

Aislamiento, identificación y patogenicidad de *Hirsutella* en *Planococcus citri*

Isolation, identification and *pathogenicity* of *Hirsutella* in *Planococcus citri*

Kevin Asdrúbal Quesada-Sojo¹, William Rivera-Méndez²

Fecha de recepción: 15 de junio del 2015

Fecha de aprobación: 13 de octubre del 2015

Quesada-Sojo, K; Rivera-Méndez, W. Aislamiento, identificación y patogenicidad de *Hirsutella* en *Planococcus citri*. *Tecnología en Marcha*. Edición Especial Biocontrol. Pág 74-84.

1 Estudiante de Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Tel. (506)8407-9592, correo electrónico: kequesada@estudiantec.cr

2 Profesor. Ingeniero en Biotecnología. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Tel. (506)2550-9094, correo electrónico: wirivera@itcr.ac.cr

Palabras clave

Hirsutella; *Planococcus citri*; control biológico; hospedero; cochinillas.

Resumen

Las especies de hongos pertenecientes al género *Hirsutella* son capaces de infectar y parasitar gran variedad de invertebrados. *Planococcus citri* es una peste polífaga importante en diversos cultivos. El objetivo de este proyecto fue aislar, identificar y determinar la patogenicidad de *Hirsutella* sobre individuos adultos de *P. citri* a partir de muestras de campo. El micelio se produjo en medio sólido PDA acidificado al 2%, que cubrió la placa a los 11 días de haber sido cultivado. Se preparó una solución conidiógena a partir del micelio producido y se asperjó sobre individuos adultos de *P. citri* para determinar los porcentajes de patogenicidad de las cepas aisladas; estos fueron: 90%, 78,6% y 90,9% a los seis días de haberse iniciado el bioensayo de patogenicidad, lo que confirma las cualidades biocontroladoras del género *Hirsutella* para su utilización en el manejo tanto de *P. citri* como de otras plagas importantes agrónomicamente.

Keywords

Hirsutella; *Planococcus citri*; host; biological control; mealybug.

Abstract

Fungal species belonging to the genus *Hirsutella* are capable to infect and parasite a wide variety of pathogen invertebrates. *Planococcus citri* is an important polyphagous plague in various crops of agronomic importance. The project objective was to conduct a study related to processes of isolation, identification and pathogenicity determination of *Hirsutella* genus over *P. citri* from 21 field samples. The mycelium was produced on PDA solid medium acidified (2%), which covered the plate at 11 days being cultivated. A conidiogenous solution was prepared from the mycelium and was sprinkled on adult life stage individuals of *P. citri* to determine the percentages of pathogenicity of isolates. These were: 90%, 78,6% and 90,9% at 6 days after of begin the bioassay, which confirm the biocontrol qualities of the genus *Hirsutella* for its use in handling both *P. citri* as other agronomically important pests.

Introducción

Hirsutella es uno de los géneros de hongos más abundantes e importantes para el control de insectos plaga en el campo. *H. thompsonii* se reportó por primera vez en asociación con *Phyllocoptruta oleivora* y Fisher lo describió como una nueva especie en 1950 (Vacante, 2010).

Hirsutella incluye alrededor de 90 especies capaces de infectar y parasitar una gran variedad de invertebrados como ácaros, nemátodos e insectos, muchos de los cuales se consideran plagas económicamente importantes (Toledo et al., 2013).

En insectos, esa capacidad se ha demostrado en especies como *Diaphorina citri*, transmisora de la bacteria *Candidatus liberibacter*, *Homalodisca vitripennis*, transmisora de la bacteria fitopatogénica *Xylella fastidiosa*, y *Delphacodes kuscheli*, transmisora del virus del Mal de Río Cuarto (MRCV).

Planococcus citri es un polífago importante de cultivos como cítricos, viñedos, café y plantas ornamentales, siendo probablemente la especie más destructiva de la familia *Pseudococcidae*.

Se alimenta succionando la savia presente en las células del tallo, ramas y hojas, ocasionando su caída prematura, retraso en el crecimiento y en ocasiones la muerte en plantas infestadas tanto de manera completa como parcial. Se caracteriza por producir una secreción de consistencia melosa en grandes cantidades, que se incrusta en las hojas y racimos de los frutos, ocasionando daños visibles en los cultivos. Algunos de esos daños incluyen oscurecimiento de los tejidos foliares, así como pérdida de su vitalidad y turgencia. Todos estos elementos afectan la calidad del fruto y disminuyen la capacidad fotosintética de la planta, lo que desencadena una reducción de su vigorosidad. (Demirci et al., 2011b).

Por otra parte, se conoce que *P. citri* es vector de varias enfermedades virales a bajos niveles de infestación. La cochinilla transmite el Virus 3 Asociado al Enrollado de la Vid (GLRaV-3) (Demirci et al., 2011b) perteneciente al género *Ampelovirus* de la familia *Closteroviridae*, responsable de causar el enrollamiento hacia el envés en los viñedos (figura 1), así como enrojecimiento en variedades tintas. Además, es capaz de causar amarillamiento de las zonas internerviales (figura 2), mientras que en los racimos genera maduración heterogénea y menor contenido de azúcar (Vega et al., 2011).



Figura 1. Enrollamiento hacia el envés producido por la presencia de GLRaV-3 en una variedad blanca de vid.
Fuente: Gobierno de la Rioja, Consejería de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente.



Figura 2. Enrojecimiento internervial producido por GLRaV en una variedad tinta. Fuente: Gobierno de la Rioja, Consejería de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente.

El control de insectos se realiza comúnmente con insecticidas, no obstante, las cochinillas son capaces de oponer altos niveles de resistencia a este tipo de método. Por otro lado, su control con agentes químicos presenta dificultades porque se encuentran en sitios protegidos de la corteza, donde es difícil que penetre el plaguicida. Además, este insecto usualmente está cubierto por una secreción blanca de consistencia cerosa que cubre su cuerpo por completo, imposibilitando la penetración del insecticida.

El control biológico de plagas utilizando agentes entomopatógenos se usa con frecuencia en programas de manejo integrado de plagas (MIP), dado que su toxicidad para animales no objetivos y humanos es extremadamente baja. Los hongos entomopatógenos como *Hirsutella* son capaces de sobrevivir en la naturaleza y pueden ocasionar infecciones repetitivas, siempre y cuando se tomen las precauciones pertinentes en campos con aplicaciones previas de fungicidas (Demirci et al., 2011a).

El objetivo del presente proyecto consistió en aplicar un método de aislamiento e identificación de *Hirsutella*, para estudiar su efecto biocontrolador en *P. citri*.

Materiales y métodos

Aislamiento y caracterización de *Hirsutella*

El muestreo se llevó a cabo en una plantación de cítricos ubicada en la Quinta Santa Mónica, en Paraíso de Cartago, Costa Rica, que poseía una gran variedad de especies vegetales, entre ellas naranjos (*Citrus x sinensis*) y árboles de limón (*Citrus x limón*). Se recolectaron hojas de árbol de limón entre los meses de febrero y abril de 2015 que presentaban cochinillas de *P. citri* parasitadas por el hongo (figura 3).

Las muestras se conservaron en bolsas de papel aluminio almacenadas en recipientes plásticos a una temperatura de 10 °C.

La identificación macroscópica del hongo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología del Tecnológico de Costa Rica, mediante la visualización en el estereoscopio. Sus características morfológicas se compararon con los esquemas, diagramas y dibujos de la literatura (Verena et al., 2011).

Aislamiento e identificación microscópica de *Hirsutella*

Para el aislamiento del hongo a partir de las muestras de campo, se utilizó el medio de cultivo PDA acidificado con ácido láctico al 2%. Durante el estudio se realizaron tres subcultivos, con el objetivo de asegurar el aislamiento y tener material suficiente para las pruebas posteriores.

Se utilizaron escamas de cochinillas parasitadas e hifas presentes en las muestras. La desinfección de las cochinillas se efectuó con dos soluciones: alcohol de 70% durante un minuto y cloro al 3% durante 30 segundos. Posteriormente, las muestras se lavaron con agua destilada estéril durante dos minutos en cámara de flujo laminar. De forma consecutiva al lavado, el material se colocó en papel filtro estéril para secarlo y evitar el exceso de humedad antes de ubicarlo en el medio de cultivo. Se dispuso de un total de 20 muestras de escamas y por cada escama un total de cuatro hifas, que se sembraron en medio de cultivo de forma separada y luego se incubaron a temperatura ambiente (25 °C) durante una semana para evaluar su desarrollo. A nivel microscópico, se prepararon para la visualización e identificación de los conidios del hongo.

Efectos patogénicos de *Hirsutella* sobre la cochinilla *P. citri*

P. citri se aisló a partir de hojas de *Carica papaya* durante los meses de mayo y abril de 2015 del mismo lugar del que se aisló *Hirsutella*. Las cochinillas fueron removidas del follaje afectado utilizando un pincel y colocadas en recipientes separados, según el estadio de desarrollo.

Bioensayo de patogenicidad preliminar en *P. citri*

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biología y en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Tecnológico de Costa Rica, en Cartago, durante el primer semestre de 2015.

Se realizó una prueba de patogenicidad preliminar para evaluar la capacidad patogénica de los aislamientos. El protocolo utilizado se basó parcialmente en el estudio desarrollado por Demirci et al. (2011a), dado que el bioensayo se enfocó en estudiar el efecto patogénico del hongo sobre adultos de *P. citri*. Para ello se diluyó un gramo de micelio en 5 ml de agua destilada estéril y se agitó por dos minutos en vórtex. Luego se retiró el micelio y la solución conidiógena resultante fue asperjada sobre la porción de hoja infestada por cochinillas, en una placa Petri con papel toalla húmedo. Se hicieron tres repeticiones y un control, evaluándose el grado de patogenicidad al sexto día. Para el control se aplicó agua destilada sobre las cochinillas, mientras que para el cálculo del porcentaje de patogenicidad se usó la siguiente fórmula:

$$\%P = \left(\frac{\text{ácaros micosados}}{\text{ácaros totales}} \right) \times 100$$

Resultados y discusión

Aislamiento y caracterización de *Hirsutella*

La presencia de *Hirsutella* sobre cochinillas parasitadas en las muestras foliares se caracterizó por el recubrimiento del hongo sobre escamas de adultos muertos, los cuales presentaban una coloración amarillenta (figura 3A). Por su parte, las hifas presentaron una coloración blanca, además de una morfología alargada y algodónosa que brotaba del tegumento de la cochinilla muerta (figura 3B).

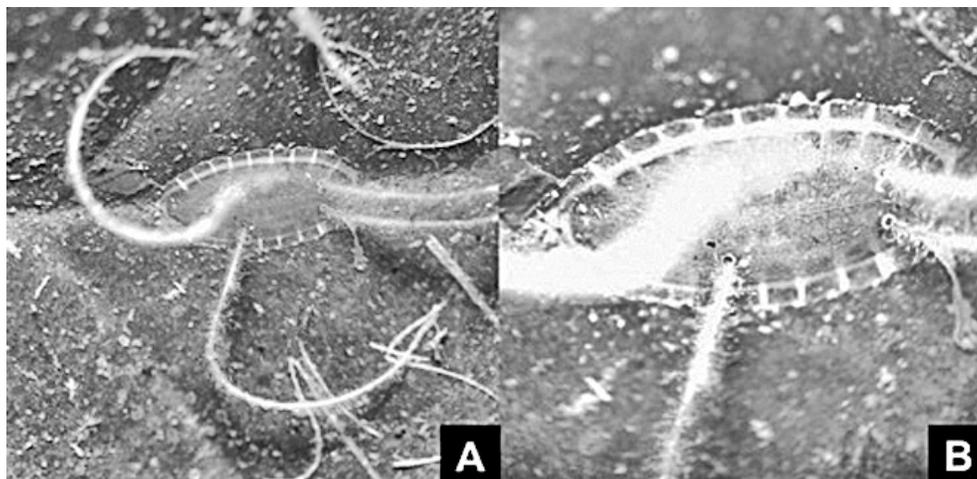


Figura 3. Estructura de la cochinilla parasitada por *Hirsutella*. Se observa la coloración amarillenta del individuo muerto (A) (30X), del cual brotan hifas de coloración blanca (B) (35X).

Aislamiento e identificación microscópica de *Hirsutella*

El cuadro 1 muestra el aislamiento llevado a cabo a partir de escamas e hifas provenientes de las muestras de campo.

Cuadro 1. Aislamientos de *Hirsutella* llevados a cabo a partir de escamas e hifas provenientes de muestras de campo.

Escamas				Hifas			
Muestra	Desarrollo	Muestra	Desarrollo	Muestra	Desarrollo	Muestra	Desarrollo
E1	NA	E11	NA	H1	NA	H11	NA
E2	NA	E12	A	H2	NA	H12	A
E3	NA	E13	NA	H3	NA	H13	NA
E4	NA	E14	NA	H4	NA	H14	NA
E5	NA	E15	NA	H5	NA	H15	NA
E6	NA	E16	A	H6	NA	H16	A
E7	NA	E17	NA	H7	NA	H17	NA
E8	NA	E18	NA	H8	NA	H18	NA
E9	NA	E19	A	H9	NA	H19	NA
E10	NA	E20	NA	H10	NA	H20	NA

*Simbología: E= Escama, H= Hifa, A= Aislado, NA= No aislado.

A partir de las escamas E12, E16, E19 (figura 4) y las hifas H12 y H16 se obtuvieron aislamientos del hongo estudiado después de 11 días de haber sido cultivado. Según Sánchez et al. (2011), *Hirsutella* es un hongo de crecimiento lento que presenta bajos porcentajes de conidiación. En condiciones de laboratorio, su crecimiento radial es una variable que depende principalmente de factores como: tipo de cepa, características genéticas, naturaleza del substrato en el que se desarrolla, especialmente por las proporciones de C/N que puedan llegar a presentarse en este. Se evidenció que el requerimiento nutricional resultó ser poco demandante por parte del hongo, ya que cubrió toda la placa de Petri en los 11 días de crecimiento. Van der Geest et al. (2000) indican que *Hirsutella* es un hongo de cultivo sencillo en medio artificial, en contraste con otros entomopatógenos, capaz de crecer en una gran variedad de medios con agar y medios líquidos.

La identificación a nivel microscópico se basó principalmente en los estudios de caracterización morfológica y molecular de *Hirsutella* desarrollados por Toledo et al. (2013). Se observaron conidios sobre la superficie del sinema, que surgían a partir de este como células laterales, distribuyéndose de manera intercalada a lo largo de las hebras miceliales (figura 5).

Los conidios de tipo hialino no presentaban septos, además eran elípticos y solitarios (figura 6A), no obstante, se observaron algunos dispuestos en parejas (figura 6B). Se logró ver la capa mucilaginososa externa de los conidios, la cual es importante por su actividad enzimática, y está relacionada con procesos de adhesión, antisequedad y protección contra los fenoles tóxicos producidos por el hospedero (Rosas, 2003).

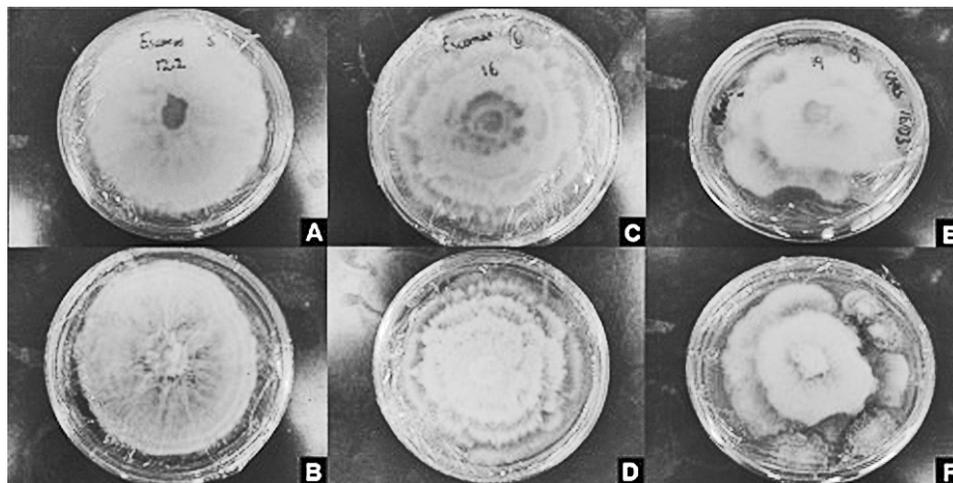


Figura 4. Aislamientos satisfactorios llevados a cabo con escamas de cochinillas parasitadas por *Hirsutella* a los 11 días de haber sido cultivados. E12: (A) y (B) E16: (C) y (D) E19: (E) y (F).

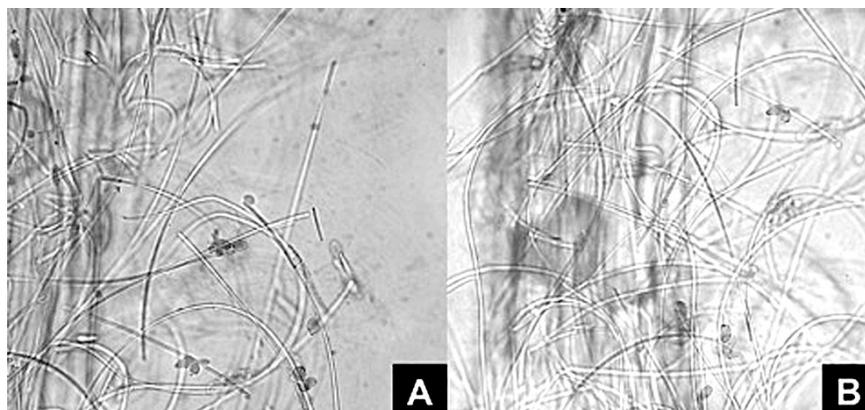


Figura 5. Conidios sobre la superficie del sinema de *Hirsutella* (A) (100X). Distribución intercalada de los conidios a lo largo de las hebras miceliales (B) (100X).

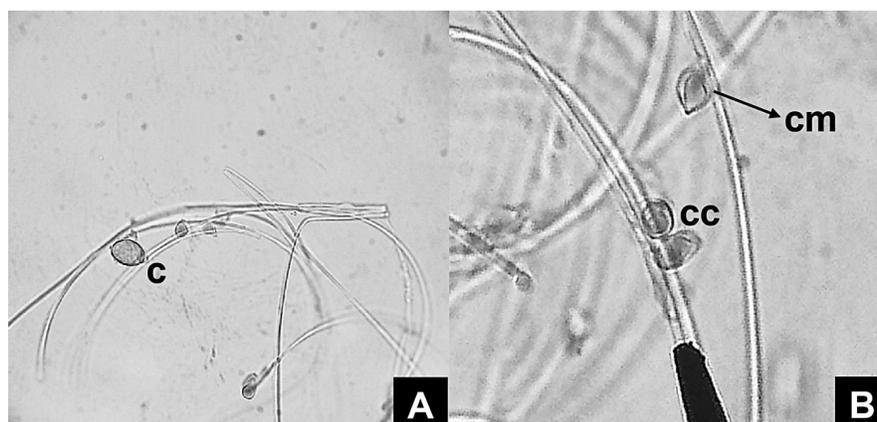


Figura 6. Célula conidiógena solitaria de morfología elíptica (c). Conidios de *Hirsutella* dispuestos en pares (cc). Capa mucilaginoso externa rodeando el conidio (cm). Hifas de *Hirsutella* (A y B) (100X).

Efectos patogénicos de *Hirsutella* sobre la cochinilla *P. citri*

El dimorfismo sexual ha alcanzado niveles muy avanzados en *P. citri*. Las diferencias morfológicas comienzan a ser evidentes en los periodos finales del estadio larval. Las hembras adultas no poseen alas, a diferencia del macho, y pueden llegar a tener un peso 90 veces superior a éste, además son capaces de alcanzar una longevidad de más de 100 días si no se aparean. Por el contrario, el macho adulto es un díptero neometabólico de vida corta, que no se alimenta durante la época de apareamiento. Además de ello, requiere de 1 a 2 días para completar la maduración sexual y el desarrollo de filamentos cerosos para ser capaz de volar y responder a las feromonas sexuales durante la reproducción (Da Silva et al., 2013).

En los individuos observados, la hembra se caracterizó por presentar un cuerpo ovalado, blando y con un tamaño promedio que rondaba los 3 mm de largo; su coloración era amarillenta y se encontraba cubierta por un polvo ceroso blanco. El macho, a diferencia de la hembra, presentaba un cuerpo más pequeño (1 mm, aproximadamente) de color amarillento y con dos largos filamentos en el extremo posterior del abdomen similares a alas (figura 7) (Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas, 2015).

Se evidenció la presencia de huevos depositados en un ovisaco cuyo aspecto se asemejaba al de una masa algodonosa. Los huevos eran ovales y de color amarillo claro. Por su parte, las ninfas recién nacidas eran móviles, ovales, aplanadas y de color amarillo pálido (figura 8). Todos los individuos se aislaron de la cara abaxial de hojas de *C. papaya*. Se observó, además, la producción de excrecencias líquidas azucaradas atrayentes de hormigas.

Los resultados del bioensayo de patogenicidad se pueden observar en el cuadro 2:

Cuadro 2. Resultados del bioensayo de patogenicidad de *Hirsutella* sobre adultos de *P. citri* al sexto día de haberse iniciado la prueba.

Repetición	Muertos	Vivos	Total	% P
1	18	2	20	90,0
2	11	3	14	78,6
3	10	1	11	90,9
Control	1	6	7	14,3

Los porcentajes de patogenicidad de *Hirsutella* frente a la plaga al sexto día de haberse aplicado la solución conidiógena fueron altos (90%, 78,6% y 90,9%), con un promedio de 86,5% en comparación al control, que fue de 14,3%. Los porcentajes de mortalidad de 84,14% obtenidos por Demirci et al. (2011b) con adultos de *P. citri* después de seis días de haber sido inoculados con el hongo entomopatógeno *Isaria farinosa* fueron similares al promedio obtenido en el presente estudio, lo que demuestra el efecto de las toxinas y enzimas que participan en la interrelación patógeno-hospedero según Rosas (2003).

Los postulados de Koch (Schönbach, 2013) se demostraron desde la identificación y aislamiento del hongo hasta la aplicación del bioensayo de patogenicidad in vitro.

La figura 9 muestra el resultado obtenido del bioensayo de patogenicidad aplicado sobre *P. citri* con tres repeticiones y un control. En 1 y 3 se observa el recubrimiento generado por el micelio blancuzco y afelpado de *Hirsutella* sobre el dorso de *P. citri*, mientras que en 2 se aprecia el

desarrollo de hifas sobre el tegumento de la cochinilla sin cubrirlo por completo. A diferencia del tratamiento anterior, el control (c) presentó una mortalidad poco significativa, según se detalló anteriormente. En (c) se observa un individuo de *P. citri* sano como parte de dicho tratamiento.

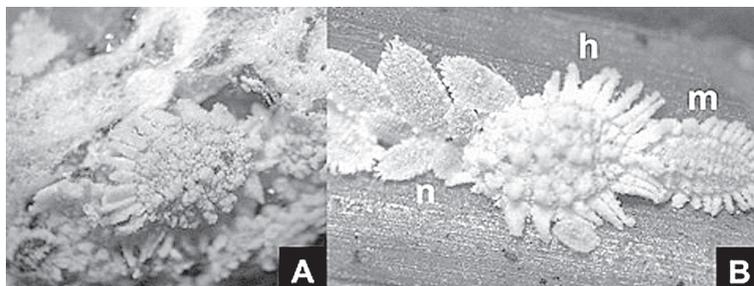


Figura 7. Hembra de *P. citri* depositando huevos sobre un ovisaco (A) (30X). Morfología diferencial (B) (30X) entre ninfas (n), hembra (h) y macho (m) de *P. citri* sobre muestras de tejido vegetal.

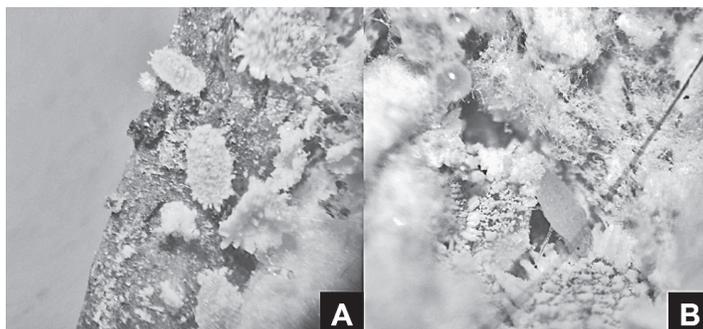


Figura 8. Ninfas de *P. citri* de morfología oval, aplanada y de color amarillo pálido (A) (30X). Ninfa recién nacida a partir de un ovisaco algodonoso (B) (30X).

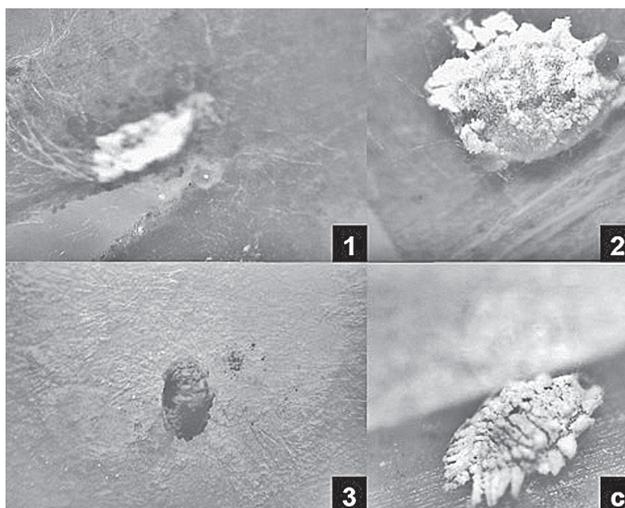


Figura 9. Resultado del bioensayo de patogenicidad aplicado sobre *P. citri*. Las imágenes 1, 2 y 3 muestran el efecto patogénico de *Hirsutella* a los seis días de haberse asperjado la solución conidiógena sobre cochinillas de *P. citri*. Se evidencia en dichos casos el cubrimiento micelial sobre el tegumento de la cochinilla. La imagen C corresponde al tratamiento control. (30X).

A diferencia de lo mencionado anteriormente por Sánchez et al. (2012) con respecto al lento desarrollo de *Hirsutella*, los resultados obtenidos con el bioensayo de patogenicidad reafirman que la presencia y abundancia del hospedero tienen un nivel de influencia muy significativo, tanto en el crecimiento de *Hirsutella* como en su capacidad biocontroladora (Micali et al., 2014).

Estos resultados demuestran que *Hirsutella* posee un alto potencial para ser utilizado en programas de manejo integrado de plagas que busquen controlar *P. citri* y otras especies importantes como *Tetranychus urticae* y *Diaphorina citri*, entre otras; paralelamente al creciente desarrollo de herramientas biológicas modernas. La integración de estrategias de control biológico basadas en el accionar de los hongos entomopatógenos constituye una herramienta valiosa para Costa Rica desde un punto de vista técnico-ambiental, en aras de promover la reducción de los insecticidas que producen contaminación.

Conclusiones

Mediante el presente trabajo se demostró la capacidad biocontroladora que el hongo *Hirsutella* posee sobre cochinillas adultas de *P. citri*, al obtenerse porcentajes de patogenicidad altos en condiciones simuladas de laboratorio. Además, se logró caracterizar al hongo en su estado natural, tanto macro como microscópicamente.

Las diferencias concernientes al dimorfismo sexual que presenta la cochinilla fueron examinadas y señaladas, permitiendo respaldar la información existente en la literatura acerca del tema. Junto con ello, el análisis y estudio morfológico de *P. citri* permitió describir con mayor detalle las estructuras sobre las cuales se desarrolla el micelio de *Hirsutella* posterior al contacto patógeno-hospedero.

Hirsutella demostró tener una capacidad biocontroladora significativa para el control de insectos importantes como *P. citri*, útil para fomentar un manejo compatible con los programas de manejo integrado de plagas. El conocimiento de los materiales activos que participan en la relación patógeno-hospedero debe mejorarse, con el objetivo de entender no solo su configuración sino también su conducta ante la influencia de factores ambientales importantes.

Se recomienda, para efectos de una investigación posterior, estudiar la patogenicidad de *Hirsutella* sobre estadios larvales de *P. citri*, así como optimizar el ciclo biológico de la especie para que sea posible correlacionar las diversas etapas de crecimiento con los efectos biocontroladores que se derivan de cada uno de ellos, obteniendo de esa manera información de la etapa más eficiente para aplicar en biocontrol de plagas.

Bibliografía

- Da Silva, E., Branco, M., Mendel, Z. & Franco, J. (2013). Mating behavior and performance in the two cosmopolitan mealybug species *Planococcus citri* and *Pseudococcus calceolariae* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Journal of Insect Behavior*, 26(3), 304-320. doi: 10.1007/s10905-012-9344-6
- Demirci, F., Mustu, M., Kaydan, M. & Ülgentürk, S. (2011a). Effects of some fungicides on *Isaria farinosa*, and in vitro growth and infection rate on *Planococcus citri*. *Phytoparasitica*, 39(4), 353-360. doi: 10.1007/s12600-011-0168-2
- Demirci, F., Mustu, M., Kaydan, M., & Ülgentürk, S. (2011b). Laboratory evaluation of the effectiveness of the entomopathogen *Isaria farinosa* on citrus mealybug, *Planococcus citri*. *Journal of Pest Science*, 84(3), 337-342. doi: 10.1007/s10340-011-0350-9
- Gobierno de la Rioja-Consejería de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente. (2012). *Virosis en vid*. Obtenido de https://www.larioja.org/upload/documents/717557_201204_PrincipalesVirosis_Vid.pdf.
- Micali, F., Barbosa, E. & Fazzio, R. (2014). The role of native vegetation on infective rates of *Clacarus heveae* (Acari: Eriophyidae) by *Hirsutella thompsonii* (Ascomycota: Ophiocordycipitaceae). *Experimental and Applied Acarology*, 63(2), 157-169.

- Rosas, J. (2003). *Actividad biológica de los exudados y filtrado crudo de Hirsutella thompsonii Fisher (CepaHtM120I) sobre Tetranychus urticae Koch y otros artrópodos*. Colima: Universidad de Colima, Área de Biotecnología.
- Sánchez, S., Casique, R., Bidochka, M., Reyes, A. & López, I. (2011). Pathogenicity of *Hirsutella citriformis* (Ascomycota: Cordycipitaceae) to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) and *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *Florida Entomologist*, 94(3), 703-705.
- Schönbach, C. (2013). *Koch's postulates*. En W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, K. Cho & H. Yokota (Eds.), *Encyclopedia of Systems Biology*, (pp. 1086-1087). New York: Springer. doi: 10.1007/978-1-4419-9863-7_746
- Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. (Junio, 2015). *Planococcus citri*. Obtenido de <http://www.sinavimo.gov.ar/plaga/planococcus-citri>
- Toledo, A., Simurro, M. & Balatti, P. (2013). Morphological and Molecular Characterization of a Fungus, *Hirsutella* sp., isolated from planthoppers and psocids in Argentina. *Journal of Science*, 13. Art. 18.
- Vacante, V. (2010). *Citrus mites: Identification, Bionomy and Control*. Oxford: CABI Publishing.
- Van der Geest, L., Elliot, S., Breeuwer, J. & Beerling, E. (2000). Diseases of mites. *Experimental and Applied Acarology*, 24, 497-560.
- Verena, L., Mizell, R. & Boucias, D. (2011). Transmission of the Mycopathogen, *Hirsutella* spp. to Nymphs and Adults of the Glassy-Winged Sharpshooter, *Homalodisca vitripennis* (= *Coagulata*), in the Greenhouse. *Florida Entomologist*, 94(1), 106-108.