

PRIMER REGISTRO DE *CONIDIOPHORA CORONATUS* (ZYGOMYCETES: ENTOMOPHTHORALES) EN CRÍAS EXPERIMENTALES DE DOS ESPECIES PLAGA DEL MAÍZ: *DELPHACODES KUSCHELI* Y *D. HAYWARDI* (HEMIPTERA: DELPHACIDAE) EN LA ARGENTINA

A. V. TOLEDO¹, A. M. M. de REMES LENICOV² y C. C. LÓPEZ LASTRA¹

Summary: First record of *Conidiobolus coronatus* (Zygomycetes: Entomophthorales) in experimental breeding of two pest species of corn: *Delphacodes kuscheli* and *D. haywardi* Muir (Hemiptera: Delphacidae) in Argentina. The natural occurrence of the entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus* (Costantin) Batko (Zygomycetes: Entomophthorales) in adults of *Delphacodes kuscheli* Fennah and *D. haywardi* Muir (Hemiptera: Delphacidae), reared on *Hordeum vulgare* L. under greenhouse conditions, was investigated. Dead insects, suspected of fungal infection, were collected, surface sterilized, and examined in the laboratory. *Conidiobolus coronatus* was isolated in pure cultures, described morphologically, and deposited in mycological collections. This paper presents the first record of *C. coronatus* against harmful insects in Argentina.

Key words: entomopathogenic fungi, delphacids, first record, Argentina, biological control.

Resumen: Se investigó la ocurrencia natural del hongo entomopatógeno *Conidiobolus coronatus* (Costantin) Batko (Zygomycetes: Entomophthorales) en adultos de *Delphacodes kuscheli* Fennah y *D. haywardi* Muir (Hemiptera: Delphacidae), criados sobre *Hordeum vulgare* L. bajo condiciones de invernadero. Los insectos muertos, por una sospechada infección fúngica, fueron recolectados, esterilizados superficialmente, y examinados en el laboratorio. *Conidiobolus coronatus* fue aislado en cultivos puros, descrito morfológicamente y depositado en colecciones micológicas. Este trabajo presenta el primer registro de *C. coronatus* contra insectos perjudiciales en la Argentina.

Palabras clave: hongos entomopatógenos, delfácidos, primer registro, Argentina, control biológico.

INTRODUCCIÓN

La importancia fitosanitaria de los Delphacidae es reconocida en el mundo debido a la capacidad que poseen de vehiculizar diferentes fitopatógenos tales como virus y bacterias, así como también por los considerables daños mecánicos que provocan a los cultivos durante la alimentación y la oviposición (Nault & Ammar, 1989). Muchas especies de delfácidos son transmisoras de enfermedades a cultivos de gran importancia económica a nivel mundial, como el maíz. *Delphacodes kuscheli* Fennah y *D. haywardi* Muir (Hemiptera: Delphacidae), especies nativas del área central de la Argentina ampliamente representadas entre los 30° y 36° de

¹Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) UNLP-CONICET. Calle 2 N° 584 (1900), La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Fax: +54 221 423 2327. E-mail: atoledo@cepave.edu.ar
²División Entomología. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. UNLP. Paseo del Bosque s/n. (1900), La Plata, Buenos Aires, Argentina.

latitud Sur (Remes Lenicov & Virla, 1999), son vectores naturales del virus del Mal de Río Cuarto del maíz (MRCV) (Remes Lenicov *et al.* 1985, Velázquez *et al.*, 2003), *Fijivirus* recientemente considerado como una entidad diferente del «*Maize rough dwarf virus*» (MRDV) presente en Europa y Asia (Arneodo *et al.*, 2002). *Delphacodes kuscheli* representa el principal vector del virus causante de esta enfermedad endémica que, desde fines de la década del 60 (Nome *et al.*, 1981), afecta con severidad la mayor parte del área maicera de la Argentina (Laguna *et al.*, 2002).

Conidiobolus coronatus (Costantin) Batko (Zygomycetes: Entomophthorales) es un hongo considerado normalmente como una especie saprofítica en suelos, que puede ser patógena facultativa de algunos artrópodos, así como de otros animales, incluyendo vertebrados de sangre caliente. Su acción patogénica contra Hemiptera Delphacidae ha sido registrada previamente en Asia por Okada (1971) y Rombach *et al.* (1987) sobre dos de las

especies plaga del arroz más importantes de ese continente: *Laodelphax striatellus* (Fallén) y *Nilaparvata lugens* (Stål).

En el presente trabajo se da a conocer la ocurrencia de infecciones naturales ocasionadas por *C. coronatus* en adultos de *D. kuscheli* y *D. haywardi* provenientes de crías experimentales. Este hallazgo constituye el primer registro para la Argentina de esta especie fúngica y contribuye a ampliar su espectro natural de hospedadores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los delfácidos fueron mantenidos a una temperatura media anual de 20,7° C (min.: 10° C – máx.: 34° C) y un fotoperíodo de 12 horas de luz, en un invernáculo de 3 x 2 x 2 m constituido por paneles de vidrio, ubicado en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE, La Plata, Buenos Aires, Argentina) (Lat.: 35° 54' 18,2" S – Long.: 57° 57' 0,3" O). El invernáculo fue calefaccionado con un radiador de aceite durante los meses de invierno y protegido mediante la cobertura del techo con una tela de media sombra oscura durante los meses de verano para evitar temperaturas mayores a 35° C. En los meses de invierno la fotoperiodicidad de 12 horas de luz fue completada con iluminación artificial de aproximadamente 213 lux. Tanto *D. kuscheli* como *D. haywardi* fueron criados sobre cebada forrajera, *Hordeum vulgare* L., sembrada en macetas plásticas de 1000 cc de capacidad y aislados con jaulas de PET (tereftalato de polietileno) de 24 cm de alto x 8,7 cm de diámetro provistas de tres aberturas, una superior cubierta con tela de voile y dos laterales obturadas con algodón (Fig. 1A).

Los insectos con signos externos de infección fúngica fueron recolectados a partir de las jaulas de cría con la utilización de pinzas entomológicas, colocados en tubos de ensayo previamente esterilizados en autoclave tipo Chamberlain (20 minutos a 121° C y 1 atmósfera) y transportados al laboratorio. Los cadáveres con desarrollo externo de micelio fueron adheridos con cinta adhesiva de doble faz a la tapa de una cápsula de Petri de 6 cm de diámetro conteniendo medio de cultivo Sabouraud dextrosa agar enriquecido con 1% de extracto de levadura (SDA-Y 1%) + antibiótico previamente esterilizado por filtración (penicilina G 40.000 unidades/ml - Merck, Alemania y estreptomycin sulfato 80.000 unidades/ml - Parafarm®, Argentina).

La dosis de antibiótico suministrada fue de 100 µl por cada 100 ml de medio de cultivo. En estas condiciones las cápsulas fueron incubadas por 24 horas a 25° C en oscuridad para dar lugar a la descarga activa de conidios (Papierok & Hajek, 1997). Una vez lograda la descarga de los conidios en el medio de cultivo, los insectos fueron retirados bajo cámara de flujo laminar vertical y los aislamientos fúngicos fueron incubados por 5 días a 25° C en oscuridad. Luego de este período de tiempo, los aislamientos puros de *C. coronatus* fueron transferidos a tubos de vidrio conteniendo medio de cultivo (SDA-Y 1%) en estría y depositados en la Colección Micológica del CEPAVE (La Plata, Buenos Aires, Argentina) y en la Colección de cultivos de hongos entomopatógenos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (USDA-ARS. ARSEF Ithaca, New York, USA).

Algunos insectos fueron preparados para su observación bajo microscopio óptico, colocándolos directamente en agua destilada entre un porta y un cubre objetos, mientras que otros tantos fueron adheridos con cinta adhesiva de doble faz a la tapa de una cápsula de Petri conteniendo en el fondo un cubre objetos colocado sobre papel de filtro humedecido con agua destilada estéril. Las cápsulas conteniendo los insectos infectados fueron incubadas por 24 horas a 25° C en oscuridad. Las medidas de los conidios fueron tomadas a partir de la descarga activa de los mismos desde el micelio desarrollado en una hembra adulta de *D. kuscheli* recolectada el 20 de octubre de 2004, mientras que las demás estructuras fúngicas fueron observadas y medidas a partir de preparaciones microscópicas realizadas con el micelio desarrollado sobre el hospedador. Las estructuras fúngicas fueron teñidas con aceto orceína 1% (p/v), observadas y medidas bajo microscopio óptico Olympus CH30 equipado con contraste de fases. Las preparaciones microscópicas fueron fotografiadas e ilustradas utilizando un microscopio óptico Nikon Optiphot equipado con contraste de interferencia diferencial, cámara clara y cámara fotográfica Canon Power Shot A80. Las estructuras fúngicas fueron medidas también a partir de preparados realizados desde el micelio desarrollado sobre el hospedador. Todos los valores merísticos se encuentran expresados en mínima – máxima (media ± error estándar) correspondiente a un N = 30. La identificación y la descripción de la especie fúngica se realizó de acuerdo a Keller (1987) y Bařazy (1993).

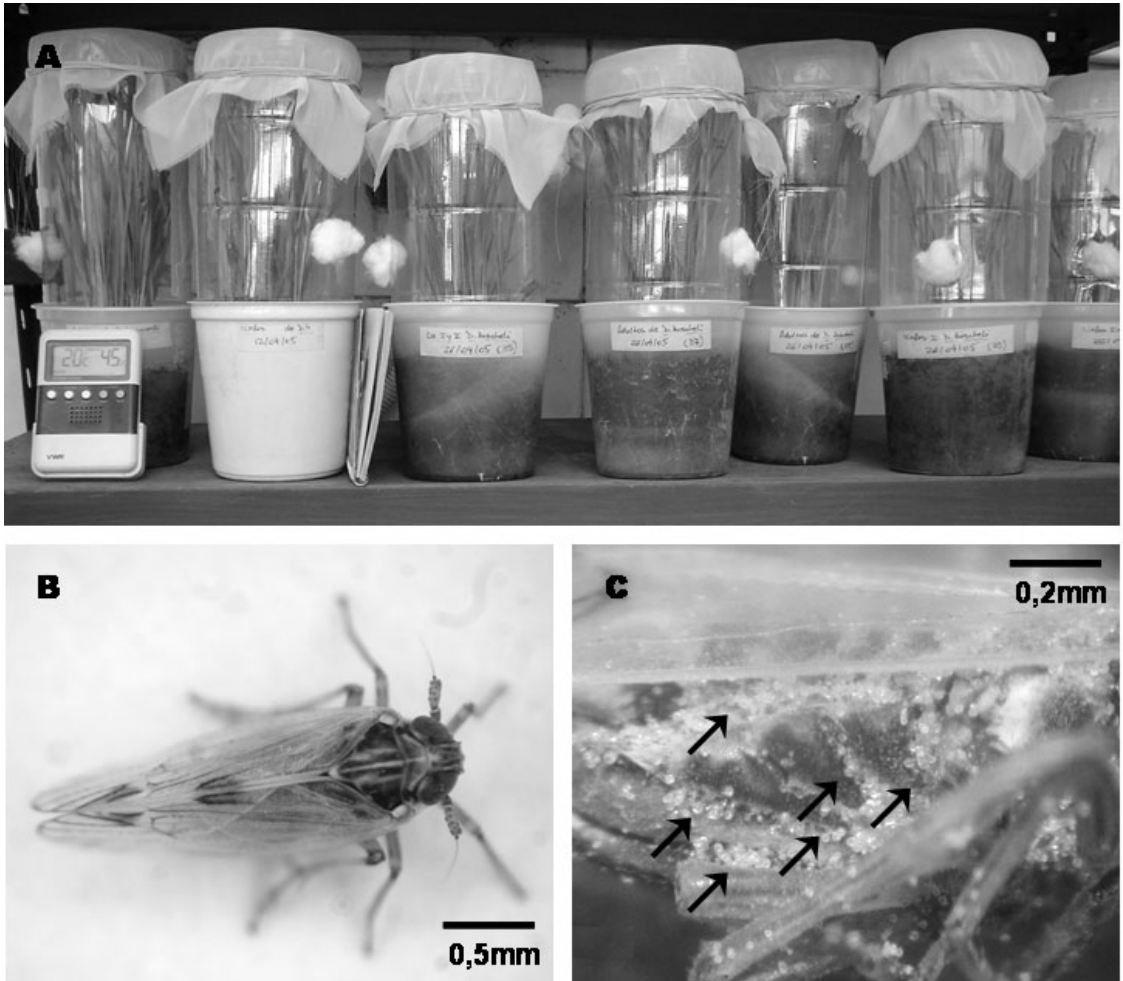


Fig. 1. A: *Delphacodes haywardi* y *D. kuscheli* criados sobre *Hordeum vulgare* dentro de jaulas de PET, bajo invernáculo. **B:** Hembra sana de *D. kuscheli*. **C:** Hembra de *D. kuscheli* infectada con *C. coronatus*, mostrando claramente la formación de los conidios a partir del micelio que surge entre las membranas intersegmentales del abdomen (flechas).

RESULTADOS

Conidiobolus coronatus fue detectado provocando infecciones sólo en adultos de ambos sexos de *D. kuscheli* (Fig.1 B-C) y *D. haywardi*. El cultivo puro del hongo entomopatógeno se pudo lograr a partir de hembras adultas de *D. haywardi* recolectadas el 19 de agosto de 2003. En el momento de la recolección, los cadáveres se encontraron dispuestos sobre las paredes de la jaula de cría y las hojas de las plántulas. Uno de los aislamientos fúngicos obtenidos fue depositado en las colecciones micológicas del CEPAVE y de ARSEF bajo los números de acceso CEP 062 y ARSEF 7203, respectivamente.

Sobre los insectos muertos, *C. coronatus* presentó un color ámbar claro, dando al hospedador un aspecto azucarado (Fig. 1C). La formación de los conidios primarios fue claramente visible a partir del micelio que surgió a través de las membranas intersegmentales de todo el cuerpo del hospedador. Los conidios primarios fueron esféricos y con una papila cónica o redondeada, midiendo $17,6-39,5$ ($35,4 \pm 0,7$) \times $24,7-29,6$ ($28,1 \pm 0,6$) μm , los conidios secundarios, de morfología similar a los primarios midieron $24,7-29,6$ ($26,9 \pm 0,8$) \times $19,8-24,7$ ($21,6 \pm 0,5$) μm . Se observó el desarrollo de esporas de resistencia con presencia de apéndices vellosos. Estos conidios vellosos presentaron un diámetro de $19,8-24,7$ ($23,9 \pm 0,8$) μm (Fig. 2). El ancho de los conidióforos fue de $9,9-14,8$ ($12,7 \pm 0,8$) μm .

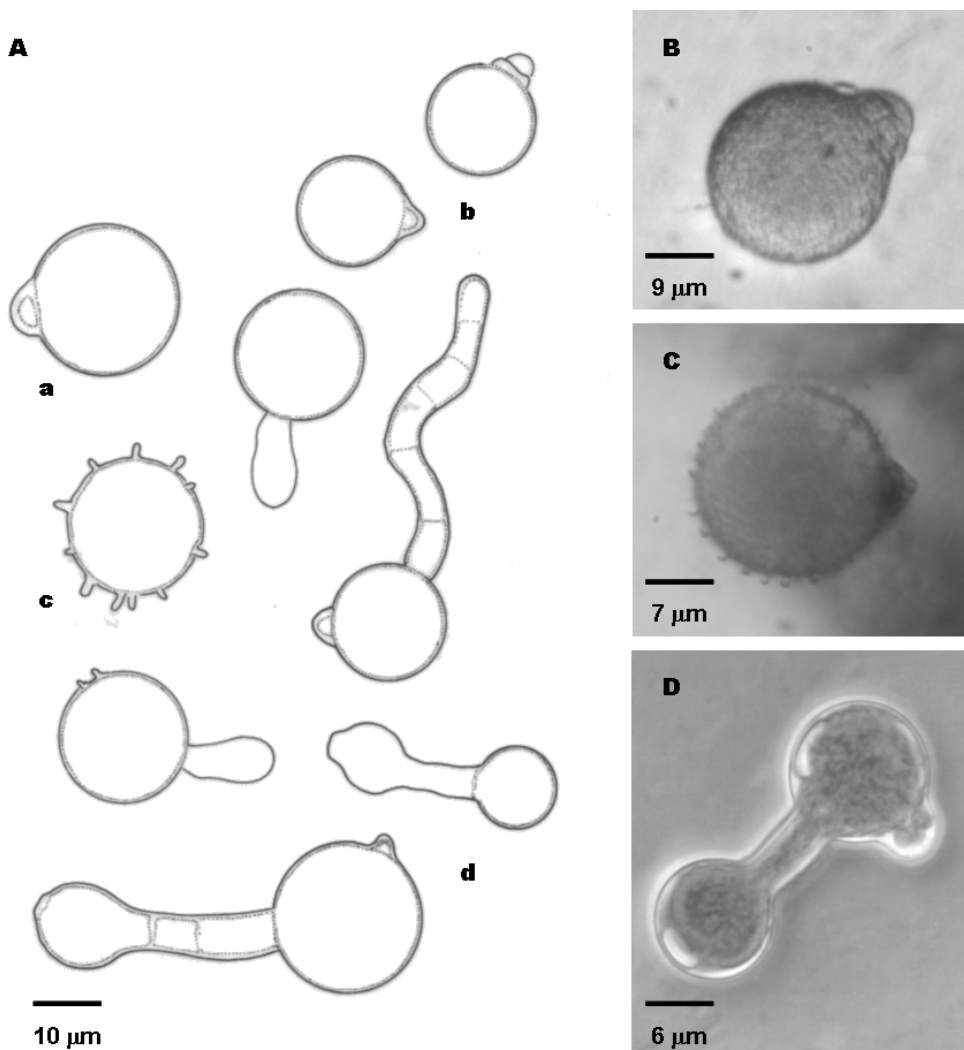


Fig. 2. *Conidiobolus coronatus*. **A:** Esquema de los distintos estados de desarrollo de los conidios de *C. coronatus*: **(a)** Conidio primario, **(b)** Conidios secundarios, **(c)** Conidio vellosos, **(d)** Germinación de conidios. **B:** Fotografía microscópica de un conidio primario. **C:** Fotografía microscópica de un conidio vellosos. **D:** Fotografía microscópica de un conidio primario dando origen a un conidio secundario.

DISCUSIÓN

El ciclo de vida de *C. coronatus* está representado por una variedad de estados morfológicamente diferentes, entre los que se encuentran distintas clases de conidios, cuya transformación está estrechamente ligada a las condiciones ambientales y a la naturaleza del substrato dónde se desarrolla (Praserthphon, 1963). En el presente estudio pudo observarse la formación de conidios primarios a partir de los conidióforos desarrollados sobre el insecto hospedador y la formación de conidios secundarios

y conidios vellosos en el agua de condensación depositada sobre cubreobjetos. En ninguna de las preparaciones microscópicas se registró el desarrollo de microconidios, como fuera observado por Praserthphon (1963), quién registró la formación de los mismos a partir de conidios primarios descargados en agua de condensación. Los resultados de este estudio muestran que tanto los diámetros de los conidios primarios y de los secundarios, como así también los de los conidios vellosos se encuentran dentro de los rangos observados por Praserthphon (1963) (Conidios primarios y secundarios: 25–61 μm . Conidios vellosos: 8–42 μm) y por Keller (1987)

(Conidios primarios y secundarios: 37–74 µm. Conidios vellosos: 16–42 µm).

Conidiobolus coronatus fue citado previamente infectando a *Metopolophium dirhodum* (Walter) (Hemiptera: Aphididae) criados bajo condiciones de invernadero en Sudáfrica (Hatting *et al.*, 1999). Asimismo, Okada (1971) dio a conocer la presencia esporádica de una especie de *Conidiobolus* estrechamente relacionada a *C. coronatus* en *Laodelphax striatellus*, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) y posiblemente en *Nephotettix cincticeps* (Uhler) (Hemiptera: Cicadellidae) en colonias de laboratorio y en poblaciones de campo. El presente hallazgo constituye la primera cita de este entomopatógeno para la Argentina y contribuye a ampliar, a nivel mundial, el espectro de hospedadores de esta especie fúngica.

Por último es interesante mencionar que si bien no hemos efectuado hasta el momento ensayos para evaluar la patogenicidad de *C. coronatus* contra delfácidos plaga de cultivos cerealeros en la Argentina, hemos registrado en varias oportunidades la manifestación externa de esta especie fúngica en cadáveres de *D. kuscheli* y *D. haywardi* inoculados experimentalmente con *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & W. Gams e *Isaria fumosorosea* Wize (Ascomycota: Hypocreales). Los registros previos indican que es posible la detección de infecciones mixtas entre hongos Entomophthorales e Hypocreales en insectos de campo. Por ejemplo, Aoki (1974) detectó un 20% de infecciones mixtas provocadas por *Entomophthora* sp. y *Paecilomyces canadensis* (Vuill.) Brown & Smith en larvas de *Lymantria dispar japonica* Motschulsky (Lepidoptera: Lymantridae) provenientes de bosques naturales en Japón. Esta última observación resulta interesante ya que nos permite plantear la hipótesis de una acción sinérgica entre dos especies fúngicas diferentes, lo cual representa una cualidad positiva en el planeamiento de la utilización de los hongos entomopatógenos como controladores biológicos de delfácidos plaga de cultivos cerealeros en la Argentina.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Richard A. Humber (USDA - ARS Plant Soil and Nutrition Laboratory,

Ithaca, NY, USA) por la confirmación de la especie fúngica, a la Sra. María Cristina Estivariz (Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores, La Plata, Buenos Aires, Argentina) por la realización de las ilustraciones de *C. coronatus* y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por financiar parcialmente este estudio a través de una beca doctoral.

BIBLIOGRAFÍA

- AOKI, J. 1974. Mixed infection of the Gipsy Moth, *Lymantria dispar japonica* Motschulsky (Lepidoptera: Lymantridae), in a Larch Forest by *Entomophthora aulicae* (reich.) Sorok. and *Paecilomyces canadensis* (Vuill.) Brown & Smith. *Appl. Ent. Zool.* 9: 185-190.
- ARNEODO, J. D., F. A. GUZMÁN, L. R. CONCI, I. G. LAGUNA & G. A. TRUOL. 2002. Transmission features of Mal de Río Cuarto virus in wheat by its planthopper vector *Delphacodes kuscheli*. *Ann. Appl. Biol.* 141: 195-200.
- BAŁAZY, S. 1993. Flora of Poland (Flora Polska), Fungi (Mycota). *Polish. Acad. Sci., W. Szafer Inst. Botany, Kraków.* 24: 1-356.
- HATTING, J. L., R. A. HUMBER, T. J. POPRAWSKI & R. M. MILLER. 1999. A survey of fungal pathogens of Aphids from South Africa, with special reference to cereal Aphids. *Biol. Control* 16: 1-12.
- KELLER, S. 1987. Arthropod – pathogenic Entomophthorales of Switzerland. I. *Conidiobolus*, *Entomophaga* and *Entomophthora*. *Sydowia Ann. Mycol.* 40: 122-167.
- LAGUNA, G., A. M. M. de REMES LENICOV, E. VIRLA, A. O. AVILA, M. P. GIMÉNEZ PECCI, P. HERRERA, J. GARÁY, D. PLOPER & R. MARIANI. 2002. Difusión del virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) del maíz, su vector, delfácidos asociados y huéspedes alternativos en la Argentina. *Revista Soc. Ent. Argent.* 61: 87-97.
- NAULT, L. R. & E. D. AMMAR. 1989. Leafhopper and planthopper transmission of plant viruses. *Ann. Rev. Entomol.* 34: 503-529.
- NOME, S. F., S. L. LENARDÓN, B. C. RAJU, I. G. LAGUNA, S. K. LOWE & D. DOCAMPO. 1981. Association of Reovirus-like particles with «Enfermedad de Río IV» of maize in Argentina. *Phytopathol. Zeitschrift* 101: 7-15.
- OKADA, T. 1971. An entomophthoraceous fungus, *Conidiobolus* sp., separated from planthoppers, *Laodelphax striatellus* (Fallén) and *Nilaparvata lugens* (Stål). *Proc. Assoc. Pl. Prot. Kyushu* 17: 107-110.
- PAPIEROK, B. & A. E. HAJEK. 1997. Fungi: Entomophthorales. In: LACEY, L.A. (ed.), *Manual of techniques in insect pathology*. pp. 187-212. Academic Press Inc., San Diego, California, USA.
- PRASERTPHON, S. 1963. Conidial formation in *Entomophthora coronata* (Costantin) Kevorkian. *J.*

- Invert. Pathol.* 5: 318-335.
- REMES LENICOV, A. M. M. de, A. TESÓN, E. DAGOBERTO & N. HUGUET. 1985. Hallazgo de uno de los vectores del «Mal de Río Cuarto» del maíz. *Gaceta Agronómica* 5: 251-258.
- REMES LENICOV, A. M. M. de & E. VIRLA. 1999. Homópteros vectores de interés fitosanitario: un problema creciente en la Argentina (Insecta-Homoptera-Auchenorrhyncha). *Revista Soc. Ent. Argent.* 58: 43-47.
- ROMBACH, M. C., G. M. ROMBACH & D. W. ROBERTS. 1987. Pathogens of insect pests of rice: a bibliography. *Insect Sci. Appl.* 8: 197-210.
- VELÁZQUEZ, P. D., J. D. ARNEODO, F. A. GUZMÁN, L. R. CONCI & G. A. TRUOL. 2003. *Delphacodes haywardi* Muir, a new natural vector of *Mal de Río Cuarto virus* in Argentina. *J. Phytopatol.* 151: 669-672.

Recibido el 29 de Marzo de 2007, aceptado el 05 de Junio de 2007.