

# CAPÍTULO III IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y PATOGENICIDAD DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Paecilomyces cateniannulatus* AISLADO DE *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE) EN EL ESTADO DE RÍO GRANDE DEL SUR - BRASIL

María L. San Román<sup>1</sup>; Carlos F. Wilcken<sup>1</sup>; Ana C. Firmino<sup>1</sup>; Edson L. Furtado<sup>1</sup>

## 1. INTRODUCCIÓN

El área de plantación de eucalipto en Brasil ha alcanzado las 5.102.103 ha en 2012 según la Asociación Brasileira de Forestadores (ABRAF, 2013). En los últimos años, nuevas plagas han sido detectadas, amenazando la productividad de las plantaciones. Entre éstas se encuentra la chinche del eucalipto *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). Esta plaga es considerada especie invasora en varios países, estando presente en África (Sudáfrica y Zimbawe), América del Sur (Argentina, Uruguay, Brasil, Chile y Paraguay) y Europa (Italia) (Jacobs y Nesar, 2005; Carpintero y Dellapé, 2006; Wilcken *et al.*, 2010; Martínez y Bianchi, 2010; Laudonia y Sasso, 2012).

En Brasil *T. peregrinus* fue detectado por primera vez en el 2008 y rápidamente se transformó en un problema. Este insecto cuando ataca plantas de eucalipto reduce su productividad, disminuyendo el área foliar. Las ninfas y adultos se alimentan succionando savia, provocando el plateado de las hojas, que evoluciona a clorosis o bronceado, llevando finalmente a la defoliación de los árboles. Entre las estrategias para su control se encuentra el control químico, generalmente utilizado cuando ocurren brotes poblacionales de esta plaga. Sin embargo su uso es limitado, no siendo recomendado por el riesgo ambiental, la falta de ingre-

dientes activos registrados y las restricciones de uso de plaguicidas no permitidos por las certificadoras nacionales e internacionales. Dentro del control biológico con enemigos naturales, fue reportada la ocurrencia de *Cleruchoides noackae* Lin & Huber (Hymenoptera: Mymaridae) parasitando huevos de este insecto, en Sydney (Australia) (Lin *et al.*, 2007). *Cleruchoides noackae* fue introducido por primera vez en Brasil en noviembre de 2011. Otra alternativa es el control microbiano utilizando organismos entomopatógenos. En Brasil fue reportada la ocurrencia del hongo *Zoopthora radicans* (Entomophthorales) afectando ninfas y adultos de *T. peregrinus* en plantaciones clonales de eucalipto en el estado de San Pablo en 2009 (Mascarin *et al.*, 2012). Más allá del hallazgo, este grupo de hongos resulta difícil de multiplicar a escala comercial para su uso a campo (Alves, 1998). Entre los principales hongos entomopatógenos empleados para el control de insectos se encuentran los hongos pertenecientes a la subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, con géneros tales como *Paecilomyces*, *Beauveria*, *Metarhizium* y *Lecanicillium* (Alves, 1998). Los hongos del género *Paecilomyces* penetran normalmente vía tegumento, usando la presión física y la acción química a través del apresorio de penetración. Han sido observados afectando lepidópteros, coleópteros, hemípteros y ortópteros. Existen reportes de aislamientos de *Paecilomyces* spp. en *Stenoma decora*

<sup>1</sup> Departamento de Producción Vegetal / Defensa Fitosanitaria, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad Estadual de San Pablo (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

(Lepidoptera: Stenomidae) en Bahía, *Eupseudosoma* spp. (Lepidoptera: Arctiidae) en San Pablo y en adultos de *Lagriia villosa* (Coleoptera: Lagriidae), en Mato Grosso (Alves, 1998).

En estudios realizados en áreas afectadas por *T. peregrinus* fueron observadas ocurrencias epizooticas en plantaciones de eucaliptos en la región de Alegrete, Rio Grande do Sul. A partir de insectos muertos en esa epizootia, se aislaron algunos hongos potencialmente entomopatógenos, siendo uno de ellos identificado como del género *Paecilomyces*, todavía no registrado como patógeno de *T. peregrinus*. Este trabajo tuvo como objetivo realizar la caracterización morfológica, biológica, patogénica y molecular de *Paecilomyces* spp. aislado de *T. peregrinus*. También se realizó un estudio de infección del insecto, visualizado por medio del uso de microscopía electrónica de barrido.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### *Colecta de insectos y aislamiento del hongo*

El estudio fue realizado en el Laboratorio de Control Biológico de Plagas Forestales de la Facultad de Ciencias Agronómicas (FCA), Universidad Estadual Paulista - Campus de Botucatu. Fueron colectados individuos de *T. peregrinus* muertos en epizootia en las plantaciones de eucaliptos de la empresa Stora Enso, en la región de Alegrete, Río Grande do Sul. La colecta de insectos fue realizada en noviembre de 2011, directamente de la copa de los árboles. Se colectaron individuos muertos y moribundos con presencia de micelio sobre el cuerpo, siendo ésta la principal característica para la selección de las muestras (Figuras 1 y 2). Para determinar el agente patógeno causante de mortalidad en los insectos se siguió la metodología basada



**Figura 1.** A. *T. peregrinus* sobre hoja de eucalipto en el campo. B. *T. peregrinus* enfermos (1) y sanos (2), colectados en epizootias a campo.



**Figura 2.** *T. peregrinus* con extrusión de micelio de *Paecilomyces* sp. por las articulaciones y orificio anal.

en los postulados de Koch. Los insectos colectados fueron acondicionados en cámaras húmedas para propiciar la esporulación de los hongos. Después de 24 horas los insectos fueron sometidos a esterilización con solución de hipoclorito de sodio al 2%, alcohol al 70%, agua esterilizada y posteriormente colocados en medio agar-agua en placas de Petri. Después de la observación del crecimiento de la colonia, ésta fue repicada en medio PDA (papa-dextrosa-agar) para su posterior identificación.

### **Obtención de cultivos monospóricos**

Para la obtención de cultivos monospóricos, las colonias obtenidas de los aislamientos fueron lavadas con agua destilada esterilizada y la concentración de las suspensiones de esporas fue estandarizada en  $10^2$  esporas/mL. Se colocaron 100  $\mu$ l de la suspensión de esporas en placas conteniendo medio agua/agar enriquecido con 0,005% de oxitetraciclina. Las esporas fueron individualizadas y visualizadas en microscopio óptico, utilizando cámara de Neubauer para el conteo y posterior dilución a la concentración padrón ( $10^2$  esporas/mL). Posteriormente, las esporas individuales fueron transferidas a medio PDA para la formación de las colonias.

### **Test de patogenicidad en *T. peregrinus***

El objetivo del test fue evaluar el potencial entomopatogénico de los hongos aislados. Para la realización de los bioensayos se utilizaron insectos sanos de *T. peregrinus*, obtenidos de la cría en laboratorio. A partir del aislamiento puro del hongo, obtenido a partir de los insectos, se escogieron algunas placas para hacer los test de patogenicidad. Se utilizó un diseño experimental enteramente al azar con dos tratamientos (patógeno y testigo) y 4 repeticiones. Cada repetición estaba compuesta por una placa de Petri conteniendo gel estéril y un disco de hoja de *Eucalyptus camaldulensis*, en el cual se colocaban 10 insectos (ninfas y adultos) de *T. peregrinus*.

El hongo fue pulverizado con una Torre de Potter con un volumen de 3 mL de suspensión de esporas para cada aislamiento aplicada a 15 lb/pul<sup>2</sup> de presión y con una concentración de  $10^6$  esporas/mL (diluido con agua estéril y coadyuvante Tween 20 al 0,02%). Para el testigo fue realizada la aspersion utilizando agua destilada estéril con Tween al 0,02%. Después de la inoculación las placas fueron colocadas en cámara BOD a 25°C y un fotoperíodo de 12 horas de luz/oscuridad. Se realizaron evaluaciones diarias del experimento contando y retirando los insectos muertos hasta 6 días o hasta alcanzar la mortalidad total en el tratamiento. Los insectos muertos fueron colocados en cámara húmeda para reaislar el hongo causante de la mortalidad y para confirmar que se trató del aislamiento inicialmente aplicado.

### **Proceso de colonización del hongo en el insecto**

Para complementar los estudios de patogenicidad se realizó un seguimiento de la colonización del hongo sobre el cuerpo del insecto. Para esto fue pulverizada una suspensión conteniendo  $10^6$  esporas/mL directamente sobre los insectos vivos. Como testigo la pulverización fue hecha con agua destilada estéril.

Después de la inoculación, conforme a la metodología descrita para el test de patogenicidad, los insectos tratados fueron colectados en intervalos de tiempo predeterminados (2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 horas) y fijados en solución de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0%, tampón fosfato 0,05M, pH 7,2), por un período mínimo de 24 horas a partir de la muerte de los insectos. Posteriormente, las muestras fueron preparadas y analizadas en un microscopio electrónico de barrido LEO435-VP. Se evaluaron cinco insectos para cada intervalo de tiempo predeterminado. La preparación y observación de las muestras fue realizada en el Centro de Microscopía Electrónica, localizada en la ESALQ/USP.

### **Caracterización biológica del crecimiento**

La caracterización cultural de los aislamientos se basó en la velocidad de crecimiento micelial, color de la colonia y estructuras producidas en medio de cultivo PDA. A partir de los cultivos, se obtuvieron discos de 6 mm de diámetro de los bordes de la colonia cultivada por 10 días en medio PDA y los mismos fueron transferidos al centro de nuevas placas de Petri utilizando el mismo medio. Posteriormente al repique, las cepas aisladas fueron incubadas a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  y un fotoperíodo de 12 h luz/oscuridad. La evaluación del crecimiento de la colonia fue realizada a diario, midiendo el diámetro de la misma en la placa Petri con regla milimetrada. La velocidad media de crecimiento micelial fue utilizada para los análisis estadísticos. El experimento fue conducido siguiendo un diseño al azar con cinco repeticiones por tratamiento, donde cada unidad experimental comprendía una placa.

### **Caracterización morfológica**

Se determinó el tamaño de las esporas producidas por los aislamientos mediante el sistema de video cámara Opton, modelo TA-0124XS, instalada en microscopio óptico. La imagen fue transmitida a un computador y analizada por medio del programa EDN-2. Para la calibración del equipamiento se utilizó una lámina micrografada (Carl Zeiss®). Se evaluaron 30 esporas de cada aislamiento.

### **Caracterización molecular**

La extracción de ADN del aislamiento seleccionado en el experimento de patogenicidad se realizó conforme a una adaptación del método desarrollado por Murray y Thompson (1980). Para la caracterización molecular se estudió la región ITS del ADN ribosomal y parte del gen del factor de elongación (EF-1 $\alpha$ ). La amplificación de la región ITS del ADN ribosomal del hongo seleccionado se realizó utilizando los pares de primers

ITS 1 e ITS 4 que generan un fragmento de aproximadamente 750 pares de bases. Para la PCR, se emplearon 3  $\mu\text{l}$  del ADN total extraído (30 ng), tampón 1X de la enzima GoTaq ADN polimerasa (Promega®), 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM DNTP, 0,2  $\mu\text{M}$  de cada primer y 1,25 U de GoTaq DNA polimerasa (Promega®), ajustando el volumen de la reacción para 50  $\mu\text{l}$  con agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC). En el caso del PCR relacionado con el factor de elongación fue usado el primer EF1, que genera un fragmento de aproximadamente 1300 pares de bases. Para el PCR se emplearon 3  $\mu\text{l}$  de ADN total extraído (30 ng), tampón 1X de la enzima GoTaq DNA polimerasa (Promega®), 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTP, 1  $\mu\text{M}$  del primer y 1,25 U de GoTaq DNA polimerasa (Promega®), ajustando el volumen de reacción para 50  $\mu\text{l}$  con agua tratada con DEPC.

Los fragmentos de ADN amplificados fueron visualizados en gel de agarosa coloreado con bromuro de etidio y observados bajo luz UV. Previo a su secuenciación los fragmentos amplificados fueron purificados utilizando 100  $\mu\text{l}$  del producto de SV Gel y PCR Clean Up Sistem (Promega®). Las secuencias obtenidas fueron alineadas y procesadas con el programa Mega 5.05 para posteriormente construir árboles filogenéticos de los aislamientos de *Paecilomyces*, utilizando el método "p-distance" (Tamura, 1992). En cada caso fue realizado un "bootstrap" con 10.000 réplicas.

Los resultados de PCR fueron comparados con las secuencias depositadas en el GenBank, códigos de acceso BankIt1525016 *Paecilomyces* JQ957848 (región ITS); BankIt1525018 *Paecilomyces* JQ957849 ( $\alpha$ -elongase).

## **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

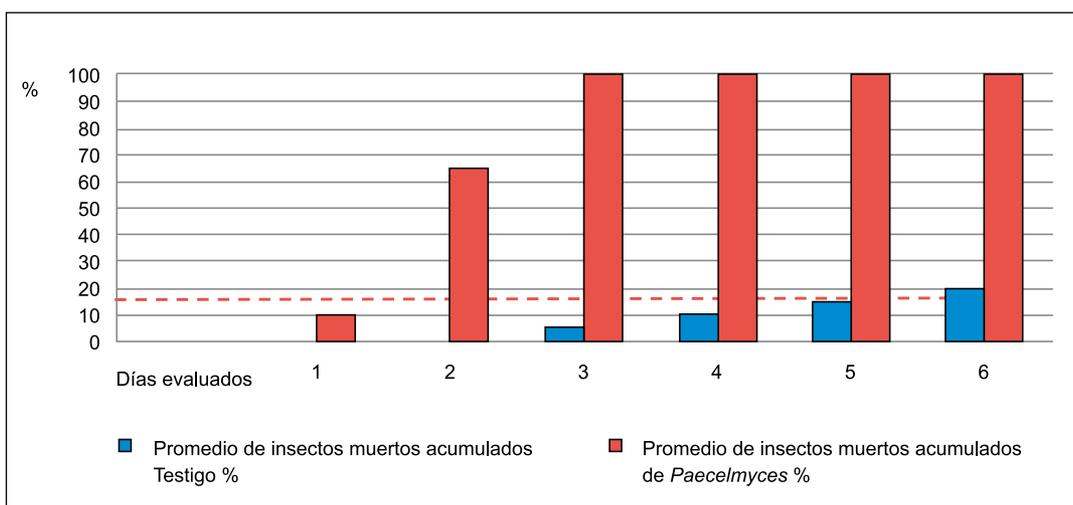
A partir de los insectos colectados se obtuvo una colonia con características típicas de *Paecilomyces* spp., que al ser inoculada en insectos sanos se mostró altamente patogénica a la chinche del eucalipto. En

los bioensayos realizados en los test de patogenicidad se verificó su capacidad de causar mortalidad por encima del 50% de los insectos en dos días posteriormente a la inoculación, en tanto que a partir de los tres días fue observada la mortalidad del 100% de los insectos inoculados (Figura 3). A pesar de observarse mortalidad de insectos 24 horas después de la inoculación, la observación en microscopio electrónico de barrido permitió comprobar que las esporas del hongo inician su germinación y penetración sobre el cuerpo del insecto a las 4 horas después de la inoculación (Figura 4). A las 24 horas de la inoculación, fue posible observar la colonización del cuerpo del insecto en casi su totalidad, corroborando los datos de los bioensayos de patogenicidad (Figura 4).

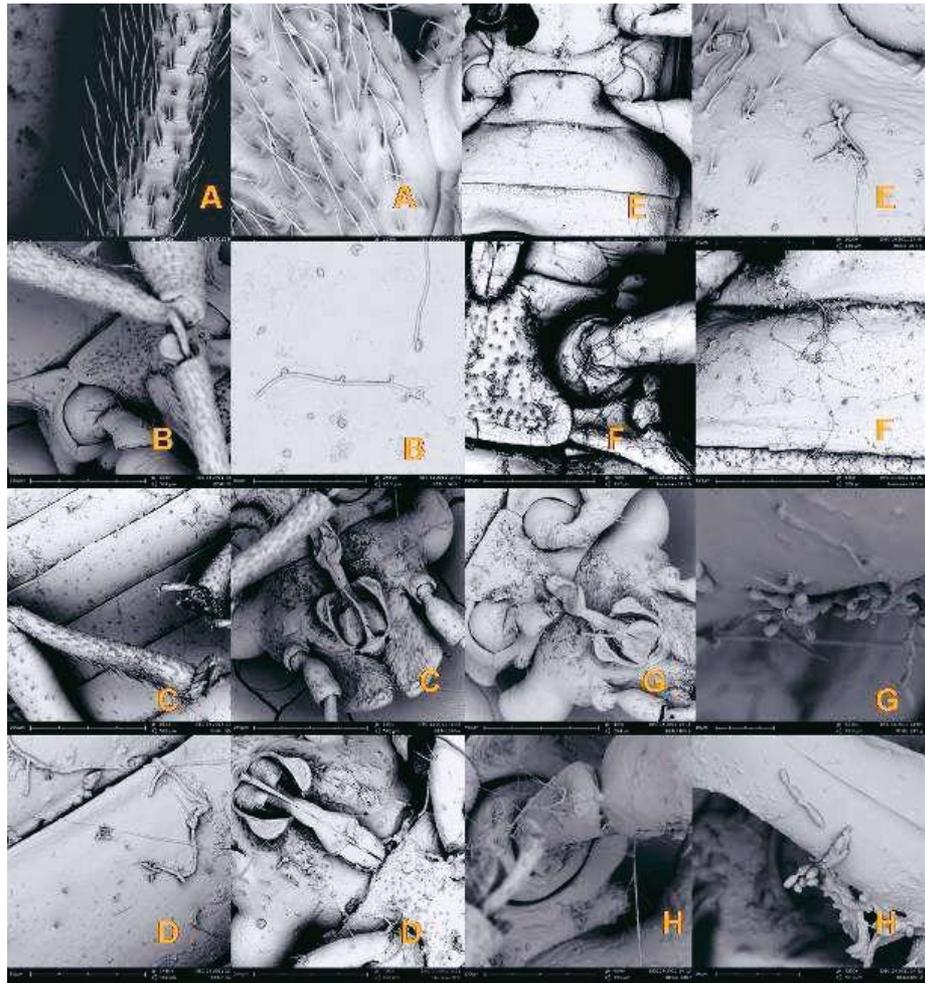
Según la literatura, la patogenicidad de algunas especies de *Paecilomyces* puede variar conforme a la forma de propágulo usada en la inoculación de este hongo (Fragues *et al.*, 1994). Estos autores, estudiando la capacidad de infección de los propágulos de *P. fumosoroseus* sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) observaron que cuando la suspen-

sión de esporas usadas para la inoculación se basa en fragmentos de hifas, conidios germinados y conidios no germinados, existen diferencias en el número de insectos muertos, ya que las inoculaciones con esporas germinadas y con hifas del hongo fueron más agresivas que con conidios no germinados. Comparando la bioactividad de blastosporas de *P. fumosoroseus* y conidios de *Beauveria bassiana*, Fragues *et al.* (1994) mostraron que las blastosporas fueron 4 veces más eficaces en infectar y matar ninfas de la mosca blanca *Bemisia argentifolli* (Hemiptera: Aleyrodidae). En base a estos resultados se podría asumir que la cantidad de individuos de *T. peregrinus* muertos a las 24 h podría ser mayor si éstos fueran inoculados con esporas germinadas e hifas del hongo.

En base a las características biológicas y morfológicas de los cultivos y a las secuencias de ADN extraídas del hongo, éste fue identificado como *Paecilomyces cateniannulatus* Liang. El hongo estudiado mostró un crecimiento micelial de 10,7 mm/día. La colonia tenía coloración blanca en la parte superior y levemente rosada en la cara posterior de la placa en medio de cultura PDA (Figura 5). El



**Figura 3.** Mortalidad de ninfas y adultos de *T. peregrinus* a lo largo del tiempo después de la inoculación con esporas de *Paecilomyces* spp. en laboratorio (temperatura 25 ± 1 oC, fotoperiodo de 12 h luz/oscuridad).



**Figura 4.** Evolución de la colonización del hongo *Paecilomyces cateniannulatus* en el cuerpo de *T. peregrinus* (A = 2 hs, B = 4 hs, C = 8 hs, D = 12 hs, E = 24 hs, F = 48 hs, G = 72 hs, H = 96 hs).

hongo presentó fiálides agrupadas y globosas en posición basal, comprimidas y alargadas al final, donde se pudieron observar los conidios

(Figura 5). Los conidios son pequeños y ova-les con dimensiones de 2,6 (2,0-3,5  $\mu\text{m}$ ) x 1,6 (0,8-2,5  $\mu\text{m}$ ) largo y ancho respectivamente.



**Figura 5.** Fiálides y conidios de *P. cateniannulatus* (A) y colonia de *P. cateniannulatus* (B).

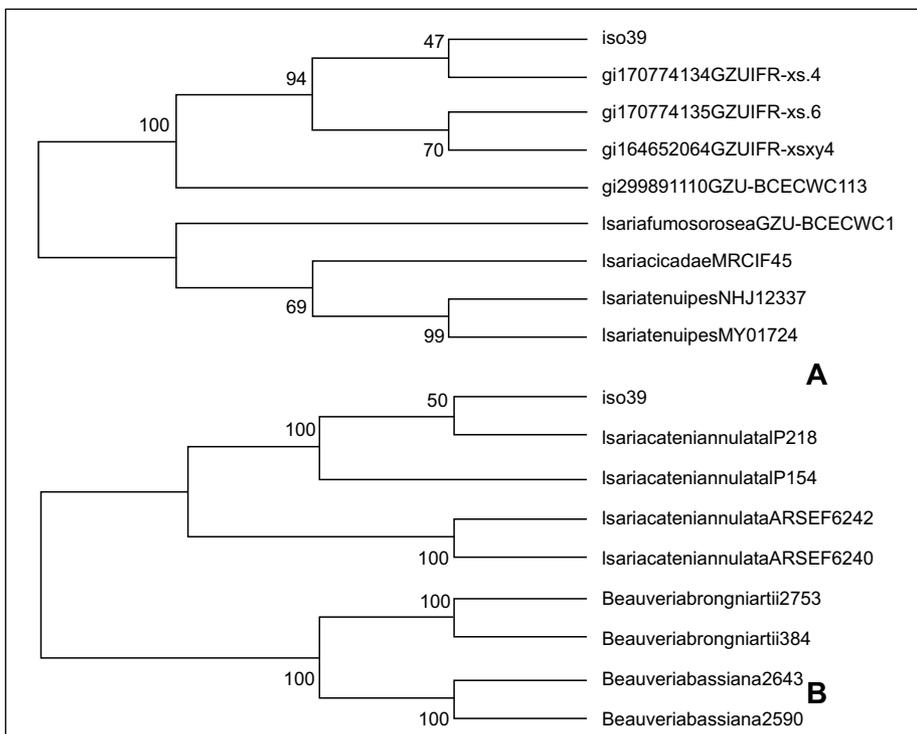
Liang *et al.* (2005), en un trabajo realizado en China donde caracterizaron morfológicamente y molecularmente especies de *Paecilomyces*, describen a *P. cateniannulatus* con características similares a las obtenidas en este trabajo, donde las colonias típicas tienen coloración blanca e hifas aéreas. Las fiáldes poseen una porción basal globosa o elipsoidal y una proyección fina y larga. Presenta así mismo conidios pequeños, ovales a elipsoidales de 2 a 3,5 µm × 1-2,5 µm. En ese estudio los autores reportan además a *P. cateniannulatus* como entomopatógeno para algunos lepidópteros.

El presente trabajo constituye el primer reporte de *P. cateniannulatus* para Brasil como entomopatógeno de *T. peregrinus*.

*Paecilomyces cateniannulatus* puede ser fácilmente distinguido de especies estrechamente relacionadas, tales como *P. fumosoroseus* y *P. farinosus*, por la coloración blanca de la colonia y cadenas de conidios imbricados. La variación genética

de 12 especies de *Paecilomyces* por RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ha sido relatada por Huang *et al.* (2002). Los resultados experimentales muestran que las semejanzas entre *P. cateniannulatus* y *P. farinosus* son apenas de 26 a 38%. Los test de laboratorio apuntan a la existencia de algunas razas de *P. cateniannulatus* que tienen alta patogenicidad cuando fueron inoculadas en pulgones, nematodos y especies de lepidópteros (Liang *et al.*, 2005).

En base a las secuencias de ADN (Figura 6) el aislamiento de *P. cateniannulatus* (ISO 39) obtenido de *T. peregrinus* presentó 99% de homología de la región ITS de su ADN ribosomal con el de *Isaria cateniannulata* (= *P. cateniannulatus*) GZUIFR-xs.4 (GI170774134) reportado en China. Así mismo la secuenciación de la región del factor de elongación de este mismo aislamiento presentó 99% de homología con *Isaria cateniannulata* (= *P. cateniannulatus*) raza IP 218 (GI323145657) de Brasil.



**Figura 6. A)** Árbol filogenético de *P. cateniannulatus* basado en la región ITS-5.8S rDNA. **B)** Árbol filogenético de *P. cateniannulatus* basado en el factor de elongación.

Los análisis filogenéticos apuntan valores de "bootstrap" significativos, encima del 50%, que confirman la identidad de este hongo, separando de manera clara *P. cateniannulatus* de otras especies de *Paecilomyces* (Figura 6). Como se observa en el árbol filogenético montado en base a las secuencias del factor de elongación, los aislamientos brasileros (IP) formaron un grupo bien definido y diferente de los aislamientos de *P. cateniannulatus* de China (ARSEF).

#### 4. CONCLUSIONES

- Fue identificada la especie de *Paecilomyces cateniannulatus* infectando *T. peregrinus*, siendo ésta la primera ocurrencia de este hongo entomopatógeno sobre esta plaga forestal exótica en Brasil.
- *P. cateniannulatus* es capaz de penetrar el cuerpo del insecto a partir de las 4 horas posteriores a la inoculación, principalmente por las aberturas naturales del insecto.

#### 5. BIBLIOGRAFÍA

**ABRAF.** 2013. Anuário estatístico da Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas: ano base 2011. Brasília Df., 80 p.

**ALVES, S.B.** 1998. Controle microbiano de insetos. Piracicaba. FEALQ. 1163 p.

**CARPINTERO, D.L.; DELLAPÉ, P.M.** 2006. A new species of *Thaumastocoris* Kirkaldy from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae). *Zootaxa* 1228: 61-68.

**FRAGUES, J.; MANIANINA, N.K.; DELAMAS, J.C.** 1994. Infectivity of propagules of *Paecilomyces fumosus* during *in vitro* Spodoptera frugiperda. *Journal of Invertebrate Pathology* 64: 1973-1978.

**HUANG, B.; YU, C.X.; CHEN, X.L.; FAN, L.I.; MZAND, Z.Z.** 2002. Classification and Identification of species and strains in *Paecilomyces* using RAPD. *Mycosystema* 21: 33-38.

**INGLIS, P.W.; TIGANO, M.S.** 2006. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS Sequences. *Genetics and Molecular Biology* 29: 132-136.

**JACOBS, D.H.; NESER, S.** 2005. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Heteroptera: Thaumastocoridae): a new insect arrival in South Africa, damaging to *Eucalyptus trees*: research in action. *South African Journal of Science* 101: 233-236.

**LAUDONIA, S.; SASSO, R.** 2012. The bronze bug *Thaumastocoris peregrinus*: a new insect recorded in Italy, damaging to *Eucalyptus trees*. *Bulletin of Insectology* 65(1): 89-93.

**LIN, N.Q.; HUBER, J.T.; LA SALLE, J.** 2007. The Australian genera of Mymaridae (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Zootaxa* 1596: 1-111.

**LIANG, Z.Q.; HAN, Y.F.; CHU, H.L.; LIU, A.Y.** 2005. Studies on genus *Paecilomyces* in China I. *Fungal Diversity* 20: 83-101.

**MARTÍNEZ, G.; BIANCHI, M.** 2010. Primer registro para Uruguay de la chinche del eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Delappé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae). *Agrociencia* 14(1): 15-18.

**MASCARIN, G.M.; DUARTE, V.S.; BRAN-DÃO, M.M.; DELALIBERA Jr, I.** 2012. Natural occurrence of *Zoopththora radicans* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) on *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) an invasive pest recently found in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* 110(3): 401-404.

**MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F.** 1980. *Nucleic acids research*, Oxford University Press, United Kingdom.

**TAMURA, K.** 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9: 678-687.

**WILCKEN, C.F.; SOLIMAN, E.P; SÁ, L.A.N.; BARBOSA, L.B.; DIAS; T.K.R.; FERREIRA-FILHO, J.P.; RODRIGUES, R.J.** 2010. Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpenter and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on *Eucalyptus* in Brazil and its distribution. *Journal of Plant Protection Research* 50(2): 201-205.