensayo de cámaras húmedas, y sus resultados fueron promediados.

$$\% \text{ Corr} = \left(1 - \frac{\# T \text{ después del trat.}}{\# Co \text{ después del trat.}} \right) * 100$$

Figura 2.12: Ecuación de Abbott (Abbott, 1925).

La efectividad de los métodos de esterilización se realizó evaluando los parámetros de las semillas y niveles de contaminación, realizando un promedio de los datos obtenidos. Se eliminaron aquellos datos correspondientes a semillas que no germinaron para cada caso. Para el ensayo de germinación se evaluaron los mismos parámetros que en el ensayo de métodos de esterilización, y se procedió al análisis del mismo modo. Para ambos sets de datos, se realizaron análisis 2-way y 1-way de ANOVA, seguido del post-test de Tukey cuando fuera necesario.

Los parámetros morfológicos de soja se midieron cada 3 días, midiendo altura y número de hojas emergentes y desarrolladas, la suma de estas (hojas totales), y longitud de raíz; y estos valores se promediaron. Para evaluar endofitismo, se consideró que se encontraba *B. bassiana* endófito en la hoja si al menos uno de sus fragmentos fue positivo en el reislamiento. De este modo se midió el porcentaje de hojas, tallos y raíces para cada tratamiento que contenían *B. bassiana* endófito; para los tres reislamientos realizados.

Herramientas y recursos informáticos

Los gráficos se realizaron con GraphPad Prism 10 (Dotmatics). Para algunos gráficos de elaboración propia, se utilizó BioRender (BioRender, n.d.), y en ciertas figuras, el programa Paint.NET (dotPDN LLC) fue empleado para su diseño.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayo de mortalidad de *T. castaneum* frente a conidios de *B. bassiana*

El bioensayo de mortalidad consistió en exponer ejemplares adultos y larvas de *T. castaneum* a preparados de polvo de conidios y harina y monitorear su mortalidad diariamente, con el objetivo de evaluar la capacidad infectiva de las cepas recombinantes en comparación con la cepa *wild type*.

Se contaron y se aislaron diariamente los insectos muertos de cada repetición por tratamiento (cepa *wild type*, cepas recombinantes y control sin hongo) durante 15 días. Se realizaron cámaras húmedas, como se describe en la metodología, y se eliminaron del análisis aquellos especímenes que no murieron por infección de *B. bassiana* (es decir, no se observó presencia de *B. bassiana* emergente).

Para esto, los cadáveres de *T. castaneum* se colocaron en placas de agar agua y se incubaron por 8 días hasta evidenciar crecimiento de *B. bassiana* en la superficie de los insectos. Se evaluó el porcentaje de individuos muertos de *T. castaneum* a partir de los cuales emergió *B. bassiana*, como se muestra en el gráfico a continuación (Figura 3.1):

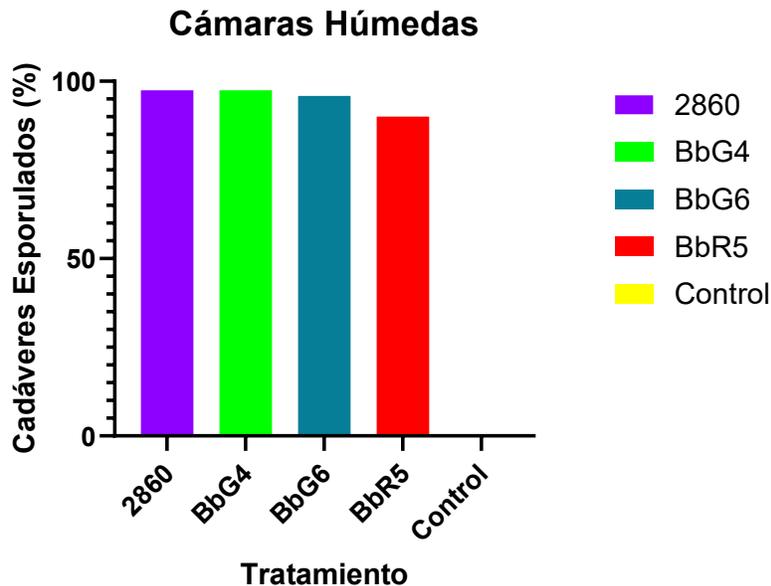


Figura 3.1: Porcentaje de cadáveres de *T. castaneum* que presentaron esporulación de *B. bassiana* tras la exposición a la cepa *wild type* 2860, las cepas recombinantes (BbG4, BbG6 y BbR5), y al control.

Se observa un alto porcentaje de esporulación del hongo a partir del cuerpo del insecto (2860: 97,4% ± 4,4; BbG4: 97,4% ± 2,8; BbG6: 95,8% ± 3,9, BbR5: 90,1% ± 13,3), es decir que la mayoría de las muertes fueron efectivamente a causa de *B. bassiana*. Esto se debe a que, al haber esterilizado la superficie del insecto, el hongo que se observa emergió del interior del insecto y por lo tanto este habría logrado infectar y establecerse dentro del insecto. No se observan diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Como era de esperarse, no se observó emergencia de *B. bassiana* para ninguno de los controles.

A continuación, para analizar los resultados de mortalidad, se realizó un ajuste con el control utilizando la fórmula de Abbott, obteniendo los siguientes resultados:

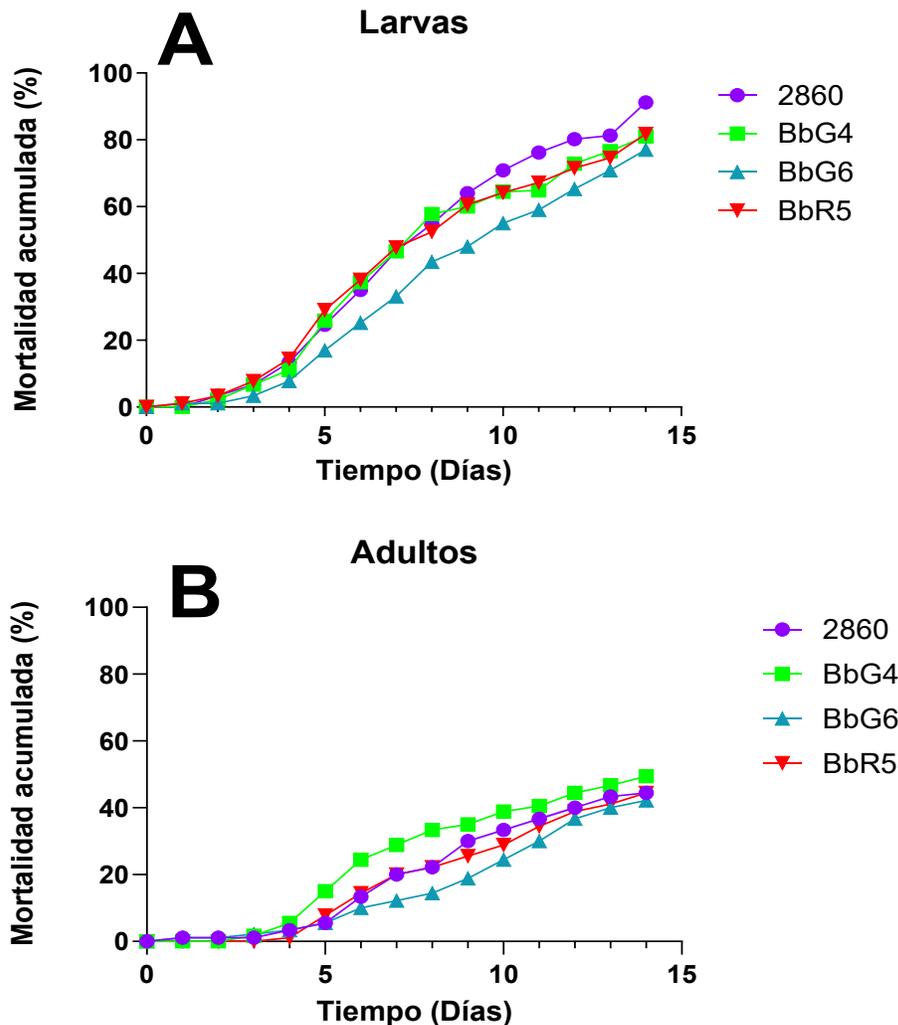


Figura 3.2: Curvas de mortalidad acumulada (%) para larvas (A) y adultos (B) de *T. castaneum* frente a *B. bassiana* 2860 wild type y los candidatos recombinantes BbG4, BbG6 y BbR5.

Se observa un aumento de la mortalidad a lo largo del tiempo en todos los tratamientos debido a la exposición a *B. bassiana*. Durante los primeros 3 a 4 días, las curvas se mantienen planas; pasado este período, comienza a observarse la mortalidad de los individuos y la pendiente aumenta. La curva de mortalidad de larvas presenta una pendiente más pronunciada que la de adultos. Al final del período experimental (15 días), la mortalidad acumulada en larvas es prácticamente el doble que en adultos, como se observa en la Tabla 1.

Ejemplar	2860	BbG4	BbG6	BbR5
Larvas	91,17 ± 6,50 a	81,02 ± 15,22 a	77,02 ± 7,56 b	81,82 ± 1,69 a
Adultos	44,44 ± 40,32 ab	49,44 ± 8,22 a	42,22 ± 19,24 b	44,44 ± 7,70 ab

Tabla 1: Mortalidad (%) promedio (± desvío estándar) de larvas y adultos de *T. castaneum* expuestos a diferentes cepas de *Beauveria bassiana* luego de 15 días de bioensayo.

Letras distintas dentro de cada fila indican diferencias significativas entre cepas ($p < 0.05$; Tukey's test).

A continuación, se realizó un análisis de 2-way ANOVA: Se observó un efecto significativo tanto del tiempo ($F(14, 120) = 80.30, p < 0.0001$) como de las cepas ($F(3, 120) = 5.415, p = 0.0016$) sobre la mortalidad. No se detectó una interacción significativa entre ambos factores ($F(42, 120) = 0.2394, p > 0.9999$), indicando que la diferencia entre cepas se mantuvo estable a lo largo del tiempo. Se compararon los resultados de las cepas utilizadas entre sí, mediante el análisis *post-test* de Tukey. Para el bioensayo en larvas, la mortalidad observada en los individuos expuestos a la cepa recombinante BbG6 fue significativamente menor que el resto (**2860 vs BbG6, $p = 0.0012$; BbG4 vs BbG6, $p = 0.0374$; BbR5 vs BbG6, $p = 0.0231$**), mientras que, en adultos, sólo se observaron diferencias significativas entre BbG6 y BbG4 (**$p = 0.0416$**).

Diversos estudios han evaluado la mortalidad de *T. castaneum* tras la exposición a *B. bassiana*, mostrando una gran variabilidad en los resultados según la concentración de conidios, el método de aplicación y la duración de la exposición. Preisegger et al. (2025) evaluaron la mortalidad de ejemplares de *T. castaneum* larvas y adultos expuestos a *B. bassiana* ARSEF 2860 en forma de conidios encapsulados, y polvo de conidios mezclado con harina de trigo, siguiendo la misma metodología utilizada en este estudio. En larvas, ambos tratamientos resultaron en alta mortalidad (alrededor del 85% para conidios encapsulados y 95% para polvo de conidios), sin grandes diferencias entre ellos. En cambio, en adultos, el polvo de conidios produjo el doble de mortalidad acumulada (50%) en comparación con el tratamiento con conidios encapsulados (25%). Se observó crecimiento fúngico en todos los insectos muertos. Los resultados de mortalidad obtenidos para el

tratamiento con polvo de conidios son similares a los obtenidos en este estudio, e indican que este tratamiento es más eficiente que el encapsulado para *T. castaneum* adultos.

Existen otros antecedentes, en los que la presentación de los propágulos fúngicos difiere de la utilizada en este trabajo. En el estudio de Pedrini et al. (2010), se sumergieron ejemplares adultos por 6 segundos en soluciones de conidios de *B. bassiana* GHA de concentraciones entre 1×10^6 hasta 1×10^9 conidios/ml, evaluando la mortalidad a los 7 y 14 días de la exposición. Se observó que solo la concentración más alta utilizada generó una mortalidad significativa ($4,0\% \pm 1,7$) tras 14 días, lo que sugiere una baja eficacia en condiciones de exposición breve. Todos los individuos muertos presentaron emergencia de *B. bassiana*. En Huarte-Bonnet et al. (2018, 2019) evaluaron la mortalidad de larvas de *T. castaneum* expuestas a otro tipo de propágulos fúngicos de la misma cepa de *B. bassiana*, pellets miceliales y microesclerocios, respectivamente, obteniendo mortalidades de alrededor del 70% para larvas; y nuevamente observando emergencia de *B. bassiana* a partir de los cadáveres.

En contraste, Golshan et al. (2014) reportaron tasas de mortalidad del 60% para adultos *T. castaneum* expuestos a una suspensión de concentración 1×10^8 conidios/ml por 20 segundos, utilizando la cepa IRAN 440C. Por otro lado, Muslim y Al-Zurfi (2019) reportaron tasas entre 75% y 95% en larvas, y entre 40% y 60% en adultos, para *T. castaneum* tratados por rociado con *B. bassiana* ATCC 74040 a concentraciones entre 3×10^4 y 3×10^8 conidios/ml y tiempos entre 10-15. Rehman et al. (2020) obtuvieron la mayor mortalidad (71%) en larvas de *T. castaneum* expuestas a una combinación de *B. bassiana* (formulado comercial *Racer*) de una concentración de $0,9 \times 10^8$ conidios/ml con extractos vegetales sobre granos de trigo. En resumen, si bien se puede decir que los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los obtenidos en estudios previos, cabe destacar que existe una gran varianza en los resultados de mortalidad dependiendo del método utilizado. Los resultados son dependientes de la estrategia de infección utilizada, los tiempos de exposición, y la cepa utilizada y su concentración.

En general, la mortalidad para adultos es menor que en larvas, y en este estudio se observó una mortalidad a tiempo final para larvas de prácticamente el doble que en adultos. Las

diferencias entre la mortalidad observada en larvas y adultos indica una diferencia en la susceptibilidad entre estos. Es probable que la mortalidad en larvas sea mayor ya que estas no poseen cutícula, y, por lo tanto, no poseen las barreras físicas y químicas presentes en ella (Pedrini et al., 2015) y son mucho más vulnerables a la infección.

También cabe destacar que, en general, en estudios donde la aplicación de *B. bassiana* es superficial, única y momentánea, la mortalidad observada es menor; en cambio cuando *T. castaneum* está expuesto constantemente a *B. bassiana*, la mortalidad es mayor. En el caso de preparados mantenidos a lo largo del tiempo como la mezcla de polvo de conidios y harina, esta podría no sólo deberse a los tiempos prolongados de exposición, pero la posibilidad de la ingesta del preparado podría proporcionar al hongo de una vía de ingreso alternativa.

En este estudio, en todos los casos se pudo observar que para las cepas recombinantes BbG4 y BbR5, la mortalidad obtenida fue comparable con aquella de la cepa *wild type*, lo cual indicaría que la secuencia insertada se integró sin afectar ningún gen asociado a la patogenicidad. En cambio, para la cepa recombinante BbG6, los resultados obtenidos indicarían que la inserción puede haber ocurrido en algún gen asociado directa, o indirectamente, a la patogenicidad; causando así la disminución en la mortalidad observada. En base a estos resultados, se descartó la cepa recombinante BbG6 para los ensayos posteriores.

Métodos de esterilización de semillas de soja

Se evaluaron tres métodos de esterilización (NaClO 2% p/v, EtOH 70% v/v + NaClO 2% p/v, y NaClO 3% p/v) y se compararon con un control sin esterilizar para seleccionar un método de esterilización de semillas de soja para los siguientes ensayos. Para esta evaluación se determinó el porcentaje de semillas germinadas; y dentro del grupo de semillas germinadas, luego de 3, 5 y 6 días se determinó la longitud de raíz, el número de raíces secundarias y el nivel de contaminación, como se describió en el apartado de metodología. Se evaluó el porcentaje de semillas germinadas para cada tratamiento:

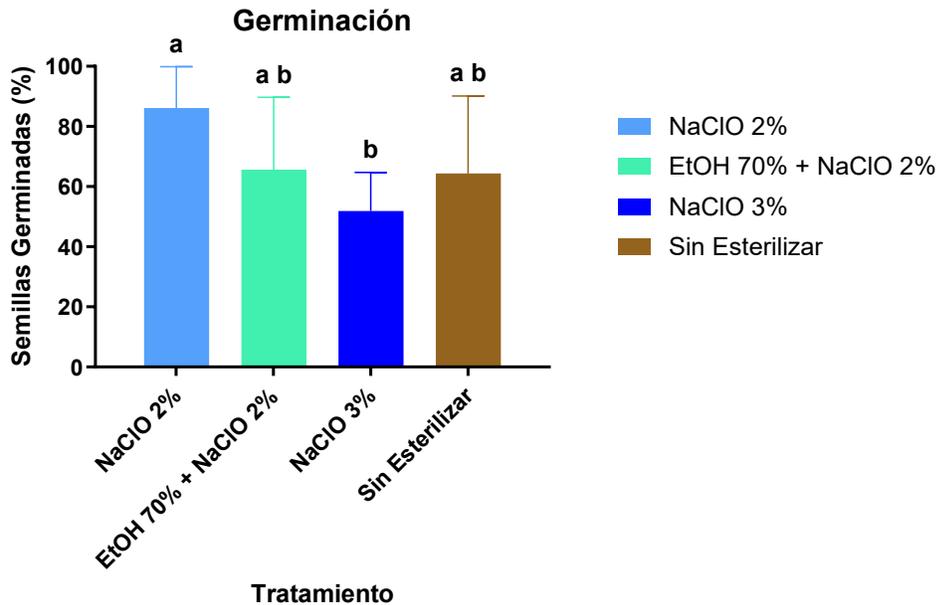


Figura 3.3: Semillas de *G. max* germinadas (%) luego de su esterilización con tratamientos: NaClO 2%, EtOH 70% + NaClO 2%, NaClO 3%; y no esterilizadas.

Letras distintas en cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$; Tukey's test).

A continuación, se realizó un análisis de 1-way ANOVA: Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($F(3, 27) = 4.548$, $p = 0.0105$). Se compararon los tratamientos utilizados entre sí, mediante el análisis post-test de Tukey. Se observó que el porcentaje de germinación para las semillas tratadas con NaClO 2% es significativamente mayor ($p = 0.0351$) que para las semillas tratadas con NaClO 3%.

Se puede observar una tendencia no significativa en el gráfico que indicaría que el tratamiento con NaClO 2% presenta el mayor porcentaje de germinación.

Se obtuvieron los siguientes resultados para los parámetros de longitud de raíz, número de raíces secundarias, y nivel de contaminación.

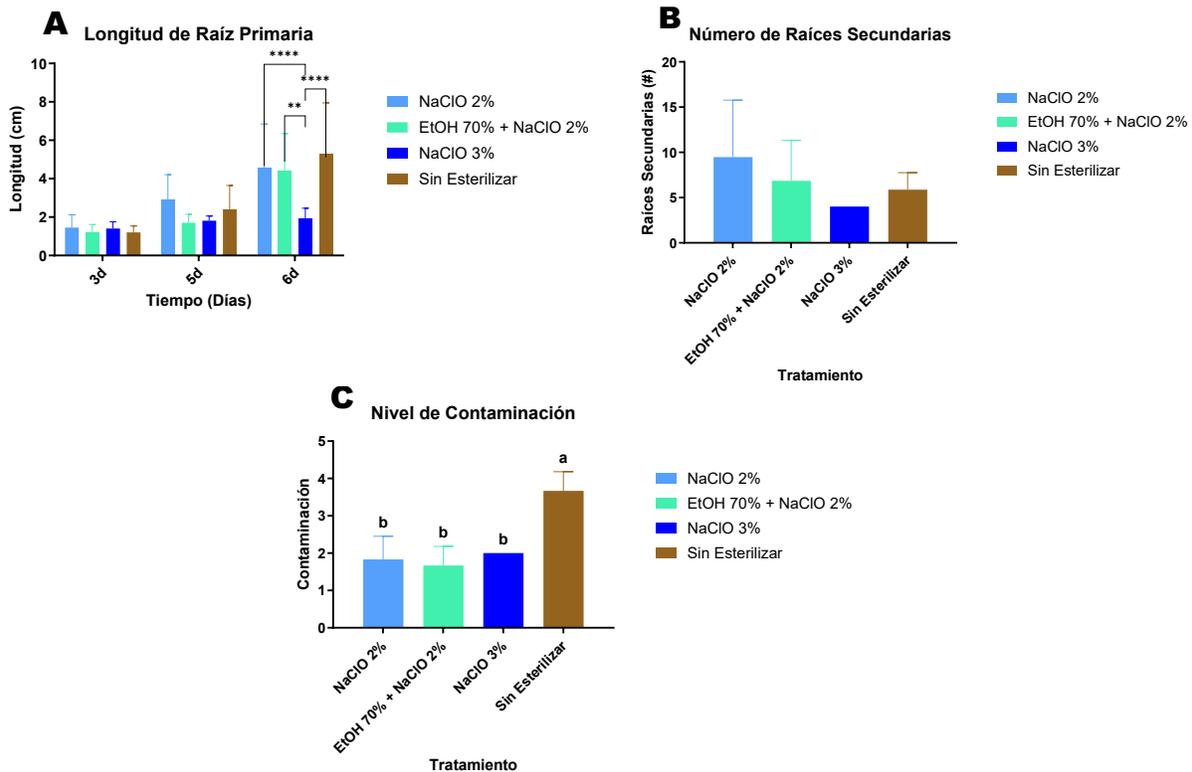


Figura 3.4: Longitud de raíz primaria (A), número de raíces secundarias (B) y nivel de contaminación (C) para semillas tratadas con NaClO 2%, EtOH 70% + NaClO 2%, NaClO 3%; y no esterilizadas. Los asteriscos en (A) y letras en (C) indican diferencias significativas entre tratamientos. ($p < 0.05$; Tukey's test).

A continuación, se realizó un análisis de 2-way ANOVA para la longitud de raíz primaria. Se observó un efecto significativo tanto del tiempo ($F(2, 172) = 30.33$, $p < 0.0001$) como de los tratamientos ($F(3, 172) = 3.486$, $p = 0.0171$) sobre la longitud. Se detectó una interacción significativa entre ambos factores ($F(6, 172) = 2.272$, $p = 0.0390$).

Se compararon los tratamientos utilizados entre sí, mediante el análisis post-test de Tukey. Para la longitud de la raíz, al día 6, se evidencian diferencias significativas para el tratamiento con NaClO al 3%, siendo la longitud significativamente menor que en el resto de los tratamientos (**NaClO 2% vs NaClO 3%**, $p < 0.0001$; **EtOH 70% + NaClO 2% vs NaClO 3%**, $p = 0.0020$; **Sin Esterilizar vs NaClO 3%**, $p < 0.0001$). En cambio, a los 3 y 5 días no se observan diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Figura 3.4A).

El número de raíces secundarias tratadas con los diversos métodos de esterilización y el control sin esterilizar son similares, y no se observaron diferencias significativas (Figura 3.4B).

Se realizó un análisis de 1-way ANOVA para el nivel de contaminación. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (**$F(3, 29) = 18.01$, $p < 0.0001$**). Se compararon los tratamientos utilizados entre sí, mediante el análisis post-test de Tukey. Como se esperaba, se logró disminuir significativamente el nivel de contaminación para las semillas esterilizadas frente al control sin esterilizar (**NaClO 2% vs Sin Esterilizar, $p < 0.0001$; EtOH 70% + NaClO 2% vs Sin Esterilizar, $p < 0.0001$; NaClO 3% vs Sin Esterilizar, $p = 0.0013$**). Sin embargo, no se evidencian diferencias significativas en niveles de contaminación entre los distintos métodos de esterilización evaluados (Figura 3.4C).

Los métodos de esterilización evaluados en este estudio fueron adaptados de estudios previos (Costa-Catala et al., 2024; Davoudpour et al., 2020; Escamilla et al., 2019).

En Escamilla et al. (2019), se evaluaron varios métodos de esterilización de semillas de soja (agua a 60°C durante 2 minutos, calor seco a 50°C durante 1 hora, $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ al 2% durante 10 minutos, NaClO al 2% durante 10 minutos, ácido acético al 5% durante 2 minutos, ácido láctico al 5% durante 10 minutos), y se determinó que los mejores tratamientos para eliminar la contaminación fueron los de hipoclorito de calcio, ácido acético, y agua caliente; seguido de ácido láctico e hipoclorito de sodio. De acuerdo a la disponibilidad de insumos en el laboratorio, se seleccionó del segundo grupo, NaClO al 2%. Este método logró reducir la contaminación de 60% del control con agua estéril a 40% para las tratadas con NaClO al 2% en Escaramilla et. al., (2019).

En el estudio de Costa-Catala et al. (2024), se analizó el efecto de distintos métodos de esterilización en la tasa de germinación de las legumbres soja, lenteja, y garbanzo. Se utilizó NaClO en concentraciones de 70 mg/L y 100 mg/L (0,007% y 0,01% p/v), y EtOH al 70%. Las semillas fueron sumergidas en una de estas soluciones por 5 o 15 minutos con agitación, seguidas de un enjuague con agua destilada. No se compararon directamente los métodos entre sí, pero ambos mostraron un aumento significativo en la tasa de germinación en comparación con semillas no tratadas.

Davoudpour et al. (2020) evaluaron tres métodos de esterilización de semillas de maíz, y se determinó que los más eficientes para reducir la contaminación fueron los tratamientos con inmersión en NaClO al 10% con 17 µl de Tween 20 por 10 minutos seguida de un enjuague con agua por 2 minutos; y un pretratamiento con EtOH al 70% por 3 minutos, y a continuación dos esterilizaciones con la mezcla de NaClO y Tween durante 15 minutos cada una, y un enjuague final con agua cinco veces por 2 minutos cada vez. Adicionalmente, este último presentó el mayor porcentaje de germinación de todos los tratamientos, por lo que se adaptó de este trabajo un tratamiento combinado de NaClO y EtOH para estudiar como alternativa de esterilización.

En general, los estudios coinciden en que NaClO es una opción viable para la esterilización de semillas. En este trabajo, se comprobó que NaClO al 2% es un método eficiente para soja; sin embargo, concentraciones mayores, como 3%, modificaron significativamente los parámetros de germinación. Esto indicaría que la exposición a una mayor concentración de NaClO podría afectar negativamente la capacidad germinativa de la semilla. Otro aspecto importante para considerar son los tiempos de exposición: mayores tiempos de exposición podrían aumentar la efectividad, pero también aumenta el riesgo de perder viabilidad. Tiempos más cortos son más seguros para la viabilidad de las semillas, pero no son tan eficientes para esterilizar.

De acuerdo con estos antecedentes, y con los resultados de porcentaje de germinación y longitud de raíz obtenidos en este estudio, se descartó el método de NaClO 3%. Observaciones en la apariencia física de las semillas tratadas con EtOH 70% + NaClO 2%, como color y forma atípicos, sumado a la tendencia observada del porcentaje de germinación, llevó al descarte de este método. Por todo esto, se seleccionó NaClO al 2% como método de esterilización para los ensayos posteriores. Esta metodología incluye tiempos medios de esterilización lo suficientemente prolongados para reducir la contaminación, y lo suficientemente cortos para comprometer lo menos posible la viabilidad de la semilla.

Ensayo de germinación de semillas inoculadas

Una vez elegido a NaClO al 2% como método de esterilización para este trabajo, se prosiguió con los ensayos de germinación de semillas tratadas con el polvo de conidios de las cepas *wild type* y recombinantes GFP y RFP seleccionadas (BbG4 y BbR5, respectivamente), y el control de semillas esterilizadas sin inoculación fúngica. Para esta evaluación se determinó el porcentaje de semillas germinadas; y de las germinadas, luego de 3, 5 y 6 días se determinó la longitud de raíz, el número de raíces secundarias (solo medido a los 6 días) y el nivel de contaminación, siguiendo la misma metodología que para la evaluación de métodos de esterilización.

Se evaluó el porcentaje de semillas germinadas para cada tratamiento:

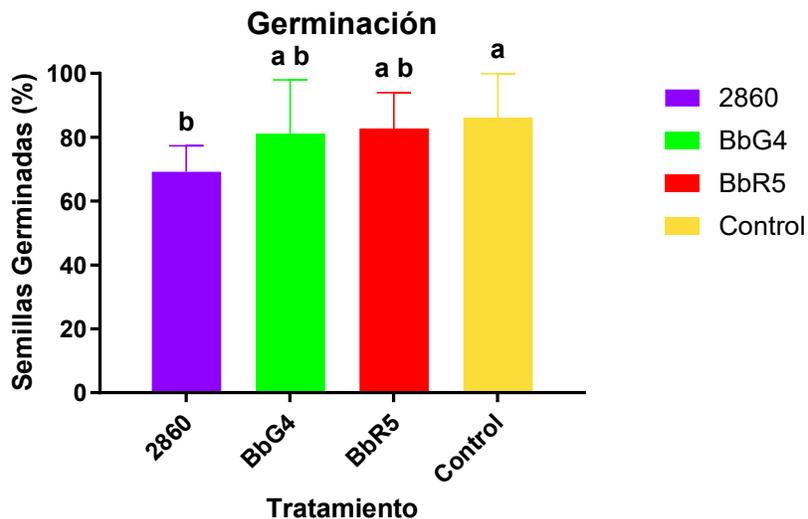


Figura 3.5: Semillas de *G. max* germinadas (%) luego de su inoculación con *B. bassiana*: la cepa *wild type* 2860, las cepas recombinantes BbG4 y BbR5; y control sin inocular. Letras distintas en cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$; Tukey's test).

A continuación, se realizó un análisis de 1-way ANOVA: Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($F(3, 42) = 4.245$, $p = 0.0104$). Se compararon los tratamientos utilizados entre sí, mediante el análisis post-test de Tukey. Se observó que el porcentaje de germinación para las semillas no inoculadas es significativamente mayor ($p = 0.0065$) que para las semillas inoculadas con la cepa 2860. No se encontraron diferencias significativas entre la cepa *wild type* y las cepas recombinantes.

Se obtuvieron los siguientes resultados para los parámetros de longitud de raíz, número de raíces secundarias, y nivel de contaminación.

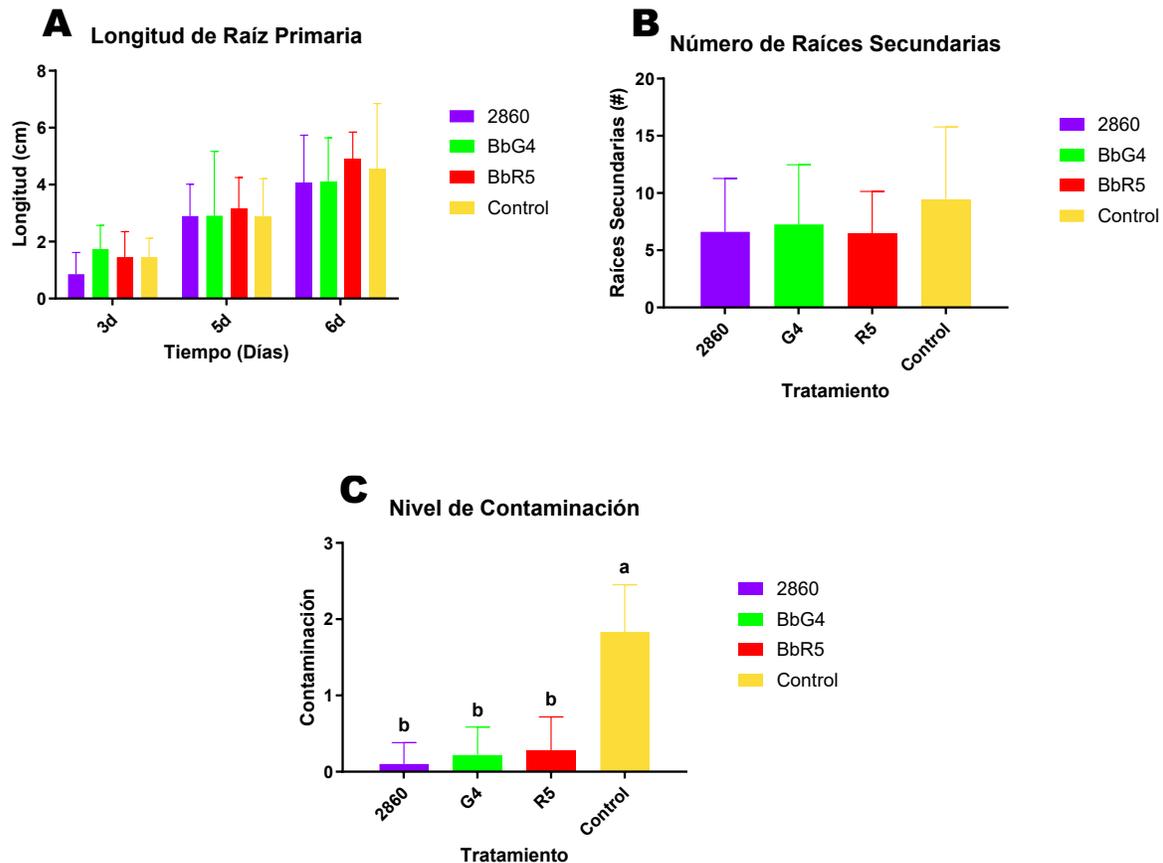


Figura 3.6: Longitud de raíz primaria (A), número de raíces secundarias (B) y nivel de contaminación (C) para semillas inoculadas con *B. bassiana*: la cepa *wild type* 2860, las cepas recombinantes BbG4 y BbR5; y control sin inocular. Las letras en (C) indican diferencias significativas entre tratamientos. ($p < 0.05$; Tukey's test).

A continuación, se realizó un análisis de 2-way ANOVA para la longitud de raíz primaria. Se observó un efecto significativo del tiempo ($F(2, 336) = 125.9$, $p < 0.0001$), y no significativo de los tratamientos ($F(3, 336) = 2.276$, $p = 0.0796$) sobre la longitud. No se detectó una interacción significativa entre ambos factores ($F(6, 336) = 0.9176$, $p = 0.4823$).

Se compararon los tratamientos utilizados entre sí, mediante el análisis post-test de Tukey. La longitud de la raíz aumentó de forma constante en el tiempo para todos los tratamientos,

sin diferencias significativas entre las semillas inoculadas con polvo de conidios de cada cepa y las semillas control en ninguno de los días analizados (Figura 3.6A).

De igual manera, el número de raíces secundarias fue similar en todas las condiciones (Figura 3.6B). Esto indica que la inoculación no afectó negativamente el desarrollo radicular. Se realizó un análisis de 1-way ANOVA para el nivel de contaminación. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (**F(3, 47) = 49.05, p < 0.0001**). Se compararon los tratamientos utilizados entre sí, mediante el análisis post-test de Tukey.

Los niveles de contaminación observados muestran que las semillas (previamente esterilizadas) inoculadas presentaron una disminución significativa en el nivel de contaminación, contra las semillas control esterilizadas y no inoculadas con polvo de hongos (**2860 vs Control, p < 0.0001; BbG4 vs Control, p < 0.0001; BbR5 vs Control, p < 0.0001**) (Figura 3.6C).

Como antecedentes de este resultado, Erdoğan y Sağlan (2023) demostraron que *B. bassiana* posee actividad antifúngica contra *Verticillium dahliae*, un hongo patógeno del algodón, observando una inhibición significativa del crecimiento micelial cuando ambas especies fueron plaqueadas juntas. De manera similar, Barra-Bucarei et al. (2020) reportaron que *B. bassiana* inhibe radialmente el crecimiento de *Botrytis cinerea*, un patógeno que afecta cultivos de tomate y ají. Estos hallazgos son relevantes, ya que sugieren que la presencia de *B. bassiana* podría cumplir un papel en la competencia o inhibición de crecimiento frente a otros microorganismos.

Para el resultado obtenido en este estudio, una posible explicación es que *B. bassiana* se encuentra en concentraciones suficientemente altas como para desplazar a otros organismos. Sin embargo, también es posible que posea propiedades antifúngicas o antimicrobianas que limiten el crecimiento de otros contaminantes, lo cual concuerda con estudios previos.

Seguimiento de parámetros morfológicos de soja

Se registraron parámetros de desarrollo de la planta (altura, número de hojas, longitud de raíz) regularmente, y los resultados obtenidos se muestran a continuación.

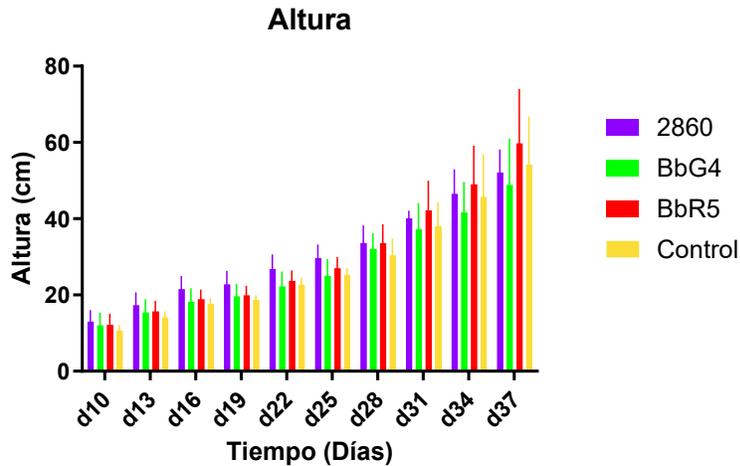


Figura 3.7 Altura (en centímetros) a cada día, de plantas inoculadas con *B. bassiana*: la cepa *wild type* 2860, las cepas recombinantes BbG4 y BbR5; y control sin inocular.

Como era de esperarse, la altura de las plantas mostró una tendencia creciente a lo largo del tiempo en todos los tratamientos. El crecimiento fue uniforme en todas las condiciones evaluadas, sin diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

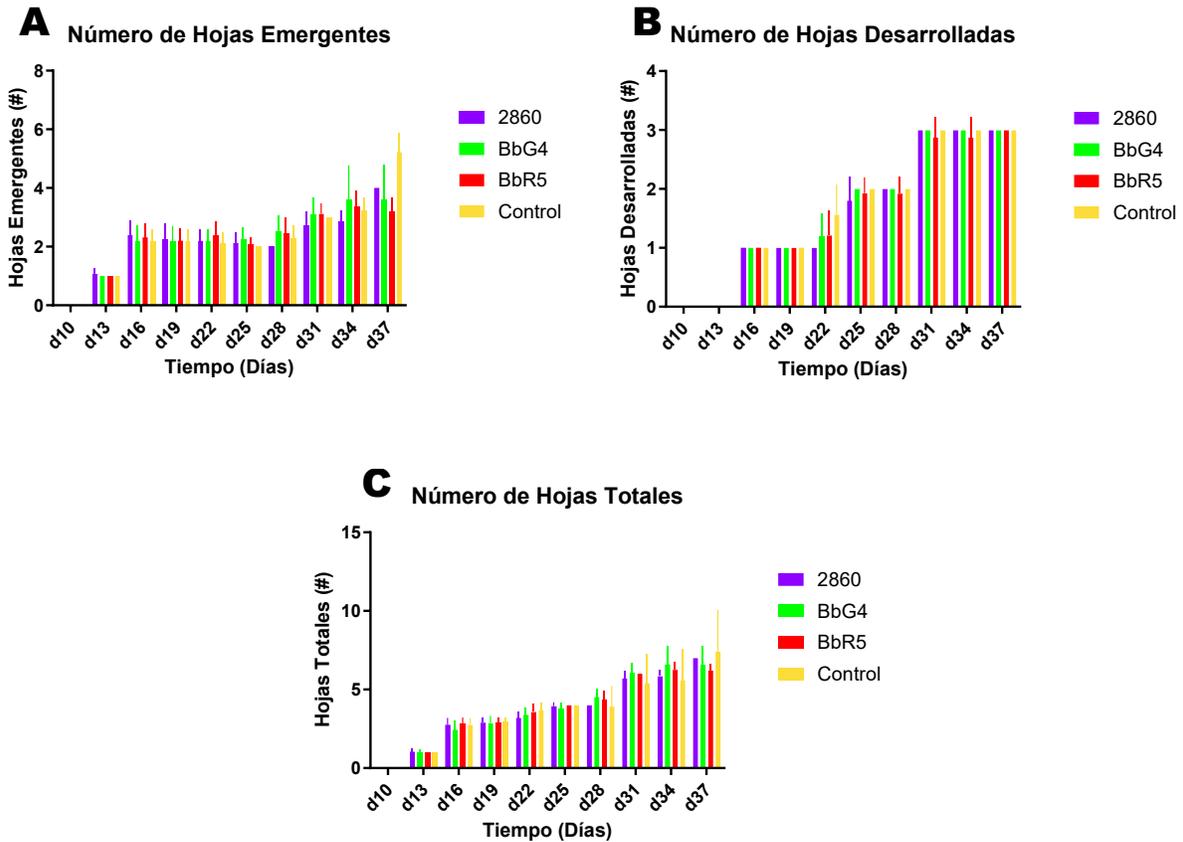


Figura 3.8: Número de hojas emergentes (A), desarrolladas (B), y totales (C) en cada día, de plantas inoculadas con *B. bassiana*: la cepa *wild type* 2860, las cepas recombinantes BbG4 y BbR5; y control sin inocular.

En las hojas desarrolladas (Figura 3.8B) se identificaron “saltos” correspondientes a la transición de hojas emergentes a desarrolladas, coincidiendo con los días de reaslamiento. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, evidenciando un desarrollo vegetal consistente en todas las condiciones.

Se midió la longitud de la raíz en las plantas extraídas para el reaslamiento a los 22, 28 y 37 días después de la siembra, como se muestra en la figura 3.9:

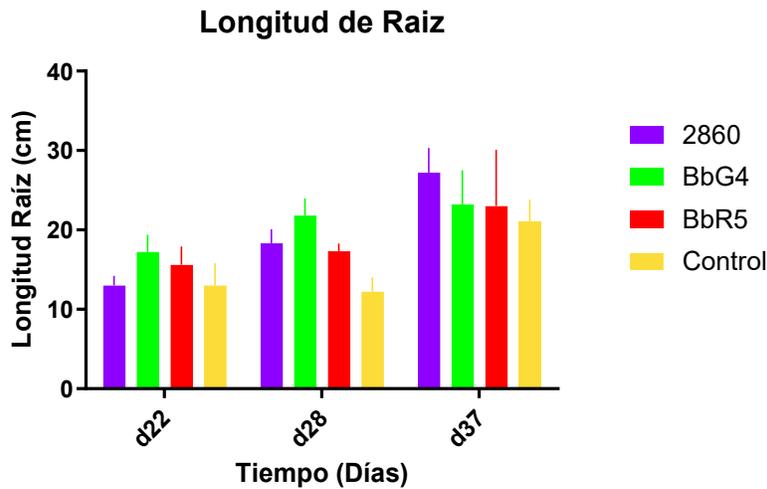


Figura 3.9: Longitud de raíz a tiempo final de plantas inoculadas con *B. bassiana*: la cepa *wild type* 2860, las cepas recombinantes BbG4 y BbR5; y control sin inocular.

Los resultados sugieren una posible tendencia de aumento de la longitud con el tiempo. Se observa un aumento más notable luego de los 37 días, pero se necesitan más réplicas para poder analizar correctamente estos resultados.

Se han realizado diversos estudios evaluando la capacidad endofítica y el efecto bioestimulante de *B. bassiana* en soja y otras especies vegetales, utilizando distintos métodos de inoculación.

Estudios previos han reportado efectos bioestimulantes. Por ejemplo, Russo et al. (2019) evaluaron tres técnicas de inoculación de 14 cepas de *B. bassiana* a una concentración de 1×10^8 conidios/ml en soja (inmersión de semillas, inmersión de raíces y aspersion foliar) y se midieron parámetros de crecimiento hasta 28 días después de la inoculación. Se observaron incrementos significativos en altura, número de ramas, peso y número de vainas, cantidad y peso de semillas, así como en el rendimiento general de las plantas inoculadas. De manera similar, Qin et al. (2021) reportaron un aumento significativo en altura, biomasa, desarrollo radicular y área foliar en plantas de tabaco 40 días luego de ser inoculadas por inmersión de semillas en suspensiones de seis cepas distintas de *B. bassiana* de concentración de 2×10^7 conidios/ml cada una.

No obstante, algunos estudios sugieren que el efecto bioestimulante de *B. bassiana* puede no ser universal. Wei et al. (2020), al inocular tomate mediante aspersión foliar e irrigación radicular con *B. bassiana* (1×10^8 conidios/ml), no encontraron diferencias significativas en el crecimiento de raíces, tallo, área foliar ni peso seco en comparación con el control luego de dos semanas desde la inoculación, aunque tampoco se observaron efectos negativos. Esto sugiere que la respuesta puede depender tanto del método de inoculación como del cultivo en estudio.

Por otro lado, estudios con *Metarhizium spp.*, otro hongo entomopatógeno con capacidad endofítica, han mostrado efectos bioestimulantes similares a los reportados para *B. bassiana*. En el estudio de Khan et al. (2012) se inoculó soja con *Metarhizium anisopliae* bajo condiciones de estrés salino y encontraron un aumento significativo del 12% en la altura de los brotes, además de mejoras en peso fresco, peso seco y área foliar, luego de 3 semanas de exposición al hongo.

Hasta el momento, no existen reportes previos que analicen la inoculación mediante adhesión de polvo de conidios, como se utilizó en este estudio. En este caso, como sólo se realizó una réplica, no se puede confirmar ni descartar el efecto bioestimulante de *B. bassiana*. Se requiere un mayor número de réplicas para poder analizar estos resultados, y obtener datos más robustos.

Detección y seguimiento de endofitismo

Para detectar la presencia de *B. bassiana* en distintos órganos de la planta, se plaquearon fragmentos de hoja, tallo y raíz de plantas en cada estadio vegetativo en placas con medio PDA. Se realizaron los ensayos de reaislamiento a los días 22, 28 y 37 luego de la siembra, que corresponden con los estadios V1, V2 y V3, respectivamente.

Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes figuras.

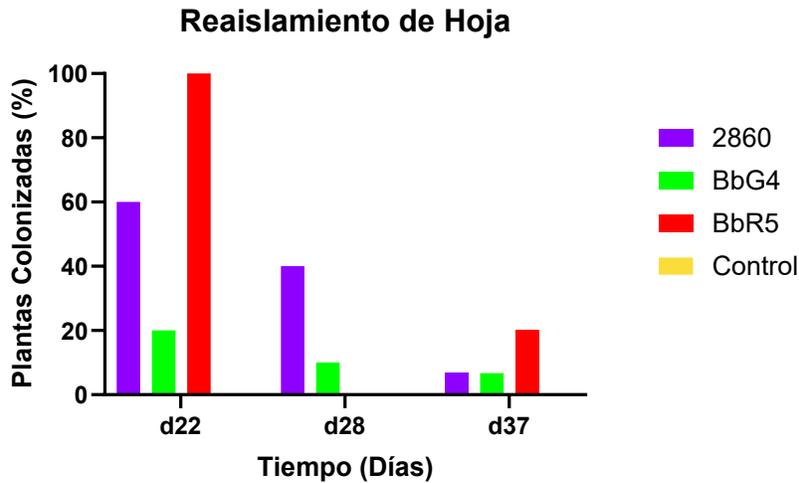


Figura 3.10: Porcentaje de plantas que presentaron emergencia de *B. bassiana* desde hoja, de plantas inoculadas con la cepa *wild type* 2860, las cepas recombinantes BbG4 y BbR5; y control sin inocular.

En el reaislamiento de hoja, el porcentaje de colonización para 2860, BbG4, y BbR5 sigue una tendencia de disminución a lo largo del tiempo. Es interesante notar que no se observó colonización de BbR5 al día 28, aunque luego reaparece al día 37.

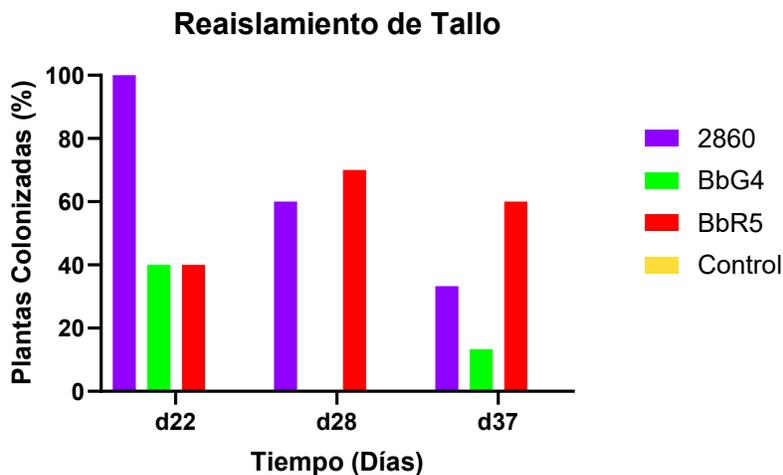


Figura 3.11: Porcentaje de plantas que presentaron emergencia de *B. bassiana* desde tallo, de plantas inoculadas con la cepa *wild type* 2860, las cepas recombinantes BbG4 y BbR5; y control sin inocular.

En el reislamiento de tallo, como en el de hojas, se observa nuevamente la tendencia de disminución para 2860 y BbG4, mientras que para BbR5 en este caso no se ve tan clara esta tendencia, sino que se mantiene entre valores de 40% y 70% de colonización para los tres días de reislamiento. Un detalle para destacar es que no se observó colonización de BbG4 al día 28, aunque sí se observó al día 37.

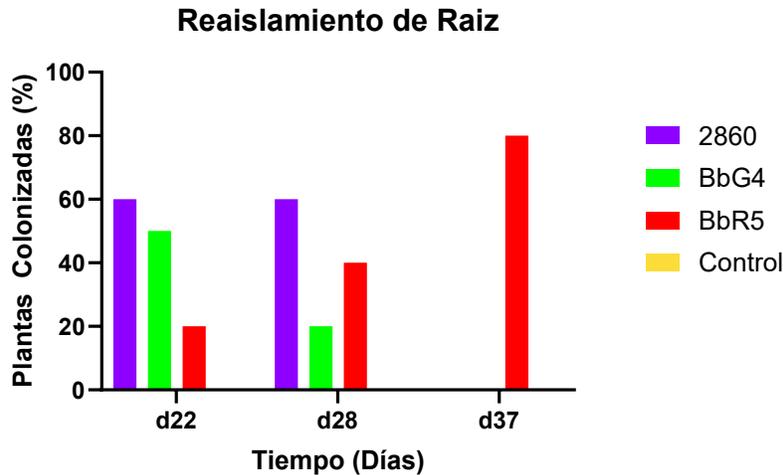


Figura 3.12: Porcentaje de plantas que presentaron emergencia de *B. bassiana* desde raíz, de plantas inoculadas con la cepa *wild type* 2860, las cepas recombinantes BbG4 y BbR5; y control sin inocular.

Finalmente, para raíz, se observa una tendencia de disminución del porcentaje de colonización para 2860 y BbG4, hasta el día 37 donde no se detectó crecimiento de *B. bassiana* de estos tejidos. En cambio, para BbR5 se observa lo inverso: la tendencia en aumento del porcentaje de colonización a lo largo del tiempo.

En todos los casos, se logró reaislar *B. bassiana* de hojas, tallos, y raíces de soja, obteniendo porcentajes de colonización variados: para los 22 días post-inoculación, se observaron porcentajes de 20%, 60% y 100% de colonización en hoja (Figura 3.10), para los tres tratamientos evaluados 2860, BbG4, y BbR5, respectivamente. En tallo (Figura 3.11), a los 22 días se observó un 40% de colonización para BbG4 y BbR5, y 100% para 2860; mientras que en raíz (Figura 3.12); un 20% para BbR5, 40% para BbG4 y 60% para 2860. Para todos los casos, nunca se observó colonización de *B. bassiana* en los controles, como era de esperarse.

Diversos estudios han evaluado la capacidad de *B. bassiana* para colonizar plantas a través de diferentes métodos de inoculación, observando su persistencia en diversos tejidos vegetales.

Russo et al., (2015) evaluaron tres métodos de inoculación en soja (inmersión de semilla, inmersión de raíz y aspersion foliar) utilizando una suspensión de conidios de *B. bassiana* LPSC 1067 de concentración de 1×10^8 conidios/mL y se observó la emergencia del hongo desde la hoja en todos los casos. La colonización más alta en hoja (24% de fragmentos colonizados) se detectó a los 7 días post-inoculación con aspersion foliar, mientras que la inmersión radicular mostró un pico de colonización (10,5%) a los 14 días. Sin embargo, se observó una tendencia decreciente en la colonización con el tiempo. En un estudio posterior (Russo et al., 2019) se observaron resultados similares, observándose recuperación de 14 cepas de *B. bassiana* (entre ellas LPSC 1067) para los tres métodos de inoculación, aislando desde raíz, tallo, y hoja.

De manera similar, Clifton et al. (2018) inocularon semillas de soja por inmersión durante 24 horas en una suspensión de conidios de concentración de 1×10^8 conidios/ml. A los 14, 21, y 28 días se reaisló *B. bassiana*. Se observó colonización entre 15% y 40% para tallo, y 25% para hojas, aunque no se detectó colonización a los 28 días para hojas.

También se evidenció colonización de *B. bassiana* en otras plantas: Parsa et al. (2013) inocularon *Phaseolus vulgaris* con *B. bassiana* mediante aspersion foliar e inundación del suelo con una suspensión de concentración de 1×10^8 conidios/mL, logrando una colonización del 20-30% en hojas, tallos y raíces a los 14 días. Toffa et al. (2021) evaluaron la inoculación en tomate mediante recubrimiento de semillas con *B. bassiana* (1×10^7 y 1×10^9 conidios/mL), obteniendo tasas de colonización de entre 10% y 90% en hojas, 20% a 60% en tallos y 40% a 90% en raíces, dependiendo de la concentración utilizada.

Asimismo, estudios con otro hongo entomopatógeno endófito, *Metarhizium spp.*, han reportado colonización del tejido vegetal cuando se inocula en soja. Holz et al. (2023) inocularon plantas mediante inundación del suelo con *M. anisopliae* y *M. humberi* (2×10^5 conidios/mL) y confirmaron cualitativamente su presencia en raíces y suelo. Clifton et al.

(2018), utilizando el protocolo de inmersión de semillas con *M. brunneum* (1×10^8 conidios/ml), registraron solo un 10% de colonización en tallo a los 14 días.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren una tendencia similar a la reportada previamente: *B. bassiana* es capaz de colonizar distintos órganos vegetales tras la inoculación, pero su nivel de reislamiento tiende a disminuir con el tiempo. Los resultados obtenidos (Figuras 3.10, 3.11, y 3.12) evidencian algunas tendencias: en las cepas *wild type* y BbG4, la presencia fúngica en el tejido vegetal tiende a disminuir con el tiempo, mientras que en la cepa BbR5 tiende a mantenerse o incluso puede llegar a aumentar (Figura 3.12) en algunos casos.

Una posible explicación para la tendencia observada en la cepa BbR5 para el reislamiento de raíz (Figura 3.12) podría ser que, del mismo modo que la presencia de la inserción del gen GFP en la cepa BbG6 causó diferencias en el comportamiento infectivo (Figura 3.2), es posible que en el caso de BbR5, la inserción esté interviniendo en este caso con algún gen vinculado directa o indirectamente al endofitismo.

En las figuras 3.10 y 3.11, se observa que, en algunos casos, pareciera “desaparecer” el hongo en el reislamiento, pero posteriormente vuelve a observarse. Esto puede explicarse debido a la metodología del reislamiento: al no utilizar la totalidad de cada uno de los tejidos, se introduce un elemento azaroso, es decir, la distribución de las células fúngicas no es homogénea dentro de los tejidos y en el tiempo.

Dado lo mencionado previamente, el método microbiológico para evidenciar endofitismo de *B. bassiana* que fue utilizado en este ensayo no sería el ideal para estudiar la dinámica de distribución de las células fúngicas en plantas de sojas, y presentaría un significativo grado de imprecisión. Sin embargo, existirían alternativas más confiables, que podrían ser evaluadas. Si se inocularan las plantas con una de las cepas recombinantes, se podría medir y cuantificar la presencia de *B. bassiana* en la totalidad de la planta empleando técnicas moleculares como qPCR, cuantificando la secuencia de GFP, técnica basada en el trabajo de Qin et al. (2021) que se está poniendo a punto en el laboratorio. La dinámica de la colonización fúngica también podría seguirse por observación directa de tejido vegetal con microscopía confocal, metodología que se planea abordar en el futuro cercano.

Sin embargo, es importante destacar que, para todos los tratamientos realizados en este estudio, *B. bassiana* logró establecerse y mantenerse como endófito en la planta de soja durante la totalidad del ensayo, por más de un mes.

CONCLUSIONES

Este trabajo tuvo como objetivo avanzar en el conocimiento de la interacción entre el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y la planta de soja, a partir de la inoculación de semillas mediante la adhesión de conidios secos.

Se comprobó que las cepas recombinantes BbG4 y BbR5 conservan su capacidad entomopatogénica, mostrando niveles de mortalidad sobre el insecto modelo *Tribolium castaneum* comparables a la cepa *wild type*, y así validando su uso como herramientas para estudiar el endofitismo mediante distintas estrategias.

Además, se demostró que tanto la cepa *wild type* ARSEF 2860 como las cepas recombinantes BbG4 y BbR5, inoculadas por adhesión de conidios secos, son capaces de establecerse como endófitos en soja durante más de un mes, confirmando el éxito de la metodología desarrollada para la inoculación y el seguimiento del hongo en la planta.

En conjunto, estos hallazgos amplían significativamente el conocimiento sobre la capacidad endofítica de *B. bassiana* en soja, y aportan nuevas perspectivas para su aplicación en estrategias agrícolas sostenibles, menos dependientes de agroquímicos. Este trabajo sienta bases sólidas para futuras investigaciones orientadas a comprender en profundidad los mecanismos de interacción entre el *Beauveria bassiana* y *Glycine max*, así como para contribuir en el estudio de nuevas estrategias de aplicación en condiciones de campo y su potencial impacto sobre el rendimiento productivo. De este modo, se abren nuevas puertas a soluciones biotecnológicas para una agricultura más sustentable.

REFERENCIAS

- Abbott, W. S. (1925). A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *J. Econ. Entomol*, 18, 265–267.
- Afandhi, A., Widjayanti, T., Emi, A. A. L., Tarno, H., Afiyanti, M., & Handoko, R. N. S. (2019). Endophytic fungi *Beauveria bassiana* Balsamo accelerates growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40538-019-0148-1>
- Allegrucci, N., Velazquez, M. S., Russo, M. L., Perez, E., & Scorsetti, A. C. (2017). Endophytic colonisation of tomato by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: The use of different inoculation techniques and their effects on the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Plant Protection Research*, 57(4), 331–337. <https://doi.org/10.1515/jppr-2017-0045>
- Bamisile, B. S., Akutse, K. S., Siddiqui, J. A., & Xu, Y. (2021). Model Application of Entomopathogenic Fungi as Alternatives to Chemical Pesticides: Prospects, Challenges, and Insights for Next-Generation Sustainable Agriculture. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.741804>
- Baraibar Norberg, M., & Deutsch, L. (2023). The Soybean Through World History; Lessons for Sustainable Agrofood Systems.
- Barra-Bucarei, L., Iglesias, A. F., González, M. G., Aguayo, G. S., Carrasco-Fernández, J., Castro, J. F., & Campos, J. O. (2020). Antifungal activity of *Beauveria bassiana* endophyte against *Botrytis cinerea* in two Solanaceae crops. *Microorganisms*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010065>
- Bianchi, E., & Szpak, C. (2017). Soybean prices, economic growth and poverty in Argentina and Brazil. www.fao.org/publications
- BioRender. (n.d.). BioRender. Retrieved November 19, 2024, from <https://app.biorender.com/>
- Brivio, M. F., & Mastore, M. (2020). When appearance misleads: The role of the entomopathogen surface in the relationship with its host. *Insects*, 11(6), 1–24. <https://doi.org/10.3390/insects11060387>
- Cadenazzi, G. (2009). La historia de la soja en Argentina. De los inicios al boom de los '90. XXVII Congreso de La Asociación Latinoamericana de Sociología, VIII Jornadas de Sociología de La Universidad de Buenos Aires, Asociación Latinoamericana de Sociología, Buenos Aires, Argentina, 31, 0–62.
- Canassa, F., D'Alessandro, C. P., Sousa, S. B., Demétrio, C. G. B., Meyling, N. V., Klingen, I., & Delalibera, I. (2020). Fungal isolate and crop cultivar influence the beneficial effects of root inoculation with entomopathogenic fungi in strawberry. *Pest Management Science*, 76(4), 1472–1482. <https://doi.org/10.1002/ps.5662>
- Canassa, F., Tall, S., Moral, R. A., Lara, I. A. R. de, Delalibera, I., & Meyling, N. V. (2019). Effects of bean seed treatment by the entomopathogenic fungi *Metarhizium robertsii* and *Beauveria bassiana* on plant growth, spider mite populations and behavior of predatory mites. *Biological Control*, 132, 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.02.003>
- Clifton, E. H., Jaronski, S. T., Coates, B. S., Hodgson, E. W., & Gassmann, A. J. (2018). Effects of endophytic entomopathogenic fungi on soybean aphid and identification of *Metarhizium* isolates from agricultural fields. *PLoS ONE*, 13(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194815>
- Corrêa, B., da Silveira Duarte, V., Silva, D. M., Mascarin, G. M., & Júnior, I. D. (2020). Comparative analysis of blastospore production and virulence of *Beauveria bassiana* and *Cordyceps fumosorosea* against soybean pests. *BioControl*, 65(3), 323–337. <https://doi.org/10.1007/s10526-020-09999-6>

- Costa-Catala, J., Bori, J., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M. L., Vidal-Carou, M. C., & Comas-Basté, O. (2024). Influence of Seed Disinfection Treatments on the Germination Rate and Histamine-Degrading Activity of Legume Sprouts. *Foods*, 13(24). <https://doi.org/10.3390/foods13244105>
- da Silva, R. A., Quintela, E. D., Mascarin, G. M., Pedrini, N., Lião, L. M., & Ferri, P. H. (2015). Unveiling chemical defense in the rice stalk stink bug against the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 127, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.03.009>
- Davoudpour, Y., Schmidt, M., Calabrese, F., Richnow, H. H., & Musat, N. (2020). High resolution microscopy to evaluate the efficiency of surface sterilization of *Zea Mays* seeds. *PLoS ONE*, 15(11 November). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242247>
- Demetrio, P. M., Ronco, A. E., & Bonetto, C. A. (2012). Estudio de efectos biológicos de plaguicidas utilizados en cultivos de soja RR y evaluación de impactos adversos en ambientes acuáticos de agroecosistemas de la región pampeana.
- Erdoğan, O., & Sağlan, Z. (2023). Antifungal activity of local isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin against *Verticillium dahliae* Kleb. causing wilt disease of cotton. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 33(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-023-00684-1>
- Escamilla, D., Rosso, M. L., & Zhang, B. (2019). Identification of fungi associated with soybeans and effective seed disinfection treatments. *Food Science and Nutrition*, 7(10), 3194–3205. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1166>
- FAO. (n.d.). Valor de la Producción Agrícola. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QV>
- Fit, I., Plagas, F., & Soja, E. N. (2019). Plagas: Concepto y clasificación.
- FONTAGRO, INTA, & MAGYP. (2021). Introducción al manejo integrado de plagas, monitoreo de plagas en cítricos y fenología del cultivo.
- Gabarty, A., Salem, H. M., Fouda, M. A., Abas, A. A., & Ibrahim, A. A. (2014). Pathogenicity induced by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in *Agrotis ipsilon* (Hufn.). *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(1), 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2013.12.004>
- Golshan, H., Saber, M., Majidi-Shilsar, F., Karimi, F., & Ebadi, A. A. (2014). Laboratory Evaluation of *Beauveria bassiana* Isolates on Red Flour Beetle *Tribolium castaneum* and Their Characterization by Random Amplified Polymorphic DNA. In *J. Agr. Sci. Tech* (Vol. 16).
- Gonzalez, M., Miglioranza, K. S. B., Aizpún, J. E., Isla, F. I., & Peña, A. (2010). Assessing pesticide leaching and desorption in soils with different agricultural activities from Argentina (Pampa and Patagonia). *Chemosphere*, 81(3), 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.021>
- Greenfield, M., Gómez-Jiménez, M. I., Ortiz, V., Vega, F. E., Kramer, M., & Parsa, S. (2016). *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Biological Control*, 95, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.002>
- Heimpel, G. E., & Mills, N. J. (2017). *Biological Control: Definitions and Interactions*. In *Biological Control* (pp. 1–18). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781139029117.003>
- Holz, S., D'Alessandro, C. P., Maximo, H. J., Nascimento de Souza, P. H., Raruang, Y., Demétrio, C. G. B., Delalibera Júnior, I., Chen, Z. Y., & Pascholati, S. F. (2023). The potential of using *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium humberti* to control the Asian soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi*. *Biocontrol Science and Technology*, 33(4), 366–382. <https://doi.org/10.1080/09583157.2023.2191299>
- Huarte-Bonnet, C., Paixão, F. R. S., Mascarin, G. M., Santana, M., Fernandes, É. K. K., & Pedrini, N. (2019). The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* produces microsclerotia-like pellets mediated by oxidative

- stress and peroxisome biogenesis. *Environmental Microbiology Reports*, 11(4), 518–524.
<https://doi.org/10.1111/1758-2229.12742>
- Huarte-Bonnet, C., Paixão, F. R. S., Ponce, J. C., Santana, M., Prieto, E. D., & Pedrini, N. (2018). Alkane-grown *Beauveria bassiana* produce mycelial pellets displaying peroxisome proliferation, oxidative stress, and cell surface alterations. *Fungal Biology*, 122(6), 457–464. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.09.003>
- Humber, R. A. (2012). Identification of entomopathogenic fungi. In *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (pp. 151–187). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2.00006-3>
- Impullitti, A. E., & Malvick, D. K. (2013). Fungal endophyte diversity in soybean. *Journal of Applied Microbiology*, 114(5), 1500–1506. <https://doi.org/10.1111/jam.12164>
- Islam, W., Adnan, M., Shabbir, A., Naveed, H., Abubakar, Y. S., Qasim, M., Tayyab, M., Noman, A., Nisar, M. S., Khan, K. A., & Ali, H. (2021). Insect-fungal-interactions: A detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests. In *Microbial Pathogenesis* (Vol. 159). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105122>
- Jaber, L. R., & Ownley, B. H. (2018). Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? In *Biological Control* (Vol. 116, pp. 36–45). Academic Press Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.018>
- Kabaluk, J. T., & Ericsson, J. D. (2007). *Metarhizium anisopliae* seed treatment increases yield of field corn when applied for wireworm control. *Agronomy Journal*, 99(5), 1377–1381.
<https://doi.org/10.2134/agronj2007.0017N>
- Khachatourians, G. G., & Qazi, S. S. (2008). *Entomopathogenic Fungi: Biochemistry and Molecular Biology*.
- Khan, A. L., Hamayun, M., Khan, S. A., Kang, S. M., Shinwari, Z. K., Kamran, M., ur Rehman, S., Kim, J. G., & Lee, I. J. (2012). Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms soybean to higher growth and mitigates salt stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1483–1494.
<https://doi.org/10.1007/s11274-011-0950-9>
- Klein, H. S., & Vidal Luna, F. (2021). The growth of the soybean frontier in south america: The case of brazil and argentina. *Revista de Historia Económica - Journal of Iberian and Latin American Economic History*, 39(3), 427–468. <https://doi.org/10.1017/S0212610920000269>
- Kuzhuppillymyal-Prabhakaranikutty, L., Tamez-Guerra, P., Gomez-Flores, R., Rodriguez-Padilla, M. C., & Ek-Ramos, M. J. (2020). Endophytic *Beauveria bassiana* promotes drought tolerance and early flowering in corn. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(3). <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02823-4>
- Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., & Goettel, M. S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 1–41.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>
- Litwin, A., Nowak, M., & Różalska, S. (2020). Entomopathogenic fungi: unconventional applications. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 19, Issue 1, pp. 23–42). Springer.
<https://doi.org/10.1007/s11157-020-09525-1>
- Lopez, D. C., & Sword, G. A. (2015). The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). *Biological Control*, 89, 53–60.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.03.010>
- Lucarelli, F., & Trumper, E. V. (2015). Universidad Nacional de Villa María IAP Ciencias Básicas y Aplicadas.

- Macuphe, N., Oguntibeju, O. O., & Nchu, F. (2021). Evaluating the endophytic activities of *beauveria bassiana* on the physiology, growth, and antioxidant activities of extracts of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plants*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/plants10061178>
- Mannino, M. C., Huarte-Bonnet, C., Davyt-Colo, B., & Pedrini, N. (2019). Is the insect cuticle the only entry gate for fungal infection? Insights into alternative modes of action of entomopathogenic fungi. *Journal of Fungi*, 5(2). <https://doi.org/10.3390/jof5020033>
- Mantzoukas, S., Lagogiannis, I., Mpousia, D., Ntoukas, A., Karmakolia, K., Eliopoulos, P. A., & Poulas, K. (2021). *Beauveria bassiana* Endophytic Strain as Plant Growth Promoter: The Case of the Grape Vine *Vitis vinifera*. *J. Fungi*, 7(2).
- Marassatto, C. M. (2022). Induced systemic resistance by *Beauveria bassiana* in soybean plants and the effects on *Spodoptera frugiperda*.
- Mascarin, G. M., & Jaronski, S. T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 32, Issue 11). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>
- Ministerio de Economía; Secretaría de Agricultura, G. y Pesca. A. (2023). Estimaciones Agrícolas, Soja. <https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/estimaciones/monitor/>
- Muslim, S., & Al-Zurfi, A. (2019). Biological control of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* using entomopathogenic fungi.
- Mutune, B., Ekesi, S., Niassy, S., Matiru, V., Bii, C., & Maniania, N. K. (2016). Fungal endophytes as promising tools for the management of bean stem maggot *Ophiomyia phaseoli* on beans *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Pest Science*, 89(4), 993–1001. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0725-4>
- Muvea, A. M., Subramanian, S., Maniania, N. K., Poehling, H. M., Ekesi, S., & Meyhöfer, R. (2018). Endophytic colonization of onions induces resistance against viruliferous thrips and virus replication. *Frontiers in Plant Science*, 871. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01785>
- Nishi, O., Sushida, H., Higashi, Y., & Iida, Y. (2021). Epiphytic and endophytic colonisation of tomato plants by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* strain GHA. *Mycology*, 12(1), 39–47. <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1707723>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (n.d.). Uso de Plaguicidas.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2023). Cultivos y productos de ganadería. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Ortiz-Urquiza, A., & Keyhani, N. O. (2013). Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. In *Insects* (Vol. 4, Issue 3, pp. 357–374). <https://doi.org/10.3390/insects4030357>
- Parsa, S., Ortiz, V., & Vega, F. E. (2013). Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 74, 1–5. <https://doi.org/10.3791/50360>
- Pedrini, N., Ortiz-Urquiza, A., Huarte-Bonnet, C., Fan, Y., Juárez, M. P., & Keyhani, N. O. (2015). Tenebrionid secretions and a fungal benzoquinone oxidoreductase form competing components of an arms race between a host and pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(28), E3651–E3660. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504552112>
- Pedrini, N., Villaverde, M. L., Fuse, C. B., Bello, G. M. D., & Jurez, M. P. (2010). *Beauveria bassiana* infection alters colony development and defensive secretions of the beetles *Tribolium castaneum* and *Ulomoides*

- dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae). Journal of Economic Entomology, 103(4), 1094–1099.
<https://doi.org/10.1603/EC10072>
- Pedro Jesús Rocha, & Víctor Manuel Villalobos. (2012). Estudio comparativo entre el cultivo de soja genéticamente modificada y el convencional.
- Pelizza, S. A., Schalamuk, S., Simón, M. R., Stenglein, S. A., Pacheco-Marino, S. G., & Scorsetti, A. C. (2018). Compatibility of chemical insecticides and entomopathogenic fungi for control of soybean defoliating pest, *Rachiplusia nu*. Revista Argentina de Microbiología, 50(2), 189–201.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.06.002>
- Preisegger, L., Flecha, J. C., Ghilini, F., Espin-Sánchez, D., Prieto, E., Oberti, H., Abreo, E., Huarte-Bonnet, C., Pedrini, N., & Mannino, M. C. (2025). Visualizing Oral Infection Dynamics of *Beauveria bassiana* in the Gut of *Tribolium castaneum*. Journal of Fungi, 11(2). <https://doi.org/10.3390/jof11020101>
- Purcell, L. C., & Ashlock, L. (2014). Soybean Growth and Development - Chapter 2 Arkansas Soybean Production Handbook - MP197.
- Qin, X., Zhao, X., Huang, S., Deng, J., Li, X., Luo, Z., & Zhang, Y. (2021). Pest management via endophytic colonization of tobacco seedlings by the insect fungal pathogen *Beauveria bassiana*. Pest Management Science, 77(4), 2007–2018. <https://doi.org/10.1002/ps.6229>
- Rehman, H. ur, Rasul, A., Farooqi, M. A., Aslam, H. M. U., Majeed, B., Sagheer, M., & Ali, Q. (2020). Compatibility of some botanicals and the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Bals.), against the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). Egyptian Journal of Biological Pest Control, 30(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00329-7>
- Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G. H., Luangsa-ard, J. J., Devotto, L., & Humber, R. A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. Mycologia, 103(5), 1055–1073.
<https://doi.org/10.3852/10-302>
- Rivera, M. C., & Wright, E. R. (2014). Control biológico de enfermedades de plantas en argentina. In Control Biológico de Enfermedades de Plantas en América Latina y el Caribe (p. Cap. 1).
- Roberts, D. W., & Hajek, A. E. (1992). Entomopathogenic Fungi as Bioinsecticides. In Frontiers in Industrial Mycology (pp. 144–159).
- Ronco, A. E., Carriquiriborde, P., Natale, G. S., Martin, M. L., Mugni, H., & Bonetto, C. (2008). Integrated Approach for the Assessment of Biotech Pesticides Impact on Low Order Stream Ecosystems of the Pampasic Region. In Ecosystem Ecology Research Trends (pp. 209–239). Nova Science Publishers.
- Rubén, I. A., & Toledo, E. (2006). Etapas Fenológicas del Cultivo de Soja ETAPA VEGETATIVA.
<http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/field/soybeans.html>
- Russo, M. L. (2016). Hongos Entomopatógenos: Colonización Endofítica y Control de Insectos Plaga en Cultivos Agrícolas.
- Russo, M. L., Pelizza, S. A., Cabello, M. N., Stenglein, S. A., & Scorsetti, A. C. (2015). Endophytic colonisation of tobacco, corn, wheat and soybeans by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Hypocreales). Biocontrol Science and Technology, 25(4), 475–480.
<https://doi.org/10.1080/09583157.2014.982511>
- Russo, M. L., Pelizza, S. A., Cabello, M. N., Stenglein, S. A., Vianna, M. F., & Scorsetti, A. C. (2016). Hongos endófitos aislados de cultivares de soja (*Glycine max* L. Merr) y maíz (*Zea mays* L.) presentes en áreas agrícolas argentinas. Revista Argentina de Microbiología, 48(2), 154–160.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.11.006>

- Russo, M. L., Pelizza, S. A., Vianna, M. F., Allegrucci, N., Cabello, M. N., Toledo, A. V., Mourellos, C., & Scorsetti, A. C. (2019). Effect of endophytic entomopathogenic fungi on soybean *Glycine max* (L.) Merr. growth and yield. *Journal of King Saud University - Science*, 31(4), 728–736. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.04.008>
- Russo, M. L., Scorsetti, A. C., Vianna, M. F., Allegrucci, N., Ferreri, N. A., Cabello, M. N., & Pelizza, S. A. (2019). Effects of endophytic *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) on biological, reproductive parameters and food preference of the soybean pest *Helicoverpa gelotopoeon*. *Journal of King Saud University - Science*, 31(4), 1077–1082. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.11.009>
- Samal, I., Bhoi, T. K., Majhi, P. K., Murmu, S., Pradhan, A. K., Kumar, D., Saini, V., Paschapur, A. U., Raj, M. N., Ankur, Manik, S., Behera, P. P., Mahanta, D. K., Komal, J., Alam, P., & Balawi, T. Al. (2023). Combatting insects mediated biotic stress through plant associated endophytic entomopathogenic fungi in horticultural crops. *Frontiers in Plant Science*, 13(January), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1098673>
- Sánchez-Pérez, L. de C., Barranco-Florido, J. E., Rodríguez-Navarro, S., Cervantes-Mayagoitia, J. F., & Ramos-López, M. Á. (2014). Enzymes of Entomopathogenic Fungi, Advances and Insights. *Advances in Enzyme Research*, 02(02), 65–76. <https://doi.org/10.4236/aer.2014.22007>
- Sandhu, S. S., Sharma, A. K., Beniwal, V., Goel, G., Batra, P., Kumar, A., Jaglan, S., Sharma, A. K., & Malhotra, S. (2012). Myco-Biocontrol of Insect Pests: Factors Involved, Mechanism, and Regulation. *Journal of Pathogens*, 2012, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/126819>
- Selim, K. (2012). Biology of Endophytic Fungi. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 2(1), 31–82. <https://doi.org/10.5943/cream/2/1/3>
- SENASA. (n.d.). Registro nacional de terapéutica vegetal - Productos formulados. <https://aps2.senasa.gov.ar/vademecum/app/publico/formulados>
- Shalan, R. S., Gerges, E., Habib, W., & Ibrahim, L. (2021). Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* induces growth promotion effect and increases the resistance of cucumber plants against *Aphis gossypii*. *Journal of Plant Protection Research*, 61(4), 358. <https://doi.org/10.24425/jppr.2021.139244>
- Shah, P. A., & Pell, J. K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 61, Issues 5–6, pp. 413–423). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1240-8>
- Sharma, A., Sharma, S., & Yadav, P. K. (2023). Entomopathogenic fungi and their relevance in sustainable agriculture: A review. In *Cogent Food and Agriculture* (Vol. 9, Issue 1). Informa Healthcare. <https://doi.org/10.1080/23311932.2023.2180857>
- Sinha, K. K., Choudhary, A. K., & Kumari, P. (2016). Entomopathogenic Fungi. In *Ecofriendly Pest Management for Food Security* (pp. 475–505). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803265-7.00015-4>
- Stone, J. K., Polishook, J. D., & White, J. F. (2004). ENDOPHYTIC FUNGI.
- Toffa, J., Loko, Y. L. E., Kpindou, O. K. D., Zanzana, K., Adikpeto, J., Gbenontin, Y., Koudamiloro, A., & Adandonon, A. (2021). Endophytic colonization of tomato plants by *Beauveria bassiana* Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) and leaf damage in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. In *Egyptian Journal of Biological Pest Control* (Vol. 31, Issue 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00431-4>
- Urretabizkaya, N., Vasicek, A., & Saini, E. (2010). Familia Plutellidae. *Insectos Perjudiciales de Importancia Agronómica: Lepidópteros*, 1(1), 29–30.

Vega, F. E. (2018). The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. In *Mycologia* (Vol. 110, Issue 1, pp. 4–30). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1080/00275514.2017.1418578>

Venturino, A., & Álvarez, M. (2021). Informe Técnico-Científico sobre los Usos e Impactos del Insecticida Clorpirifos en Argentina.

Vitti, D., & Sosa, M. (2006). Insectos Plagas en Soja. *Voces Y Ecos*, 22, 6–10.
https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-voces_y_ecos_22_art_3.pdf

Wei, Q. Y., Li, Y. Y., Xu, C., Wu, Y. X., Zhang, Y. R., & Liu, H. (2020). Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* increases the resistance of tomatoes against *Bemisia tabaci*. *Arthropod-Plant Interactions*, 14(3), 289–300. <https://doi.org/10.1007/s11829-020-09746-9>

Yusniwati, Nurbailis, Trizelia, & Saragih, M. (2023). Potency of entomopathogen *Beauveria bassiana* fungus as biofertilizer and biostimulant to increase the plant growth of Cayenne pepper (*Capsicum frutescens* L.). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1160(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1160/1/012005>