


Relevamiento de la diversidad fúngica entomopatógena asociada a cultivos orgánicos de yerba mate en Paraguay

Survey of entomopathogenic fungal diversity associated with organic crops of yerba mate in Paraguay

Claudia E. Gonzalez¹ , Mónica L. Albrecht¹ , Gustavo A. Bich² ,
María L. Castrillo² 

¹ Universidad Nacional de Itapúa, Facultad de Ciencias y Tecnología.
Encarnación, Paraguay.

² Universidad Nacional de Misiones, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, Instituto de Biotecnología de Misiones. Misiones. Argentina.

Autor correspondiente: claudiagonzalez@cyt.uni.edu.py

Resumen: En la presente contribución, el relevamiento de la diversidad fúngica entomopatógena asociada a cultivos orgánicos de yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) permitió identificar los hongos con potencial bioinsecticida de gran importancia para el manejo de plagas en cultivos orgánicos. Para ello se analizaron muestras colectadas de 12 sitios georreferenciados de los yerbales orgánicos certificados del distrito de Bella Vista, Itapúa. Se realizó el aislamiento y caracterización de todas las cepas fúngicas encontradas en muestras de insectos vivos y muertos. Se aplicó la metodología de siembra directa en placa y se analizaron las colonias macro y microscópicamente. Como resultado, y con las condiciones ambientales favorables se pudo aislar el hongo entomopatógeno *Beauveria* como así también los géneros *Alternaria*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Mucor*, *Aspergillus* y *Fusarium* infectando los tejidos de insectos muertos. En todos los sitios de muestreo abundaron los géneros *Alternaria*, *Aspergillus* y *Fusarium* que fueron conservados en cepario para futuros ensayos de patogenicidad. La baja frecuencia en que se encontraron los hongos entomopatógenos pudo deberse a las intensas sequías que acontecieron durante los meses de diciembre/2021 a febrero/2022, afectando drásticamente la presencia de insectos plagas y la de hongos sensibles a los cambios de temperatura y humedad.



Palabras clave: diversidad, hongos entomopatógenos, yerbales orgánicos.

Abstract: In the present contribution, the survey of entomopathogenic fungal diversity associated with organic yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) crops allowed the identification of fungi with bioinsecticidal potential of great importance for pest management in organic crops. For this purpose, samples collected from 12 georeferenced sites of certified organic yerba mate plantations in the district of Bella Vista, Itapúa, were analyzed. Isolation and characterization of all fungal strains found in samples of live and dead insects was performed. The direct seeding plate methodology was applied and the colonies were analyzed macro and microscopically. As a result, and with favorable environmental conditions, it was possible to isolate the entomopathogenic fungus *Beauveria* as well as the genera *Alternaria*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Mucor*, *Aspergillus* and *Fusarium* infecting dead insect tissues. In all sampling sites, *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium* genera were abundant and were preserved in straparia for future pathogenicity tests. The low frequency in which entomopathogenic fungi were found could be due to the intense droughts that occurred during the months of December/2021 to February/2022, drastically affecting the presence of insect pests and fungi sensitive to changes in temperature and humidity.

Key words: diversity, entomopathogenic fungi, organic yerba mate.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) tiene gran importancia comercial y cultural, ya que sus hojas se consumen como una bebida tradicional llamada mate (infusión caliente) o también en forma fría denominada tereré⁽¹⁾. En este sentido, Paraguay es considerado uno de los principales productores e industrializadores de esta planta, siendo a su vez uno de los mayores consumidores mundiales⁽²⁾.

Entre las plagas más frecuentes de los yerbales se pueden citar, el tigre o taladro de la yerba mate (*Hedypathes betulinus*) y el rulo o psílido de la yerba mate (*Gyropsylla spegazziniana*) que ocasionan grandes pérdidas económicas^(3,4).

Los factores climáticos que afectan los yerbales también impactan negativamente sobre el crecimiento de los hongos. El rango favorable de temperatura para los diferentes 21 grupos de entomopatógenos varía entre

20 y 30 °C, aunque, existe una temperatura ideal para cada patógeno y para cada fase del ciclo de la relación con su hospedante. Incluso la exposición a la luz ultravioleta puede ser letal para los conidios de los patógenos⁽⁵⁾.

Los tres géneros de hongos entomopatógenos más utilizados en yerbales de Argentina, Brasil y Paraguay son *Beauveria*, *Paecilomyces* y *Metarhizium*, ya que tienen una alta especificidad y han demostrado su efecto como bioinsecticidas atacando insectos que son plagas potenciales de los yerbales⁽²⁾.

Evaluar la potencialidad de la aplicación de hongos entomopatógenos mediante el aislamiento y ensayos in vitro y a campo de su capacidad de biocontrol o bioinsecticida es una estrategia que puede ser aplicada por la agricultura sostenible, tan buscada para mantener la biodiversidad y mantener el equilibrio ecológico⁽⁶⁾.

Algunas empresas yerbateras que producen yerba orgánica están utilizando esporas comerciales de hongos entomopatógenos como bioinsecticidas, pero éstos al no estar adaptados a las condiciones edafoclimáticas de la región, hacen menos efectivo el proceso de infección y control por los hongos biocontroladores, generando menos protección a los cultivos⁽⁵⁾. Ante esta situación se propuso la presente investigación que tiene como objetivo principal identificar la diversidad fúngica entomopatógena asociada a cultivos orgánicos de yerba mate en regiones del Paraguay.

2. MATERIALES Y MÉTODO

Las tomas de muestras de los insectos vivos y muertos se realizaron en 12 puntos georreferenciados de los yerbales orgánicos certificados (Figura 1) pertenecientes a una empresa yerbatera localizada en la ciudad de Bella Vista, departamento de Itapúa, Paraguay. Para la preparación de las muestras se utilizó la metodología propuesta por Jerke et al.⁽⁷⁾. Se evaluaron las áreas del yerbal con mayor ataque por plagas. Para la georreferenciación se utilizó la aplicación GPS Fields Área Measure PRO, con sistema operativo Android. En el mes de octubre/2021 se tomaron muestras de 3 sitios (P1, P2 y P3), en noviembre-diciembre/2021 en 4 sitios (P4, P5, P6 y P7) y en enero-febrero/2022 se tomaron en 5 sitios (P8, P9, P10, P11 y P12).

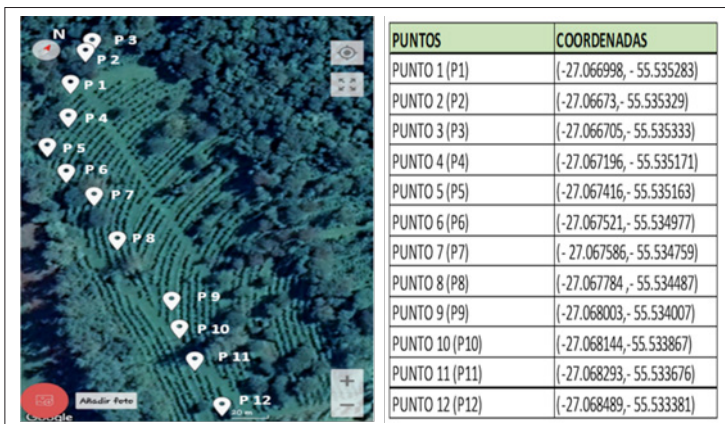


Figura 1. Georreferenciación de los puntos de muestreos en los yerbales orgánicos localizados en la ciudad de Bella Vista, departamento de Itapúa, Paraguay.

Las muestras se transportaron al laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad Nacional de Itapúa, (UNI). Los insectos muertos fueron colocados en cámaras húmedas para evaluar si fueron afectados por hongos y favorecer su desarrollo y aislamiento. El aislamiento de los hongos se realizó por punción directa apoyando un asa aguja sobre el cuerpo del insecto, y realizando la siembra en 3 o 4 puntos en placas de Petri con medio agar papa dextrosa (Britania SA, PDA 3.9 % p/v), adicionadas con el antibiótico cloranfenicol (0,5 mg/L). Todo este procedimiento se realizó bajo flujo laminar. Las placas fueron rotuladas e incubadas a 25 °C durante 5 a 7 días^(8,9).

Las colonias fúngicas desarrolladas, se observaron macroscópica y microscópicamente. Para las observaciones microscópicas se utilizó un microscopio óptico Zeiss Primo Stard Trinocular con cámara digital incorporada para capturar las imágenes obtenidas con los aumentos de 400X y 1000X. Para la identificación microscópica de las especies de hongos se utilizó la guía taxonómica del Dr. Ricardo Humber⁽⁹⁾. La identificación de las colonias fúngicas se realizó tanto en el laboratorio de la Facultad de Ciencias y Tecnología de la UNI, como en el laboratorio del Instituto de Biotecnología Misiones, InBioMis-Universidad Nacional de Misiones, Argentina.

Para la preservación de las colonias fúngicas de interés se confeccionó un cepario microbiológico, se cargó 0,6 mL de PDA a tubos eppendorf de polipropileno flexible de 2 mL de capacidad con tapa a presión. Se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 121 °C y una atmósfera superior a la normal, y

se dejaron enfriar en posición vertical hasta solidificar. Se procedió a extraer con sacabocados pequeños discos cubiertos de micelio joven de cada colonia fúngica y se colocaron asépticamente en el interior de cada eppendorf. Luego, se sellaron y se incubaron a 25 °C hasta observar desarrollo para luego refrigerarlos^(5,10).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de los diferentes puntos donde se recolectaron las muestras, se pudo observar que la principal plaga que afecta o ataca estos yerbales orgánicos es el rulo o psílido de la yerba mate, seguida por el taladro y el ácaro del bronceado, los cuales han sido relevantes en los últimos años como plagas de los yerbales de la zona. En noviembre y diciembre/2021 se observaron los mayores daños por ataques de plagas especialmente por el rulo de la yerba mate⁽¹¹⁾.

De todos estos muestreos se lograron obtener 48 unidades muestrales compuestas por insectos vivos y muertos. A partir de los muestreos realizados durante los meses octubre/2021 (P1, P2 y P3) y noviembre-diciembre/2021 (P4, P5, P6 y P7), se lograron aislar e identificar diversas colonias fúngicas desarrolladas sobre insectos plagas muertos en hojas de yerba. Estas colonias pertenecieron principalmente a los géneros *Alternaria*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* (Figura 2). Asimismo, se logró aislar e identificar una cepa del hongo entomopatógeno perteneciente al género *Beauveria* como se muestra en la Figura 3⁽¹²⁾.

En yerbales de Misiones, Argentina se realizaron estudios de prospección en insectos jóvenes y adultos de *G. spegazziniana* y *H. betulinus* y no se encontraron infecciones fúngicas in situ como tampoco en condiciones de laboratorio, no obstante, lograron aislar *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Purpureocillium lilacinum* a partir del suelo de los yerbales. En ensayos de patogenicidad el hongo *Beauveria bassiana* mostró baja mortandad frente al psílido *G. spegazziniana* y *M. anisopliae* casi nula, aunque ambas cepas fueron efectivas sobre el coleóptero *H. betulinus*⁽⁶⁾.

Pucheta et al. han reportado que los insectos del orden Coleóptera presentaron mayor susceptibilidad al ataque del hongo *B. bassiana* que los insectos del orden Hemíptera al que pertenece *Gyropsylla spegazziniana*⁽¹³⁾.

Posiblemente esta condición, sumada a las condiciones extremas de sequías y temperaturas presentadas en el año 2021 en los diferentes sitios de muestreos (1 al 12) hayan determinado la baja frecuencia de *B. bassiana* en los yerbales

atacados por el psílido o rulo de la yerba mate.

Las observaciones macroscópicas de la cepa fúngica permitieron identificar una colonia de crecimiento rápido de aspecto algodonosa, elevada y de color blanco al anverso y color amarillo al reverso, al cabo de 10 días de incubación. Las características microscópicas permitieron observar micelio septado y células conidiógenas con forma de “matraz” o base ensanchada y de disposición agrupadas en cúmulos. Se pudo observar que en el extremo terminal de las células conidiógenas emergieron múltiples conidias en cadena en un raquis con una disposición en zig-zag. Las conidias fueron hialinas y lisas, de estructura globosa a subglobosa. Todas estas características macro y microscópicas permitieron inferir su pertenencia a la especie *Beauveria bassiana*. Sin embargo, es necesario realizar la identificación molecular de esta cepa fúngica para corroborar su identificación.

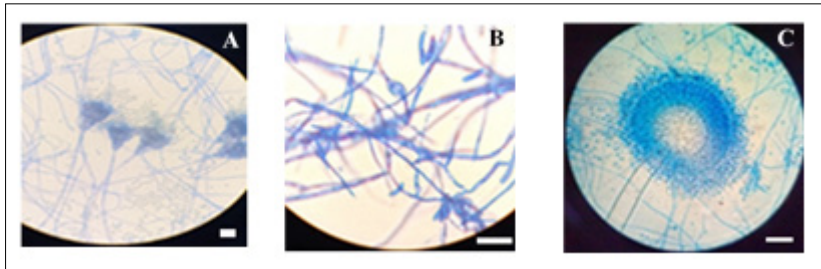


Figura 2. Microfotografías del proceso de identificación de cepas fúngicas asociadas a yerbales orgánicos **a.** Fotografía microscópica de estructuras reproductivas de *Penicillium*. Aumento 40X. **b.** Fotografía microscópica de estructuras reproductivas de *Fusarium*. Aumento 100X. **c.** Fotografía microscópica de estructuras reproductivas de *Aspergillus*. Aumento 100X. Barras = 1,2 μ m. Fuente propia.

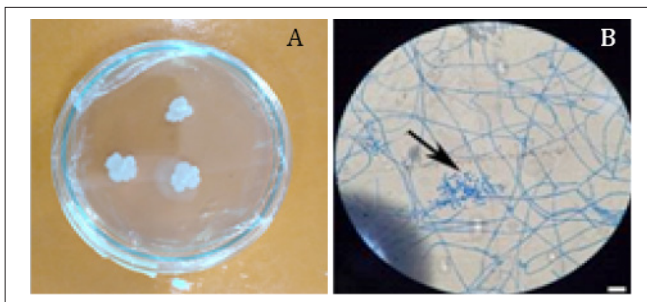


Figura 3. A. Fotografía de tres colonias fúngicas del género *Beauveria* aislado a partir del cadáver de una hembra adulta de *Gyropsylla spegazziniana* **B.** Fotografía microscópica del cultivo fúngico de *Beauveria*. Disposición en zigzag del raquis

(flecha). Aumento 40X. Barra = 1,2 μ m. Fuente propia.

Sin embargo, durante los muestreos realizados en enero-febrero/2022 (P8, P9, P10, P11 y P12) se evidenció baja diversidad fúngica asociada a los insectos vivos y muertos de plantaciones de yerba mate. Sólo se lograron aislar e identificar colonias fúngicas pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*. Cabe destacar que en los meses de diciembre/2021 a febrero/2022 se evidenció una de las sequías más importantes por las que ha atravesado el país, lo que ha ocasionado grandes pérdidas en los yerbales que se vieron afectados en su producción de biomasa. Debido al muestreo realizado en el presente trabajo, se puede argumentar que estas condiciones climáticas extremas también se han reflejado en una disminución de la población de insectos plagas, por lo cual la recolección en los últimos meses de muestreo ha resultado muy escasa.

Como lo referenciaron García et al. respecto al comportamiento de los hongos entomopatogénicos *B. bassiana* y *M. anisopliae* aislados de insectos muertos encontrados en el mantillo de suelos agrícolas, el género *B. bassiana* ha tenido muy baja presencia en épocas de escasas lluvias y sequías intensas aumentando su presencia durante los meses lluviosos con mayor humedad y temperaturas de 20-30 °C, condiciones propicias para la dispersión de sus esporas y germinación. No obstante, el género *M. anisopliae* se encontró invadiendo tejidos de insectos muertos cuando las temperaturas llegaron a 40 °C. Estos datos evidencian la importancia que tienen las condiciones climáticas en el desarrollo de algunos patógenos y que deben ser tenidas en cuenta para futuros estudios de patogenicidad⁽¹⁴⁾.

La prospección de hongos entomopatógenos sobre hormigas cortadoras en condiciones de campo evidenció una baja tasa de recuperación de estos hongos lo que podría estar relacionado al tipo de manejo del cultivo, condiciones ambientales, disponibilidad de hospedadores susceptibles, virulencia del patógeno, características del cultivo hospedante, entre otros^(15,16). También, ha sido reportado que factores climáticos como la temperatura, lluvia y humedad están correlacionados con la infección de insectos por hongos entomopatógenos⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Quintela, ha reportado el efecto de las altas temperaturas sobre la persistencia en el tiempo de las conidias de *B. bassiana*, en condiciones de campo⁽²⁰⁾. Así también Silva-Guerra et al. Citado por Bich reportaron el efecto de la temperatura sobre la persistencia de las conidias en el suelo siendo *Metarhizium anisopliae* más resistente que *M. acridum*⁽²¹⁾.

A su vez, en estudios realizados por Klingen et al. cita por González-Baca et al. se reportó una mayor cantidad de hongos entomopatógenos en suelos de producción agrícola orgánica, sobre los convencionales apoyando aún más

la relación entre presencia del hongo en función al manejo de los cultivos. Así mismo en cultivos de soja de Brasil con labranza mínima se favoreció la prevalencia de algunas especies de hongos entomopatógenos como *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *Paecilomyces* en el suelo, respecto a suelos con labranza convencional o intensiva⁽²²⁾.

Cepas pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* fueron aisladas e identificadas en la mayoría de las muestras procesadas en el laboratorio. Una cepa de *Fusarium* fue incluso recuperada e identificada a partir de un insecto muerto de *Gyropsylla* colectado del yerbal muestreado como se observa en la Figura 4⁽¹⁷⁾.

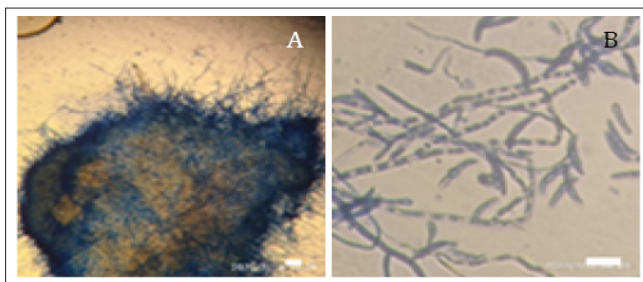


Figura 4. **A.** Cadáver de una ninfa de *Gyropsylla spegazziniana* donde se observan hifas de *Fusarium* emergiendo del cuerpo (4X) Barra = 35 μ m. **B.** Micrografía de *Fusarium* donde se observan las estructuras de reproducción (100X) Barra = 1,2 μ m. Fuente propia.

La gran cantidad de hongos *Aspergillus*, *Fusarium* y *Alternaria* encontrados en los tejidos de insectos muertos, incluso a pesar de las condiciones extremas de sequía, ameritaría un estudio posterior de su entomopatogenicidad en condiciones controladas de laboratorio con la finalidad de profundizar el conocimiento del posible uso de este hongo nativo como biocontrolador de plagas

A partir de las cepas fúngicas de interés aisladas e identificadas a nivel de género recuperadas de las muestras de insectos asociados a los yerbales orgánicos, se constituyó un cepario para su conservación. Las cepas fúngicas fueron conservadas en tubos plásticos y en pequeños frascos de vidrio, todos debidamente rotulados y resguardados en condiciones controladas de temperatura y humedad hasta el momento de su uso (Figura 5). Considerando la importancia y necesidad del resguardo de material biológico, en pasos posteriores de la investigación se procederá a realizar la identificación a nivel de especie de cada cepa fúngica ingresada a cepario.

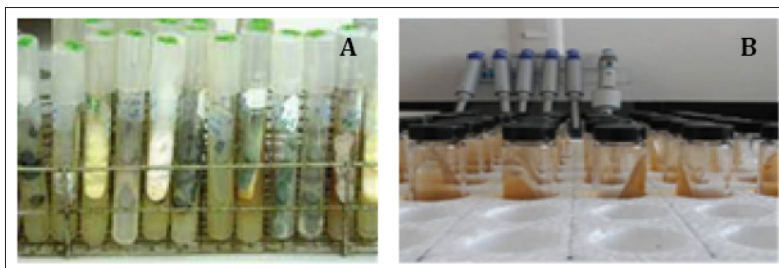


Figura 5. Cepario en formación de hongos asociados a los yerbales. A. Fotografía de hongos conservados en tubos plásticos. **B.** Fotografía de hongos conservados en frascos de vidrio. Fuente propia.

La importancia de confeccionar un cepario además de respaldar y evidenciar el trabajo de investigación desarrollado radica en la preservación del germoplasma y la genética de los hongos encontrados en los yerbales a los efectos de futuras investigaciones^(10,21,24).

La cepa de *Beauveria bassiana* aislada fue resguardada en el cepario a los efectos de realizar futuras pruebas moleculares y las cepas de géneros *Alternaria*, *Aspergillus* y *Fusarium* conservados en cepario para futuros ensayos de patogenicidad.

Como lo mencionan Rodríguez et al. es imprescindible someter a los hongos a ensayos previos a los efectos de garantizar la efectividad y especificidad frente a los insectos plagas, además se deben considerar las condiciones climáticas que toleran estas cepas a modo de no afectar su desarrollo y capacidad infectiva⁽²⁵⁾.

Con el desarrollo de este trabajo se sentaron las bases para el conocimiento relacionado al acervo de hongos presentes en yerbales orgánicos del Sur de Paraguay. Asimismo, se establecieron nexos entre la Universidad Nacional de Itapúa y el sector Productivo Primario Yerbatero Paraguayo con la finalidad de potenciar una cooperación mutua en temas de investigación relacionada al uso de microorganismos nativos para el control de plagas en los cultivos.

4. CONCLUSIÓN

A partir del relevamiento de la diversidad fúngica entomopatógena asociada a cultivos orgánicos de yerba mate, se encontró una cepa del hongo entomopatógeno del género *Beauveria* y se aislaron e identificaron hongos de los géneros *Alternaria*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*

y *Fusarium* infectando los tejidos de adultos muertos de *Gyropsylla spgazziniana*.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

CG: Muestreo, procesamiento de las muestras, observaciones macro y microscópicas, elaboración del cepario y redacción del texto; MA: Procesamiento de muestras, aislamiento de colonias; LC: Identificación de los géneros de hongos, elaboración de cepario, redacción del texto; GB: Aislamiento e identificación de géneros de hongos, corrección del texto.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

FUENTE DE FINANCIACIÓN

La investigación fue financiada por la Dirección de Investigación y Ambiente perteneciente al Rectorado de la Universidad Nacional de Itapúa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zelada N de J, González JD. Guia Técnica Cultivo de Yerba Mate [Internet]. Zelada N. de J, editor. 2019. 53 p. Disponible en: https://www.jica.go.jp/paraguay/espanol/office/others/c8h0vm0000ad5gke-att/gt_07.pdf
2. Gonzales Castillo M, Noé Aguilar C, Rodríguez Herrera R. Control de insectos plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: retos y perspectivas. Rev. Científica la Univ. Autónoma Coahuila [Internet]. 2012;4(8):42-55. Disponible en: <https://bit.ly/3CZrDjO>
3. Burtnik OJ. Yerba mate. Manual de producción. 3a ed. Santo Tomé, Corrientes, Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); 2006. p. 52.
4. Iede ET, Silveira Soares CM, Grigolletti Júnior A, Auer CG. Manual de identificação de pragas e doenças da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil. [Internet]. Colombo, Brasil; 2000. p. 23. Disponible en: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/160800/1/Doc-44.pdf>
5. Berlanga Padilla AM, Hernández Velázquez VM. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la virulencia de *Metarhizium anisopliae*, M. a.

- var. *acridum* y *Beauveria bassiana* en *Schistocerca piceifrons piceifrons*. Manejo Integr. Plagas (Costa Rica) [Internet]. 2002;1(63):51-5. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/325904471_Efecto_de_la_temperatura_sobre_el_crecimiento_y_la_virulencia_de_Metarhizium_anisopliae_M_a_var_acridum_y_Beauveria_bassiana_en_Schistocerca_piceifrons_piceifrons
6. Schapovaloff ME, Angeli Alves LF, Urrutia MI, López Lastra CC. Ocurrencia natural de hongos entomopatógenos en suelos cultivados con yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) en Misiones, Argentina. Rev. Argent. Microbiol. abril de 2015;47(2):138-42.
 7. Jerke G, Horiński MA., Castrillo ML, Chade ME. Guía de prácticas de laboratorio 1° Cuatrimestre. 2da. ed. Posadas: Cátedra de Microbiología e Inmunología; 2019.
 8. González E, Martínez C, Castrillo M, Fonseca M, Villalba L. Optimización del protocolo para el aislamiento de hongos de pudrición blanca. Misiones, Argentina: Universidad Nacional de Misiones. 2013;
 9. Humber R. Fungi: Preservation of cultures. En: Lacey LA, editor. Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. 2th ed. Yakima, Washington; 1997. p. 317-28.
 10. Oliveira I, Pereira JA, Bento A, Baptista P. Viability of *Beauveria bassiana* isolates after storage under several preservation methods. Ann. Microbiol. 2011;61.
 11. ADN Digital. Productores de yerba mate sufren millonarias pérdidas por la sequía [Internet]. 2022. Disponible en: https://www.adndigital.com.py/productores-de-yerba-mate-sufren-millonarias-perdidas-por-la-sequia/?fbclid=IwAR3ifHLbKi3gXGaK9Iham-gb8_jTZYSdgVFjwYs1LLXrqZadxC8RVwzcWTs
 12. Alves L, Formentini M, Fanti A, Schapovaloff M, Barzotto I. Suscetibilidade de *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles) (Hemiptera: Psyllidae) a *Beauveria bassiana* (Bals.). Arq. Inst. Biol. (Sao Paulo). 2013;80(3):363-6.
 13. Pucheta Díaz M, Flores Macías A, Rodríguez Navarro S, De la Torre M. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. INCI. 2006;31(12):856-60.

14. García García MA, Cappello García S, Leshner Gordillo JM, Molina Martínez RF. Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *metarhizium anisopliae*. Horiz. Sanit. 2011;10(2):21-8.
15. Vänninen I. Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. Mycol. Res. 1996 Jan;100(1):93-101.
16. Borges L. Eficiência de *Beauveria bassiana* (bals.) vuill. (deuteromycota) para o controle de *Hedypathes betulinus* (klug) (Coleoptera: cerambycidae) em erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae). Paraná: Universidad Federal de Paraná; 2007.
17. Yaginuma K. Seasonal Occurrence of Entomopathogenic Fungi in Apple Orchard Not Sprayed with Insecticides. Japanese J. Appl. Entomol. Zool. 2007;51(3):213-20.
18. Jaronski ST. Role of fungal ecology in the inundative use of entomopathogenic fungi. Bio. Control. 2010;55:159-85.
19. Clifton EH, Jaronski ST, Hodgson EW, Gassmann AJ. Abundance of Soil-Borne Entomopathogenic Fungi in Organic and Conventional Fields in the Midwestern USA with an Emphasis on the Effect of Herbicides and Fungicides on Fungal Persistence. PLoS One. 2015 Jul 20;10(7):e0133613.
20. Quintela ED. Estabilidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hyphomycetes) no solo e sua patogenicidade ao *Chalcodermus aeneus* Boheman (Col: Curculionidae), praga do caupi. ESALQ/USP; 1986
21. Bich G. Selección de cepas nativas de hongos entomopatógenos *Beauveria* y *Metarhizium* para control biológico de hormigas cortadoras en plantaciones forestales de interés en la provincia de Misiones. Universidad Nacional de Misiones. 2017.
22. González Baca G, Venegas Barrera CS, González Gaona OJ, Vargas Madriz H, Jiménez Gómez MA, Pérez Arriaga E, et al. Abundancia y distribución de hongos entomopatógenos en diferentes localidades y ambientes del sur de Tamaulipas. Rev. Mex. Ciencias Agrícolas. 2019;10(3):669-81.
23. Castrillo M. Caracterización morfológica y confirmación molecular de *Aspergillus* sección «Nigri» aislados de yerba mate (*Ilex paraguayensis*).

Posadas, Misiones, Argentina. 2010.

24. Jenkins NE, Grzywacz D. Quality Control of Fungal and Viral Biocontrol Agents - Assurance of Product Performance. *Biocontrol Sci, Technol.* 2000;10.
25. Rodríguez M, Gerding M, France A. Aislamientos de Hongos Entomopatógenos Sobre Larvas de Polilla del Tomate *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae). *Agric. Técnica.* 2006;66(2):159-65.