

EVALUACIÓN DE LA VIRULENCIA DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS DEL PULGÓN DEL CIPRÉS, DE DOS REGIONES ECOLÓGICAS DE CHILE. II.

(Evaluation of the virulence of entomopathogenic fungi of cypress aphid, from two ecological regions of Chile. II)

Cristian Montalva R^{1*}, Mónica Gutiérrez A², Eladio Rojas P²,
Dolly Lanfranco L³, Eduardo Valenzuela F⁴.

*Autor de correspondencia: ¹Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales, Escuela de Graduados. Casilla 567. Valdivia. Chile (cristian.montalva@alumnos.uach.cl).

²Laboratorio Regional SAG. Ruta a Puerto Octay U-55-V, Calle de Servicio, Osorno. Chile.

³Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales, Casilla 567. Valdivia. Chile.

⁴Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias, Instituto de Bioquímica y Microbiología. Casilla 167, Valdivia. Chile.

Palabras claves: *Cinara cupressi*, Control biológico, Hongos entomopatógenos, Hypocreales.

Key words: *Cinara cupressi*, Biological control, entomopathogenic fungi, Hypocreales.

RESUMEN

El pulgón del ciprés *Cinara cupressi*, se considera uno de los insectos invasores más dañinos del mundo, ha provocado una gran mortalidad en especies Cupresáceas nativas y exóticas en varios países. En Chile, fue detectado el año 2003 y para el año 2008 esta plaga ya se encontraba distribuida en todo el país, afectando especies cupresáceas forestales exóticas como *Cupressus macrocarpa* y especies nativas, tales como, *Austrocedrus chilensis* (Ciprés de la Cordillera) y *Fitzroya cupressoides* (Alerce), que están categorizadas en el estado de conservación vulnerable y en peligro respectivamente. El área forestal de Chile ha potenciado y privilegiado el uso de controladores biológicos como parte del manejo integrado de plagas. Es por esto que se ha utilizado el parasitoide *Pauesia juniperorum*. Sin embargo, se han detectado bajos niveles de parasitismo. Se propone el uso de hongos entomopatógenos como alternativa y complemento al control biológico. Se prospectaron hongos entomopatógenos en la Región ecológica mediterránea per-húmeda y en la Región oceánica con influencia mediterránea. Como resultado se han identificado seis géneros de hongos descritos como patógenos de insectos. Sin embargo, bajo condiciones de laboratorio sólo cepas

del género *Verticillium* fueron virulentas, causando sobre el 80% de mortalidad acumulada a los 7 días. No hubo diferencias significativas entre las cepas de *Verticillium* y un producto químico (pirimicarb) aplicado como control, aunque el hongo fue más lento. Las cepas más virulentas fueron identificadas como *Verticillium lecanii*, Ve 1 y Ve 2, con un TL_{50} de: 3.2 y 3.1 días y un DL_{50} : 1.2^4 y 1.3^7 conidias mL^{-1} respectivamente, sugiriendo el uso de estos hongos para controlar *C. cupressi* en Chile.

SUMMARY

The cypress aphid, *Cinara cupressi*, is considered one of the most important invasive species causing high mortality in exotic and native species of Cupressaceae in several countries in the world. In Chile it was detected in 2003 and in 2008 was distributed throughout the country affecting the exotic forest species *Cupressus macrocarpa* and the native forest species *Austrocedrus chilensis* (Ciprés de la Cordillera) and *Fitzroya cupressoides* (Alerce), both classified as vulnerable and endangered species respectively. Efforts to their management have focused on biological control by using the parasitoid *Pauesia juniperorum* but until now it has not reached satisfactory

control. We propose using entomopathogenic fungi, as alternative and complementary biocontrol. Entomopathogenic fungi were prospected in the ecological region Mediterranean per-humid and in the ecological region Oceanic with mediterranean influence in both colonies of *C. cupressi*. There were identified six genera of fungi described as insect pathogens. However, in laboratory assays only *Verticillium* strains were virulent, causing about 80% cumulative mortality at seven days. There were not significant differences among strains of *Verticillium* and chemical (pirimicarb) applied as control, although fungi were slower. The most virulent strains were two *Verticillium lecanii*, Ve 1 and Ve 2, with an LT_{50} of: 3.2 and 3.1 days and LD_{50} : 1.2^4 and 1.3^7 conidia mL^{-1} respectively, suggesting the use of these fungi to control *C. cupressi* in Chile.

INTRODUCCIÓN

Existen pocos antecedentes de hongos entomopatógenos en Chile asociados a *C. cupressi* y sólo han recibido alguna atención en los últimos años. Este estudio es una continuación del trabajo prospección de hongos entomopatógenos del pulgón del ciprés en dos regiones ecológicas de Chile publicado por Montalva *et al.* (2010). En esta segunda parte se muestran los resultados de las evaluaciones de virulencia bajo condiciones de laboratorio de las cepas determinadas. Los resultados de esta investigación permitirán postular posibles nuevos agentes de control para esta plaga, de esta manera reducir las poblaciones y mitigar los daños producidos por esta plaga invasora que se ha asociado tanto a especies del bosque nativo como especies introducidas en todo Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

Crianza artificial de *Cinara cupressi*

Los individuos de *C. cupressi* utilizados en los diferentes ensayos fueron obtenidos mediante crianza artificial, en la Unidad de Entomología del Laboratorio Regional SAG Osorno, a partir de pulgones extraídos y multiplicados desde muestras de ramas de ciprés de Monterrey (*Cupressus macrocarpa* Hartw. ex Gord.) provenientes de Cerro Guido (Comuna de Torres del Paine). La crianza de estos pulgones, se realizó sobre plantas de ciprés de Monterrey de aproximadamente 30 cm de altura. Las plantas con los pulgones fueron mantenidas en una cámara bioclimática, regulada a una temperatura de $18\pm 2^\circ C$ y un fotoperiodo de 16:8 horas de luz/oscuridad, tal como lo utilizado por Yeo *et al.* (2003) y Saranya *et al.* (2010).

Determinación del Tiempo Letal 50

Las cepas evaluadas correspondieron a aquellas determinadas en la publicación previa (Montalva *et al.*, 2010) más dos cepas de *Beauveria* y dos cepas de *Metarhizium* mantenidas en el Laboratorio Fitopatología SAG Osorno. Para la evaluación de virulencia se colocó al interior de una placa Petri de 9 cm de diámetro con agar agua (2%) un segmento de rama de *C. macrocarpa* de 8 cm de longitud (Vu *et al.* 2007), esta rama fue previamente desinfectada Montalva (2008). En cada rama se colocaron, con un pincel fino, 10 ninfas de cuarto estadio de *C. cupressi*, las cuales fueron posteriormente asperjadas con 1 mL de una suspensión que contenía conidias de cada cepa más agua destilada estéril y detergente Tween 80® (0,1%), utilizando un asperjador previamente calibrado. Se utilizaron 10 placas por cada cepa de hongo; 10 placas para el testigo, las cuales fueron asperjadas sólo con agua destilada estéril+Tween 80® (0,1%) y 10 placas que fueron asperjadas con el insecticida (Pirimicarb) específico para el control de pulgones.

Las placas fueron incubadas en forma aleatoria en una cámara bioclimática a $20\pm 2^\circ C$ y un fotoperiodo de 16:8 horas de luz/oscuridad, durante un período de 7 días. Diariamente se contabilizó en cada placa Petri el número de pulgones muertos; para ello con un pincel fino se tocó el cuerpo del insecto para verificar su movimiento. Se consideró a los pulgones como muertos a aquellos individuos que presentaban el cuerpo de color más oscuro y/o ausencia de movimientos. Estos insectos muertos fueron separados y mantenidos al interior de una cámara húmeda para verificar posteriormente el desarrollo del hongo como agente causal de la mortalidad observada. Los datos de mortalidad fueron corregidos, usando la fórmula de Abbott (1925), una vez corregida la mortalidad para cada cepa, se determinó el tiempo letal 50 (TL_{50}) mediante análisis Probit (Finney 1971).

Determinación de la Dosis Letal 50

Para la determinación de la dosis letal 50 (DL_{50}) se evaluaron 4 dosis diferentes de conidias: 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 conidias mL^{-1} , utilizando la misma metodología descrita anteriormente para la determinación del TL_{50} . Se utilizaron 10 placas Petri de 9 cm de diámetro con agar agua (2%) con un segmento de rama de 8 cm de *C. macrocarpa* por cada dosis de conidias más 10 placas Petri que fueron utilizadas como testigo, que fueron asperjadas con agua destilada estéril+Tween 80® (0,1%). Las placas fueron incubadas en forma aleatoria en una cámara bioclimática a

20±2°C y un fotoperíodo de 16:8 horas de luz/oscuridad. Se determinó diariamente el número de áfidos muertos, de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente y se calculó la mortalidad corregida (MC) para cada dosis de conidias hasta el día en que la primera cepa superó el 95% de la mortalidad corregida acumulada, aquel día fue escogido para determinar la DL_{50} .

La evaluación de la virulencia de las diferentes cepas de hongos entomopatógenos en condiciones de laboratorio, fue llevada a cabo siguiendo un ensayo completamente al azar con diez replicas. La unidad experimental correspondió a la placa Petri con un segmento de rama con diez ninfas de cuarto estadio de *C. cupressi* y los resultados fueron sometidos a una ANOVA de una vía, las medias fueron separadas por Tukey (p: 0,05). Los análisis fueron llevados a cabo mediante el software SPSS 15.0. El tiempo letal 50 (TL_{50}) y la dosis letal 50 (DL_{50}) fueron analizados usando análisis Probit mediante el software estadístico Statplus 4.9.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las diferentes cepas determinadas fueron comparadas al día 7 después de la inoculación, exceptuando la cepa de *Neozygites sp.* (Tabla 1) donde la multiplicación in vitro no fue posible, a pesar de utilizar los diferentes medios de cultivos líquidos descritos en Butt y Humber (1989). Cabe señalar que *Neozygites sp.*, pertenece al orden Entomophthorales que contiene varias especies de hongos

que se consideran entre los mayores patógenos de pulgones en la naturaleza (Barta & Cagán 2006). También estos hongos son parásitos obligados, lo que dificulta su cultivo. Sin embargo, son altamente específicos y efectivos por lo que deberá insistirse en nuevos trabajos que permitan determinar a nivel de especie y avanzar en las técnicas de multiplicación.

Determinación del Tiempo Letal 50

Los resultados del porcentaje de mortalidad corregida de las cepas evaluadas, indican que la mortalidad aumentó a medida que aumentaba también el período de exposición. Las cepas Ve 1, Ve 2, Ve 3, Ve 4 y el producto químico pirimicarb provocaron sobre el 80% de mortalidad en las ninfas de *C. cupressi* después de ser tratadas con la dosis de 10^7 conidias mL^{-1} (Tabla 1).

Esto apoya lo propuesto por Milner (1997), quien indica que el género *Verticillium*, es un hongo entomopatógeno específico de pulgones. Por otra parte, las cepas de *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces* provocaron entre un 46% y un 80% de mortalidad, lo que sugiere que estos tres géneros pudieran ser controladores más adecuados para otros taxa de insectos. La baja mortalidad (menor a 42% de mortalidad) provocada por las cepas de *Fusarium* encontradas sobre pulgones, indica que este hongo no fue el agente causal de la muerte de los pulgones y posiblemente se hayan desarrollado como agentes secundarios. La curva de mortalidad a través del tiempo originada a la dosis 10^7 conidias mL^{-1} fue altamente

Cepa	Procedencia	Región Ecológica	% Mortalidad acumulada*	LT_{50}
<i>Beauveria 1</i>	Curacautín	MPH***	51,4% ± 1,8% def	6,6
<i>Beauveria 2</i>	Llifen	OIM****	46,7% ± 2,8% efg	7,1
<i>Fusarium 1</i>	Angol	MPH	30,8% ± 4,9% g	10,6
<i>Fusarium 2</i>	Melhuín	OIM	41,2% ± 4,2% fg	7,8
<i>Metarhizium 1</i>	Angol	MPH	57,3% ± 2,3% cde	6
<i>Metarhizium 2</i>	Futrono	OIM	54,2% ± 2,2% cdef	6,4
<i>Paecilomyces 1</i>	Angol	MPH	55,4% ± 3,2% cdef	6,1
<i>Paecilomyces 2</i>	Collipulli	MPH	69,6% ± 5,1% bc	5,6
<i>Paecilomyces 3</i>	Curacautín	MPH	50,8% ± 3,7% def	6,5
<i>Paecilomyces 4</i>	Melhuín	OIM	63,6% ± 5,4% cd	5,9
<i>Paecilomyces 5</i>	Collipulli	MPH	57,4% ± 2,6% cde	6,2
pirimicarb**	-----	-----	98,5% ± 0,1% a	0,7
<i>Verticillium 1</i>	Futaleufú	OIM	86,2% ± 1,5% a	3,2
<i>Verticillium 2</i>	Cochamó	OIM	85,1% ± 1,0% ab	3,1
<i>Verticillium 3</i>	Curacautín	MPH	84,2% ± 2,0% ab	4,2
<i>Verticillium 4</i>	Paillaco	OIM	83,6% ± 1,4% ab	3,8

Tabla 1. Mortalidad corregida acumulada y tiempo letal medio (TL_{50}) de ninfas de *Cinara cupressi*, provocado por hongos entomopatógenos provenientes de ambas regiones ecológicas.

*Medias (± ES) letras distintas indican diferencias estadísticas entre los porcentajes de mortalidad acumulada de las cepas evaluadas de acuerdo al test de Tukey (P dH 0,05). ** Insecticida. ***Región Ecológica Mediterránea Per-Húmeda. ****Región Ecológica Oceánica con Influencia Mediterránea.

diferente entre las cepas evaluadas ($p: 0,000$), pero no se encontraron diferencias significativas entre pirimicarb y las cepas del género *Verticillium* (Tabla 1).

Kim *et al.* (2001) realizaron un ensayo con *V. lecanii*, *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. y *Paecilomyces sp.*, al igual que en este estudio, aunque en una especie diferente de pulgón, como resultado la especie *V. lecanii* fue el hongo más virulento contra el pulgón *Aphis gossypii* Glover, causando el 100% de mortalidad con un TL_{50} de 2,7 días, valor muy similar al obtenido con la cepa Ve 2 (TL_{50} : 3,1 días) en *C. cupressi*. Otro trabajo que realizaron, Vu *et al.* (2007) obtuvieron como resultado de la aplicación del hongo *V. lecanii* a una concentración de 10^7 conidia mL^{-1} sobre poblaciones de *Myzus persicae* Sulzer un TL_{50} de 2,1 días, mientras que la aplicación de este hongo en poblaciones de *A. gossypii* tuvieron un TL_{50} de 1,5 días a una temperatura de $25^{\circ}C$. Los TL_{50} que resultaron para *C. cupressi* tratados con las cepas de *Verticillium* también son muy similares a los obtenidos con cepas del mismo hongo usados contra *M. persicae* por Diaz *et al.* 2009 (TL_{50} : 3,1 a 5,3 días). Las diferencias en los resultados de este estudio comparado a los valores de TL_{50} que obtuvieron esos autores pueden ser explicadas en algún grado por la diferencia de temperatura que había entre los ensayos y también podrían influir los diferentes mecanismos de defensa que pudieran tener las distintas especies de pulgones o insectos evaluados o por las diferentes metodologías y condiciones utilizadas en los bioensayos.

Determinación de la Dosis Letal 50

Con relación a la determinación de las DL_{50} , las diferentes dosis fueron comparadas al tercer día después de la inoculación, correspondiente al día en que la primera cepa superó el 95% de la mortalidad acumulada (Tabla 2).

Cepa	Procedencia	Región Ecológica	Ecuación regresión	DL_{50}
Be 1	Curacautín	MPH	$y=0,313x+1,44$	2,211
Be 2	Llifén	OIM	$y=0,402x+0,46$	1,911
Me 1	Angol	MPH	$y=0,215x+2,12$	2,213
Me 2	Futroño	OIM	$y=0,198x+2,18$	1,714
Pa 3	Curacautín	MPH	$y=0,217x+1,95$	1,214
Ve 1	Futaleufú	OIM	$y=0,373x+3,48$	1,24
Ve 2	Cochamó	OIM	$y=0,400x+2,15$	1,37
Ve 3	Curacautín	MPH	$y=0,361x+2,12$	9,87
Ve 4	Paillaco	OIM	$y=0,816x-0,94$	1,97

Tabla 2. Dosis letal media (DL_{50}) presentada por hongos entomopatógenos para ninfas de *Cinara cupressi* provenientes de ambas regiones ecológicas.

Entre las 9 cepas evaluadas, sólo aquellas cepas determinadas como *Verticillium sp.*, resultaron con dosis adecuadas para controlar ninfas de *Cinara*. Ve 1 causó 50% de la mortalidad de los pulgones a la más baja concentración de $1,2^4$ conidia mL^{-1} . Esto fue seguido por las cepas Ve 2, Ve 4 y Ve 3 ($1,3^7$, $1,9^7$ y $9,8^7$ conidia mL^{-1} respectivamente). Sin embargo, según el análisis Probit, las otras cepas requirieron una alta dosis de conidias mL^{-1} para producir sobre un 50% de mortalidad. Un valor de DL_{50} bajo de 4×10^4 conidia mL^{-1} de *V. lecanii* aplicado a una población de *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae) sobre hojas de tomate que se sumergieron en una solución de conidias fue reportada por Rodríguez y del Pozo (2003) y otro estudio realizado por (Fatiha *et al.* 2007) utilizando el método por aspersión con 4 diferentes cepas de *V. lecanii* para tratar *Bemisia tabaci* (Gennadius) resultó en que una de las cepas dio una DL_{50} de $1,2 \times 10^7$ conidias mL^{-1} , resultado muy similar al obtenido para las cepas de *Verticillium* en este trabajo (Tabla 2). Otro estudio con un bajo valor de DL_{50} de $2,7 \times 10^4$ conidia mL^{-1} de *V. lecanii* usado para controlar *Brevicoryne brassicae* y $1,2 \times 10^4$ conidia mL^{-1} usado contra *Aphis gossypii* fue reportado por Karindah *et al.* (1996) y Derakshan *et al.* (2007) respectivamente, lo que concuerda, con la DL_{50} que se obtuvo en el presente estudio con la cepa Ve 1. La baja DL_{50} obtenida con Ve 1 podría indicar la afinidad de esta cepa por ser aislada de *C. cupressi*. Esta mayor virulencia de *V. lecanii* sobre los pulgones pudiera ser explicada por lo indicado por Bye y Charnley (2008) quienes sugieren la existencia de una proteasa específica de *V. lecanii* que actuaría sobre estos insectos.

En ambas regiones ecológicas se encuentra representado el género *Verticillium*, pero al analizar la distribución de estas cepas, se observó que una se encontraba en la Región Ecológica Per-Húmeda y tres en la Región Ecológica Oceánica con Influencia Mediterránea, encontrándose en esta última la cepa más virulenta (Ve 1). Los factores que explican la mayor virulencia de esta cepa no están bien comprendidos, pero existen antecedentes que atribuyen el desarrollo de epizootias a las interacciones entre temperatura, humedad y luz.

CONCLUSIONES

Las cepas más virulentas fueron las pertenecientes a la especie *Verticillium lecanii* (Ve 1 y Ve 2.), con un TL_{50} de: 3,2 y 3,1 días y una DL_{50} de: $1,2^4$ y $1,3^7$ conidias mL^{-1} respectivamente ambas pertenecientes a la Región Ecológica Oceánica con Influencia Mediterránea, no encontrándose

diferencias significativas con el producto químico aplicado (pirimicarb) como testigo, pero con una acción más lenta.

El alto grado de efectividad, bajo condiciones de laboratorio con aplicaciones directas sobre ninfas de *C. cupressi* con las cepas de *Verticillium*, indicaría que estas cepas aisladas en el sur de Chile podrían ser un valioso complemento al control biológico efectuado por el parasitoide *Pauesia juniperorum* Sary. Por lo tanto, en estudios adicionales se debería ampliar la zona de prospección de hongos entomopatógenos, así como evaluar la virulencia y efectividad tanto bajo condiciones de laboratorio como de campo de los hongos considerados más promisorios en esta investigación.

Además, en futuras investigaciones se debería considerar la determinación a nivel de especie del hongo perteneciente al género *Neozygites* y su asociación con el pulgón en Chile.

AGRADECIMIENTOS

A las autoridades y funcionarios SAG Región de Los Lagos por apoyar el desarrollo de este estudio y a CONAF por permitir prospectar en el Monumento Natural Alerce Costero.

REFERENCIAS

- Abbott W.** 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18(2): 265–267.
- Barta M, L Cagán.** 2006. Aphid-pathogenic Entomophthorales (their taxonomy, biology and ecology). *Biologia, Bratislava* 61(21): 543-616.
- Butt T, R Humber.** 1989. An immunofluorescence study of mitosis in a mite-pathogen, *Neozygites* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales). *Protoplasma* 151, 115–123.
- Derakshan A, R Rabindra, B Ramunujam.** 2007. Efficacy of different isolates of entomopathogenic fungi against *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus) at different temperature
- Díaz B, M Oggerin, C López, V Rubio, A Fereres.** 2009. Characterization and virulence of *Lecanicillium lecanii* against different aphid species. *Biocontrol* 54(6): 825-835.
- Fatiha L, S Ali, S Ren, M Afzal.** 2007. Biological characteristics and pathogenicity of *Verticillium lecanii* against *Bemisia tabaci* (homoptera: aleyrodidae) on eggplant. *Pak. Entomol.* 29(2): 63-72.
- Finney D.** 1971. Probit analysis, 3rd edn. Cambridge University Press, London, 333 p.
- Karindah S, B Rahardjo, S Santoso.** 1996. Virulence of the fungus *Verticillium lecanii* Zimmermann against *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). *Agrivita*, 19(1): 30-34.
- Kim J, M Lee, C Yoon, H Kim, J Yoo, K Kim.** 2001. Control of cotton aphid and greenhouse whitefly with a fungal pathogen. *FFTC.* 7 p.
- Montalva C, E Rojas, C Ruiz, D Lanfranco.** 2010. El pulgón del ciprés en Chile: una revisión de la situación actual y antecedentes del control biológico. *Bosque* 31(2):81-88.
- Montalva C.** 2008. Evaluación de la virulencia de dos cepas de *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare y Gams para el control biológico de *Cinara cupressi* (Buckton). Tesis Ingeniero Forestal. Valdivia, Chile. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Austral de Chile. 22 p.
- Rodríguez A, E del Pozo.** 2003. Aislamientos de hongos entomopatógenos en Uruguay y su virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum* west. *Agrociencia* 7(2): 71-78.
- Saranya S, R Ushakumari, J Sosamma, M Babu.** 2010. Efficacy of different entomopathogenic fungi against cowpea aphid, *Aphis craccivora* (Koch). *Journal of Biopesticides* 3(1):138-142.
- Vu V, S Hong, K Kim.** 2007. Selection of entomopathogenic fungi for aphid control. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104(6):498-505.
- Yeo H, J Pell, P Alderson, S Clark, B Pye.** 2003. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. *Pest Management Science* 59(2): 156-165.