



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias Forestales

Evaluación de la virulencia de dos cepas de *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare y Gams para el control biológico de *Cinara cupressi* (Buckton).

Patrocinante: Sr. Eladio Rojas P.

Trabajo de Titulación presentado
como parte de los requisitos para optar
al Título de **Ingeniero Forestal**.

CRISTIAN MONTALVA RETAMAL

VALDIVIA
2008

CALIFICACIÓN DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

		Nota
Patrocinante:	Sr. Eladio Rojas	<u>6,8</u>
Co Patrocinante:	Sra Dolly Lanfranco	<u>6,3</u>
Informante:	Srta Mónica Gutiérrez	<u>6,7</u>

El Patrocinante acredita que el presente Trabajo de Titulación cumple con los requisitos de contenido y de forma contemplados en el reglamento de Titulación de la Escuela. Del mismo modo, acredita que en el presente documento han sido consideradas las sugerencias y modificaciones propuestas por los demás integrantes del Comité de Titulación.

Sr. Eladio Rojas

“A Dios y mi familia..
...muchas gracias”

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a Dios por estar conmigo y ayudarme en todo momento.

Muy agradecido con mi patrocinante Eladio Rojas, por guiarme y apoyarme con sabios consejos en esta etapa de mi formación académica y profesional.

Quiero también expresar mis agradecimientos a mi co patrocinante Dolly Lanfranco y a mi informante Mónica Gutiérrez por aportar su experiencia en la corrección de este trabajo de titulación y porque amablemente forman parte de mi comisión evaluadora.

Quiero agradecer a todos los funcionarios del laboratorio Regional SAG Osorno, dado que cada vez que fui a trabajar me atendieron cariñosamente, me apoyaron y aconsejaron durante el trabajo de titulación especialmente a: Eladio Rojas, Mónica Gutiérrez, Oriana Oyarzo, Juan Pablo Andrade, Rodrigo Gallardo, Jessica Pozo, Claudia Asenjo, Raúl Garcés , Denisse Duval y Minie Villarroel.

A toda mi familia, en especial a Margarita, Miguel, Camilo, Maria Consuelo, abuelitos y mi polola Yazmin quienes siempre han estado a mi lado apoyandome, brindandome su amor y fuerza para lograr terminar esta etapa de mi vida.

A todos mis compañeros y amigos que estuvieron conmigo durante esta etapa.

ÍNDICE DE MATERIAS

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Antecedentes generales	2
2.2 Taxonomía del hongo y el insecto	3
2.3 Distribución del hongo y el insecto	3
2.4 Daño que produce el hongo en el insecto	3
2.5 Daño que causa el insecto en el árbol	5
3. DISEÑO DEL ENSAYO	6
3.1 Material	6
3.1.1 <i>Obtención de placas madres de Lecanicillium lecanii</i>	6
3.1.2 <i>Obtención de colonias de Cinara cupressi</i>	7
3.2 Método	7
3.2.1 <i>Evaluación del crecimiento y esporulación de cepas de Lecanicillium lecanii</i>	7
3.2.2 <i>Evaluación de la virulencia de cepas de Lecanicillium lecanii</i>	9
3.2.3 <i>Análisis estadístico</i>	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
4.1 Crecimiento y esporulación de cepas de <i>Lecanicillium lecanii</i>	12
4.2 Virulencia de cepas de <i>Lecanicillium lecanii</i>	15
4.2.1 <i>Tiempo Letal 50 (TL₅₀) para Lecanicillium lecanii cepa Cochamó y Futaleufú</i>	15
4.2.2 <i>Concentración Letal 50 (CL₅₀) para Lecanicillium lecanii cepa Futaleufú</i>	16
5. CONCLUSIONES	18
6. BIBLIOGRAFÍA	19

ANEXOS

1. *Abstract and keywords*

2. Análisis estadísticos de la evaluación del crecimiento y esporulación.

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Cepario de la Unidad de Fitopatología del Laboratorio SAG, Región de los Lagos	6
Figura 2.	Crianza de <i>Cinara cupressi</i> en <i>Cupressus macrocarpa</i> Unidad de Entomología, Laboratorio Regional SAG Osorno, Región de Los Lagos	7
Figura 3.	Esquema del diseño experimental del ensayo de crecimiento y esporulación de las cepas de <i>L. lecanii</i> sobre tres medios de cultivo	8
Figura 4.	Esquema del diseño par determinar el tiempo letal 50 (TL ₅₀) de dos de cepas de <i>L. lecanii</i> sobre poblaciones de <i>C. cupressi</i>	10
Figura 5.	Esquema del diseño para determinar la concentración letal 50 (CL ₅₀) de la cepa Futaleufú de <i>L. lecanii</i> sobre poblaciones de <i>C. cupressi</i>	11
Figura 6.	Diámetro de crecimiento promedio de <i>L. lecanii</i> cepas Futaleufú y Cochamó sobre los medios de cultivo agar Sabouraud (AS), agar malta (AM) y agar papa dextrosa (APD)	12
Figura 7.	Análisis estadístico comparativo (Tukey) del diámetro de crecimiento promedio de <i>L. lecanii</i> cepas Futaleufú (F) y Cochamó (C) a los treinta y tres días de incubación sobre los medios de cultivo Agar Sabouraud, Agar Malta y Agar Papa Dextrosa	13
Figura 8.	Análisis estadístico comparativo (Tukey) de la concentración de conidias producidas por <i>L. lecanii</i> cepas Futaleufú (F) y Cochamó (C) a los treinta y tres días de incubación sobre los medios de cultivo agar Sabouraud, agar malta y agar papa dextrosa.	14
Figura 9.	Tiempo letal 50 (TL ₅₀) en días para poblaciones de <i>C. cupressi</i> tratadas con <i>L. lecanii</i> cepa Cochamó y Futaleufú	15
Figura 10.	Concentración letal 50 (CL ₅₀) de <i>L. lecanii</i> cepa Futaleufú a las 72 horas de aplicación sobre poblaciones de <i>C. cupressi</i> .	17

RESUMEN EJECUTIVO

El pulgón del ciprés *Cinara cupressi* es considerado una de las cien plagas invasoras más importantes del mundo. En Chile se encuentra presente en todo el territorio continental y amenaza el crecimiento y desarrollo de las especies cupresáceas nativas *Austrocedrus chilensis* (D. Don) (Ciprés de la Cordillera) y *Fitzroya cupressoides* (Molina) (Alerce), ambas categorizadas como vulnerables en el libro rojo de la flora terrestre de Chile.

Actualmente, se considera la utilización de parasitoides para su control biológico. Sin embargo, no se ha evaluado la posibilidad de usar hongos entomopatógenos para el manejo de la plaga.

En el presente estudio se evaluó la virulencia, en condiciones de laboratorio, de dos cepas de *Lecanicillium lecanii* mantenidas en el Laboratorio Regional SAG Osorno, para el control biológico de *C. cupressi*. Una de las cepas utilizadas proviene de la comuna de Futaleufú, provincia de Palena y la otra de la comuna de Cochamó, provincia de Llanquihue, ambas de la Región de Los Lagos.

Se determinó el crecimiento y esporulación de ambas cepas del hongo en tres medios de cultivo diferentes: Agar Papa Dextrosa (APD), Agar Sabouraud (AS) y Agar Malta (AM), registrándose diferencias significativas entre el crecimiento y esporulación de las cepas en los distintos medios de cultivo evaluados, alcanzando un mayor crecimiento y esporulación con la cepa Futaleufú en el medio de cultivo AS.

Se evaluó la virulencia de las dos cepas del hongo asperjando conidias sobre una población del áfido *C. cupressi* determinando el Tiempo Letal 50 (TL₅₀) para cada cepa. La cepa Futaleufú resultó más virulenta con un TL₅₀ de 72 horas, siendo este valor menor al obtenido con la cepa Cochamó (84 horas). Posteriormente, se determinó la Concentración Letal 50 (CL₅₀) de la cepa Futaleufú utilizando cinco concentraciones de conidias por ml (1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8) y un testigo con agua destilada estéril. Mediante análisis Probit se determinó un CL₅₀ de $3,7 \times 10^7$ conidias/ml a las 72 horas de evaluación.

Se sugiere que la cepa de *L. lecanii* proveniente de Futaleufú pudiera ser un efectivo biocontrolador de *C. cupressi* y se recomienda su evaluación bajo condiciones de campo.

1. INTRODUCCIÓN

Chile posee una superficie de 13,43 millones de hectáreas de bosque nativo (INFOR, 2008), de los cuales el tipo forestal Alerce (*Fitzroya cupressoides*) (Molina) cuenta con 263,191 hectáreas y el tipo forestal Ciprés de la Cordillera (*Austrocedrus chilensis*) (D.Don) con 44,996 hectáreas (CONAF *et al.*, 1999), lo que representa el 2,29% del total de la superficie del bosque nativo en Chile. Según el Libro Rojo de la Flora Terrestre de Chile (Benoit, 1989), las especies *A. chilensis* y *F. cupressoides* se encuentran en la categoría de vulnerables, además esta última especie fue declarada monumento natural a través del Decreto Supremo N°490, Chile (1976).

Desde el punto de vista sanitario, el año 2004 se manifestó daño por el áfido exótico identificado como *Cinara cupressi* (Buckton) en ciprés de la cordillera, debido a esto se evaluó la mortalidad determinándose que en lugares infestados existía hasta un 30% de muerte de los árboles (CONAF, 2004). El pulgón del ciprés se considera una de las cien plagas invasoras más importantes del mundo y existen antecedentes durante la década de 1980, donde su introducción en África, provocó la casi extinción de cipreses nativos de ese continente (SAG, 2005).

Entre las medidas de control del pulgón, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) consideró la introducción del enemigo natural *Pauesia juniperorum* (Stary). Sin embargo, las introducciones en Chile no resultaron en establecimiento del parasitoide. Afortunadamente, como producto de las actividades de monitoreo de la plaga realizadas por el SAG se encontró dicho controlador tanto en la Región de Valparaíso como en la Región Metropolitana, lo que dio inicio al repique del controlador hacia nuevas áreas con ausencia de éste. El año 2007 se encontró el áfido atacando alerce, tal como se sospechaba por investigaciones previas donde la especie forestal se encontraba en riesgo potencial.

Dada la importancia de estos tipos forestales por su categoría en su estado de conservación y debido a que este insecto actualmente se encuentra distribuido en todo el país, demostrando su gran capacidad invasora, se considera la evaluación de otros agentes de control, específicamente *Lecanicillium lecanii* (Zimm), el cual ha sido encontrado produciendo epizootias en el sur de Chile (E. Rojas, comunicación personal)*. Por ello, se evaluará la virulencia de dos cepas del hongo, tal como ha sido demostrado que corresponde a un controlador efectivo en poblaciones de otros áfidos entre los que se incluyen *Cinara atlantica* (Wilson) en Brasil (Pereira *et al.*, 2005) y *Aphis gossypii* (Glover) en Korea (Vu *et al.*, 2007).

En función de lo anterior, los objetivos específicos de este estudio son los siguientes:

- Evaluar el crecimiento y esporulación de dos cepas de *L. lecanii* en diferentes medios de cultivo.
- Evaluar la virulencia de las cepas de este hongo a través de la determinación del tiempo letal 50 (TL₅₀) y la concentración letal 50 (CL₅₀).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes generales

Lecanicillium lecanii es un hongo entomopatógeno principalmente de pulgones (Hem: Aphididae) y mosquitas blancas (Hem: Aleyrodidae) (Milner, 1997). Se han desarrollado cepas de *L. lecanii* altamente virulentas y epizoóticas como agentes biocontroladores (Hall, 1981; Hsiao *et al.*, 1992; Yokomi y Gottwald, 1988) de ciertos insectos. Por el momento, Mycotal y Vertalec son productos comerciales de este hongo entomopatógeno usado contra mosquitas blancas y áfidos, respectivamente (Hall, 1984; Allendes, 2007). Comercialmente este hongo se ha utilizado desde 1990 (Lenteren, 2003). *L. lecanii* también es un micoparásito de royas (Allend, 1982; Spencer y Atkey, 1981).

El año 1898, en la isla de Java, Zimmerman descubrió el hongo identificado como *Cephalosporium lecanii*. Sin embargo, hacia el año 1939 el mismo hongo fue reportado como *Verticillium lecanii* por Viegas, quien se refirió al característico halo blanco formado por éste sobre el insecto *Coccus viridis* (Green) (Hem: Coccidae) (Samson y Rombach, 1985, Carreño, 2003). Zare y Gams en el año 2001 propusieron que los aislamientos de *Verticillium lecanii* sean renombrados como pertenecientes al género *Lecanicillium*.

Según Dajoz (2001) la familia de *Cináridos* son insectos monófagos de gran tamaño pudiendo alcanzar 8 mm de longitud. Estos viven sobre las coníferas y se les encuentra en colonias numerosas sobre las ramas pequeñas. Heie (1995) y Footitt y William (1993) describen al género *Cinara* como una plaga holocíclica asociada a sus plantas hospederas, la oviposición la realizan en las acículas o en la corteza. Dentro de este género *C. cupressi* es una plaga seria de cipreses en muchas partes del mundo (Ciesla, 1991; Obiri *et al.*, 1994; Watt *et al.*, 1997). Estos áfidos son monoicos y se alimentan cerca de las acículas o sobre brotes nuevos que están verdes sin lignificar, de la corteza de tallos jóvenes, ramillas viejas con o sin acículas, ramas, troncos, raíces (Carter y Malsen, 1982; Blackman y Eastop, 1994). Algunas especies viven en la copa de los árboles en primavera y otoño y sobre las raíces en verano. La mayoría de las poblaciones son asistidas por las hormigas, en donde aparentemente existe una asociación mutua, ya que las hormigas se alimentan de los depósitos de mielecilla, limpian la colonia y protegen a los áfidos de sus enemigos naturales (Heie, 1995; Carter y Maslen, 1982).

La especie *C. cupressi* se encuentra comúnmente en *Cupressus* spp., pero también en otras cupresáceas. Las excreciones de mielecilla de áfidos son ricas en soluciones azucaradas conteniendo sacarosa y glucosa. En la ausencia de lluvias fuertes este líquido se acumula en la vegetación baja y forma un sustrato ideal para desarrollar el hongo saprofito denominado fumagina, el cual, en casos extremos cubre el follaje y ramitas con una cubierta negra de hifas y esporas, lo cual interfiere en la fotosíntesis del árbol (Carter y Malsen, 1982).

2.2 Taxonomía del hongo y el insecto

El hongo *L. lecanii* pertenece a la división Deuteromycota de la clase Hyphomycetes. La particularidad de este grupo es que las esporas asexuales se forman sobre las hifas y se encuentran expuestas libremente a la atmósfera (Agrios, 1996). El género *Lecanicillium* se caracteriza por presentar conidióforos solitarios o verticilados y postrados, que llevan apicalmente masas de conidias hialinas, subglobosas, ovales, falcadas, fusiformes, subcilíndricas unicelulares, no adhesivos y no presentan estructuras de latencia (Zare *et al.*, 2000). La especie *L. lecanii* presenta masas de conidias cuyas dimensiones van entre 6,2 a 11,3 μm de diámetro, fialides 11,2-30 x 1.7-2.5 μm (Watanabe, 2002), la conidia tiene un ancho de 3,0 a 4,0 μm y un largo de 5,8 a 10,5 μm (Sugimoto *et al.*, 2002).

El áfido *C. cupressi* pertenece al orden Hemiptera y familia Aphididae, estos insectos pueden ser ápteros o alados partenogenéticos vivíparos. Abdomen de color naranja-café a amarillento-café, el dorso con pilosidad fina que produce una coloración pálido gris ceroso haciendo un patrón de bandas transversales, posee una longitud de 1,8 a 3,9 mm. Huevo: Café amarillento cuando recién es puesto, longitud de 1,2 a 1,3 mm por 0,6 mm de ancho (Blackman y Eastop, 1994; Carter y Maslen, 1982). Los áfidos que comúnmente se identifican como *C. cupressi* aparentemente pueden ser otras especies válidas perteneciendo a un complejo de especies. Este complejo de especies tiene un gran rango de hospederos de Cupressaceae y se encuentra en zonas templadas y subtropicales de las regiones Neártico y Paleártico (Watson *et al.*, 1999).

2.3 Distribución del hongo y el insecto

L. lecanii se encuentra distribuido por todo el mundo y *C. cupressi* se encuentra en Europa, Suroeste de Asia, India, América del Norte, África y Colombia (Blackman y Eastop, 1994; Watson *et al.*, 1999; Carter y Maslen, 1982). En América del Sur, el género *Cinara* fue detectado por primera vez en *Cupressus lusitanica* en Colombia el año 1973, la especie fue inicialmente identificada como *Cinara fresai* pero más tarde como *C. cupressi* (Penteado *et al.*, 2000, Mills, 1990). En Chile según los datos obtenidos por INFOR en la prospección del año 2005, se determinó que la distribución de la plaga abarcaba desde la Región de Arica a la Región de Los Lagos. Sin embargo, en febrero del año 2006 se realizó una inspección a cupresáceas exóticas, utilizadas como cortinas cortaviento en la Región de Aysén y la Región de Magallanes, encontrándose la presencia del áfido, lo que amplió su distribución a la totalidad del territorio continental del país (INFOR, 2008).

2.4 Daño que produce el hongo en el insecto

L. lecanii puede infectar a los insectos directamente a través de la penetración de la cutícula y tiene múltiples mecanismos de acción que le confieren una alta capacidad para evitar que el hospedero desarrolle resistencia.

El mecanismo de acción del hongo entomopatógeno puede estar dividido en tres fases: (1) Adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto, (2) penetración en el hemocele y (3) desarrollo del hongo, lo cual generalmente resulta en la muerte del insecto (Carreño, 2003).

El primer contacto que hace la espora con la superficie del hospedero es por la cutícula. Las características físicas y químicas de las superficies de la cutícula del insecto y la espora son las responsables de esta unión. En algunos hongos la adhesión es un fenómeno no específico, mientras en otros esto es un proceso específico. Algunas glicoproteínas pueden servir como un receptor específico para las esporas (Tanada y Kaya, 1993).

La germinación de las esporas en gran parte depende de la humedad ambiental y temperatura, y en menor grado de las condiciones de luz y estado nutricional (Tanada y Kaya, 1993). El nivel de agua es determinante en el crecimiento de los hongos y pequeñas diferencias en los niveles de humedad relativa después de la aplicación de conidias, pueden determinar de un modo u otro el éxito del hongo en el control de insectos plaga (Guillespie, 1988).

El resultado de la germinación y la penetración no depende necesariamente del porcentaje total de germinación sino del tiempo de duración de la germinación, modo de germinación, agresividad del hongo, el tipo de espora y la susceptibilidad del hospedero (Samson *et al.*, 1988).

En relación al modo de penetración del hongo en el hemocele del insecto se indica que éste depende principalmente de las propiedades de la cutícula, grosor, esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales (Charnley, 1984). Además se pueden distinguir, en términos generales, dos tipos de mecanismos; físico y químico.

El mecanismo físico lo determina la fuerza mecánica que es notable en el extremo de una hifa invasiva donde la capa cuticular es deformada por la presión ejercida, esto por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula (Tanada y Kaya, 1993). Se produce un tubo germinativo y un apresorio, con éste se fija en la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio (hifa de penetración) se da la penetración al interior del cuerpo del insecto.

El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan degradación del tejido en la zona de penetración, lo que facilita la penetración física (Monzón, 2001). Estudios *in vitro* indican que en la digestión del integumento sigue una secuencia de lipasa-proteasa-quitinasa (Tanada y Kaya, 1993). Gillespie (1988) reportó que los hongos *B. Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *Paecilomyces* spp. y *L. lecanii*, producen grandes cantidades de proteasas y quitinasas en medios de cultivo líquido.

2.5 Daño que causa el insecto en el árbol

Estos áfidos, para llevar a cabo su alimentación insertan su estilete en la planta hasta alcanzar el floema. La savia del floema es rica en azúcares y pobre en aminoácidos, motivo por el cual estos organismos se ven obligados a ingerir grandes cantidades de este líquido para obtener una adecuada cantidad de alimento que garantice su sobrevivencia. Junto con la penetración del estilete, el insecto inyecta saliva que contiene enzimas que facilitan la penetración entre las células de la planta. Algunas veces, en los sitios donde los áfidos se alimentan, se desarrollan agallas o deformaciones y la planta disminuye su resistencia a insectos secundarios, hongos y sequedad. Los síntomas en los árboles corresponden a un amarillamiento del follaje o una reducción del crecimiento, especialmente en árboles jóvenes, esto porque la saliva causa efectos fisiológicos, tales como, aumento en la respiración y disminución en la fotosíntesis (Carter y Maslen, 1982, Eskiviski *et al.*, 2005, Penteado *et al.*, 2000). Dado los síntomas que presentan los árboles dañados por estos áfidos se produce la desecación de brotes, e incluso la muerte de los individuos (INFOR, 2008).

Por lo general, el árbol afectado se seca desde el interior de la copa hacia afuera y desde abajo hacia arriba. Además, el pulgón produce una secreción dulzona y pegajosa, que recubre las ramas y el follaje, facilitando el establecimiento de fumagina (capa densa negruzca de hifas de hongos del género *Capnodium* y *Limacinia*) que se adhiere al follaje e interfiere con la fotosíntesis. En la epizootia entre 1976-1978 en donde *C. cupressi* fue el principal agente de daño, se encontró que generalmente hongos saprofitos como *Pestalotia funerea* y *Coniothyrium spp.* fueron subsecuentemente encontrados en el follaje seco (Carter y Maslen, 1982).

3. DISEÑO DEL ENSAYO

3.1 Material

3.1.1 Obtención de placas madres de *Lecanicillium lecanii*

Se utilizaron dos cepas de *L. lecanii* mantenidas en el cepario de la Unidad de Fitopatología del Laboratorio Regional SAG Osorno, Región de Los Lagos (Figura 1).



Figura 1. Cepario de la Unidad de Fitopatología del Laboratorio SAG, Región de Los Lagos.

Las cepas fueron repicadas en medio de cultivo Agar Sabouraud (AS) contenido en placas Petri de 9 cm de diámetro, e incubadas en oscuridad en una estufa de cultivo a 24+-1°C por 3 semanas, con el objeto de obtener suficiente cantidad de colonias del hongo, para ser utilizadas como placas madres para los posteriores ensayos. El cuadro 1 presenta la procedencia de cada una de las cepas del hongo.

Cuadro 1. Procedencia de las cepas de *Lecanicillium lecanii*.

Cepa	Lugar de procedencia	Hospedero	Fecha de obtención
Futaleufú	Chaitén, Comuna Futaleufú, Región de Los Lagos	<i>Cinara cupressi</i>	23-nov- 2007
Cochamó	Segundo Corral, Comuna Cochamó, Región de Los Lagos	<i>Cinara thujafilina</i>	20-nov- 2006

3.1.2 Obtención de colonias de *Cinara cupressi*

Los individuos de *C. cupressi* utilizados en los diferentes ensayos fueron obtenidos mediante crianza artificial realizada en la Unidad de Entomología del Laboratorio Regional SAG Osorno, los áfidos fueron extraídos desde muestras de ramillas de ciprés de la cordillera que fueron enviadas a este Laboratorio provenientes del Parque Nacional Laguna del Laja, Comuna de Antuco, Región del Bío Bío como parte de las actividades del Proyecto FDI-CORFO “ Técnica para la recuperación del crecimiento de *Austrocedrus chilensis*” en el cual participa esta Unidad. La crianza de los áfidos se realizó sobre plantas de ciprés de Monterrey (*Cupressus macrocarpa*) de aproximadamente 30 cm de altura, adquiridos en el vivero de la Universidad de los Lagos, Osorno. Las plantas con los áfidos fueron mantenidas en una cámara bioclimática LABLINE modelo BIOTRONETTE, regulada a una temperatura de 22 ± 2 °C y un fotoperíodo de 12:12 horas de luz/oscuridad (Figura 2).



Figura 2. Crianza artificial de *Cinara cupressi* en *Cupressus macrocarpa*. Unidad de Entomología, Laboratorio Regional SAG Osorno, Región de Los Lagos.

3.2 Método

3.2.1 Evaluación del crecimiento y esporulación de cepas de *Lecanicillium lecanii*

A partir de las colonias de las dos cepas de *L. lecanii* obtenidas como placas madres en medio AS, se realizó la evaluación del crecimiento y esporulación en tres medios de cultivo diferentes. De acuerdo a lo descrito por Barbosa *et al.*, (2002), Gindin *et al.*, (2000) y Vu *et al.*, (2007).

Los medios de cultivo utilizados, fueron: Agar Papa Dextrosa (APD) (HIMEDIA código M096) Agar Sabouraud (AS) (MERCK código 1.05438) y Agar Malta (AM) (MERCK código 1.05398).

Desde la zona central de la colonia de cada cepa de *L. lecanii* en medio AS de 3 semanas de edad, se extrajo con un sacabocado estéril un disco de micelio de 5 mm de diámetro, éste fue depositado individualmente en el centro de una placa Petri de 9 cm de diámetro con cada medio de cultivo a evaluar. Se sembraron 10 placas por cada medio de cultivo y cepa utilizada (figura 3). Las placas fueron incubadas en oscuridad en una estufa de cultivo regulada a una temperatura de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, dispuestas en forma totalmente aleatoria. Se midió el crecimiento radial de la colonia que se desarrollaba desde el disco de micelio a partir del cuarto día de incubación, las mediciones de crecimiento fueron concluidas al momento que alguna de las colonias alcanzó el borde de la placa Petri. Una vez finalizada la medición de crecimiento se realizó el recuento de conidias en cada uno de los medios de cultivo.

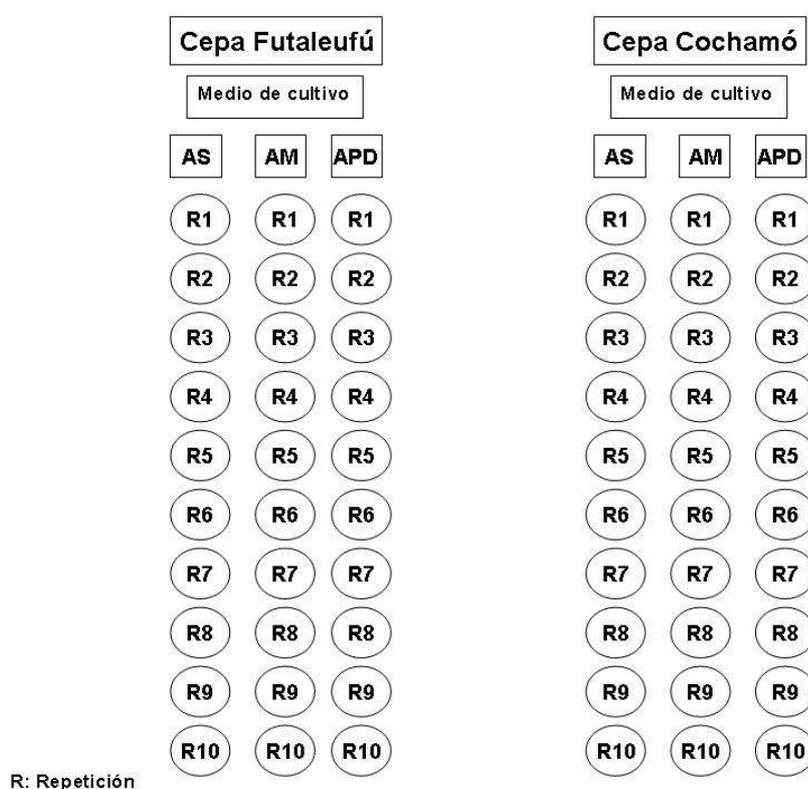


Figura 3. Esquema del diseño experimental del ensayo de crecimiento y esporulación de las cepas de *L. lecanii* sobre tres medios de cultivo.

Para el recuento del número de conidias, se realizó un lavado de la colonia de cada cepa y medio de cultivo aplicando sobre la superficie del micelio 10 ml de agua destilada estéril más el detergente tween 80 (0,01%), agitando suavemente la placa Petri. A partir de esta suspensión se extrajo 0,1 ml, que fue colocado en una cámara Neubauer para realizar el recuento de conidias en un microscopio NIKON modelo E600, utilizando el objetivo 40x. Para determinar la cantidad de conidias por ml se utilizó el procedimiento y fórmula descrita por Tuite (1969).

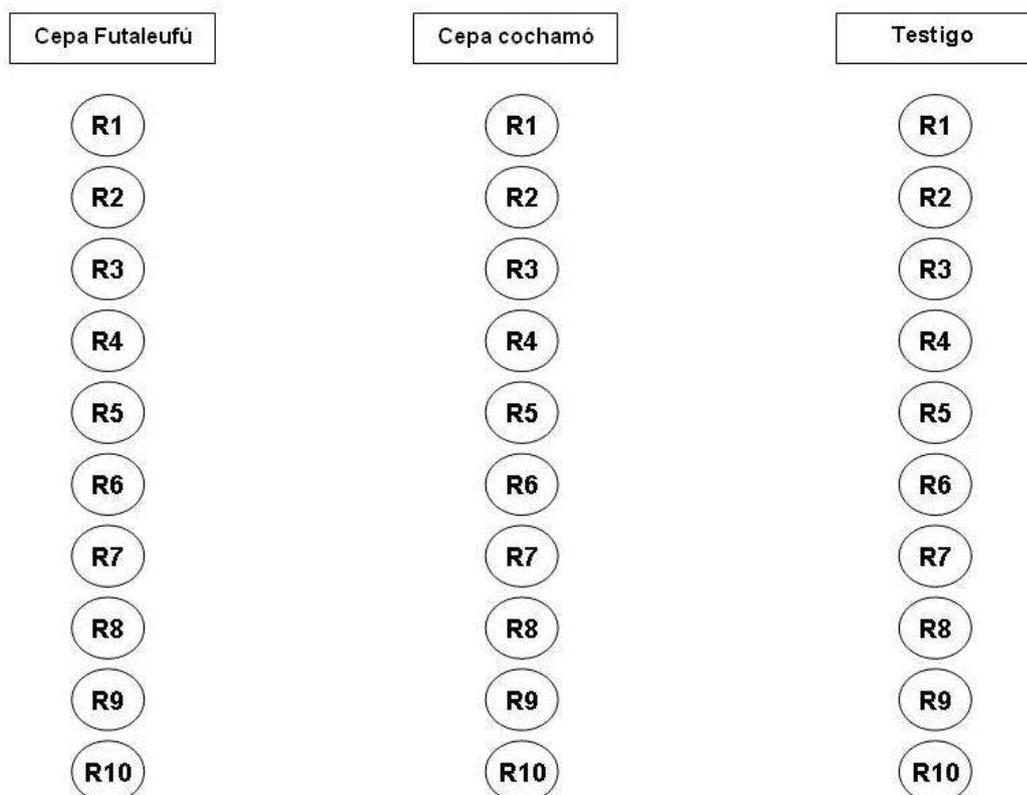
Una vez obtenidos los resultados de crecimiento y recuento de conidias, se seleccionó el mejor medio de cultivo para cada cepa del hongo, en base a aquel en el cual la cepa alcanzó el crecimiento más rápido y el mayor número de conidias por ml.

3.2.2 Evaluación de la virulencia de las cepas de *Lecanicillium lecanii*

Para la evaluación de la virulencia en ensayos con hongos entomopatógenos se utilizan comúnmente la determinación del tiempo letal 50 (TL₅₀) y la concentración letal 50 (CL₅₀). La CL₅₀ es la concentración de un entomopatógeno dada requerida para matar el 50% de la población de los insectos prueba en un período de tiempo dado. El TL₅₀ se define como el período de tiempo requerido para matar el 50% de la población de los insectos prueba cuando son sometidos a una concentración dada de un entomopatógeno, cuanto más corto sea el tiempo letal registrado para un hongo contra el insecto prueba, más alta será la virulencia (Nielsen *et al.*, 2001).

Se calculó el tiempo letal 50 (TL₅₀) para cada cepa del hongo, utilizando para cada caso suspensiones de conidias del hongo obtenidas desde colonias generadas de aquellos medio de cultivo donde se obtuvo el mejor crecimiento y la concentración máxima de conidias. Para ello se realizó el siguiente procedimiento: Se colocó al interior de una placa Petri de 9 cm de diámetro con agar agua (2%) (Vu *et al.*, 2007), un trozo de una ramilla de ciprés de Monterrey de 8 cm de longitud, previamente lavado en una solución de NaOCl Producto Comercial "Clorinda" (1%) por 5 minutos, enjuagado 3 veces con agua destilada por 2 minutos y secado por 10 minutos. En cada ramilla se colocaron, con un pincel fino, 10 ninfas de *C. cupressi* las cuales fueron posteriormente asperjadas con 1 ml de una suspensión de conidias de cada cepa del hongo en agua destilada estéril-tween 80 (0,1%) utilizando un asperjador manual. Se utilizaron 10 placas por cada cepa del hongo más 10 placas testigo, las cuales fueron asperjadas con agua destilada estéril-tween 80 (0,1%) (Figura 4).

Las placas fueron incubadas en forma aleatoria en una cámara bioclimática a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y un fotoperíodo de 12:12 horas de luz/oscuridad, durante un período de 7 días. Diariamente se contabilizó en cada placa Petri el número de áfidos muertos, para ello con un pincel fino se tocaba el cuerpo del insecto para verificar su movimiento. Se consideraron áfidos muertos a aquellos individuos que presentaban el cuerpo de color más oscuro y/o ausencia de movimientos, los cuales fueron separados e incubados al interior de una cámara húmeda para verificar posteriormente el desarrollo de la colonia del hongo como agente causal de la mortalidad observada.



R: Repetición

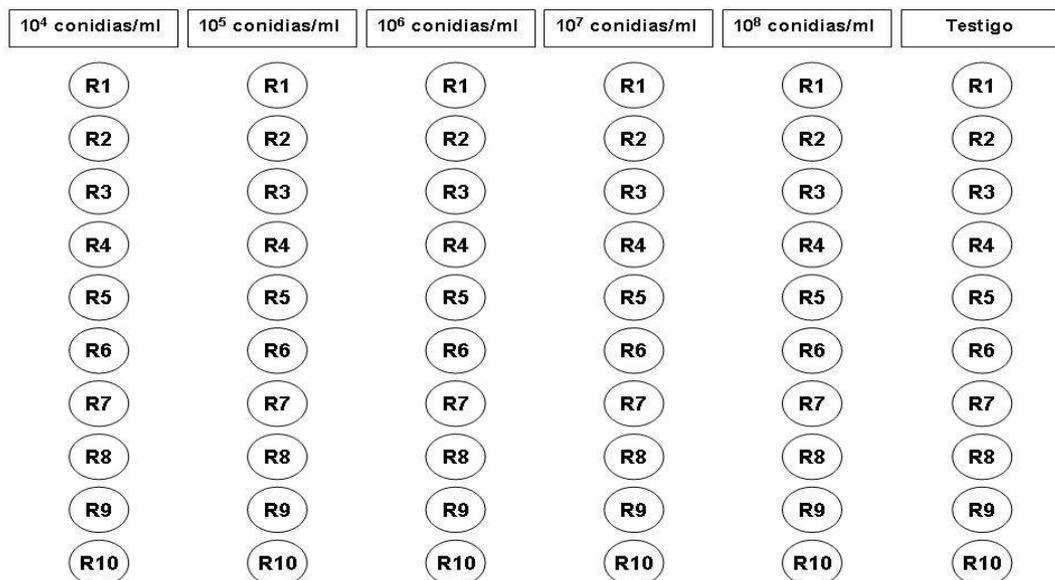
Figura 4. Esquema del diseño experimental para la determinación del tiempo letal 50 (TL₅₀) de dos cepas de *L. lecanii* sobre poblaciones de *C. cupressi*.

Para descartar otros factores que hayan provocado mortalidad, ajenos al hongo, se utilizó la mortalidad corregida (MC) según la fórmula de Abbott (Abbott, 1925):

$$MC = \left(\frac{\% \text{ mortalidad} - \% \text{ mortalidad testigo}}{100 - \% \text{ mortalidad testigo}} \right) \times 100$$

Una vez obtenida la MC para cada cepa, se determinó el TL₅₀ mediante análisis Probit (StatPlus 4.9). Se seleccionó la cepa que presentó el menor TL₅₀ para posteriormente determinar su concentración letal 50 (CL₅₀).

Para la determinación de la CL₅₀ de la cepa seleccionada, se evaluaron 5 concentraciones diferentes de conidias: 1 X10⁴, 1 X10⁵, 1 X10⁶, 1 X10⁷ y 1 X10⁸ conidias/ml, utilizando la misma metodología descrita anteriormente para la determinación del TL 50. Se utilizaron 10 placas por cada concentración de conidias más 10 placas testigo, que fueron asperjadas con agua destilada estéril-tween 80 (0,1%) (Figura 5).



R: Repetición

Figura 5. Esquema del diseño experimental para la determinación de la concentración letal 50 (CL₅₀) de la cepa Futaleufú de *L. lecanii* sobre poblaciones de *C. cupressi*

Las placas fueron dispuestas en forma aleatoria en una cámara bioclimática a 22 ± 2°C y un fotoperíodo de 12:12 horas de luz/oscuridad, durante un período de 7 días. Se determinó diariamente el número de áfidos muertos, de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente y se calculó la mortalidad corregida (MC) para cada concentración de conidias. Una vez obtenidos estos resultados se calculó la CL₅₀ de la cepa del hongo seleccionada el día que se alcanzó a lo menos el 50% de mortalidad de los áfidos evaluados.

3.2.3 Análisis estadístico

El crecimiento y esporulación del hongo fue analizado mediante un análisis de varianza (ANOVA) al 5% de nivel de significancia. En caso de encontrar diferencias significativas se aplicó la prueba de hipótesis específica de Tukey al 5% nivel de significancia para las dos cepas en los 3 medios de cultivo. El tiempo letal 50 (TL₅₀) y la concentración letal 50 (CL₅₀) fueron analizados usando análisis Probit mediante el software estadístico Statplus 4.9.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Crecimiento y esporulación de cepas de *Lecanicillium lecanii*

Los resultados obtenidos demuestran que a los 33 días de incubación, algunas de las colonias de las cepas Cochamó y Futaleufú evaluadas alcanzaron el borde de la placa Petri (90 mm de diámetro de crecimiento) por lo cual a ese período se dió término a esta evaluación. Este lento crecimiento del hongo bajo condiciones *in vitro* coincide con lo descrito para *L. lecanii* por Domsch *et al.*, (1980) quienes señalan que a los treinta y tres días de incubación en medio agar malta a 20°C las colonias de este hongo alcanzan un crecimiento promedio entre 66 a 72 mm de diámetro, similar a lo descrito por Ayala-Zermeño (2005) y Zare y Gams (2001) para esta especie entomopatógena.

Cabe señalar, además, que los hongos entomopatógenos presentan en general un lento crecimiento *in vitro*, tal como lo señala Domsch *et al.*, (1980) para las especies *M. anisopliae* y *B. bassiana* cuyas colonias alcanzan los 20 mm de diámetro a los 10 días de incubación.

Al analizar el crecimiento de las cepas Futaleufú y Cochamó en los 3 medios de cultivo, se determinó que ambas cepas presentaron diferentes comportamientos (Figura 6).

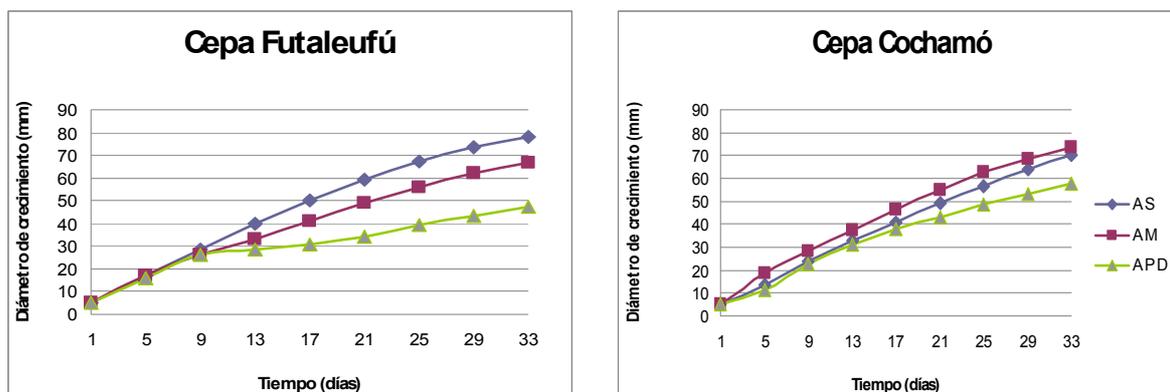


Figura 6. Diámetro de crecimiento promedio de *L. lecanii* cepas Futaleufú y Cochamó sobre los medios de cultivo agar Sabouraud (AS), agar malta (AM) y agar papa dextrosa (APD).

El patrón de crecimiento de la cepa proveniente de Cochamó es similar en los medios AS y AM y levemente inferior en APD. En los tres medios de cultivo utilizados esta cepa mantiene un crecimiento exponencial durante todo el periodo. Por su parte, la cepa Futaleufú, presentó un patrón de crecimiento exponencial similar sobre los medios agar Sabouraud y agar malta mientras que en el medio agar papa dextrosa el crecimiento se tiende a estancar a los trece días de incubación para posteriormente aumentar muy lentamente.

Cabe señalar que para la cepa Futaleufú hasta los 9 días de incubación el crecimiento era igual sobre los tres medios de cultivos evaluados, posterior a esta fecha el medio agar Sabouraud supera en crecimiento a los restantes medios de

cultivo utilizados y el agar papa dextrosa presenta el menor diámetro de crecimiento al igual que lo observado con la cepa Cochamó. Estas diferencias pueden ser atribuidas a los distintos componentes de los medios de cultivo utilizados en el ensayo y a los requerimientos nutricionales de esta especie de hongo (Smith y Onions, 1994).

Los resultados obtenidos con la cepa Futaleufú son coincidentes con lo señalado por Fatiha *et al.*, (2007) quienes indican que el medio de cultivo en el cual crece y esporula mejor *L. Lecanii* es agar Sabouraud, siendo este uno de los medios de cultivo más utilizados por los patólogos de insectos. Sin embargo, muchos otros medios como sustrato de maíz, czapeck-dox, extracto de malta, agar papa dextrosa y agar Sabouraud maltoso también han sido usados comúnmente. Algunas investigaciones recomiendan medios de cultivo más complejos como agar con mezcla de cereales indicando que en estos medios el hongo presenta menor posibilidad de perder el vigor (Landa, 1994).

Al realizar el análisis estadístico de estos resultados se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el diámetro de crecimiento promedio de las cepas en los distintos medios de cultivo evaluados (Figura 7).

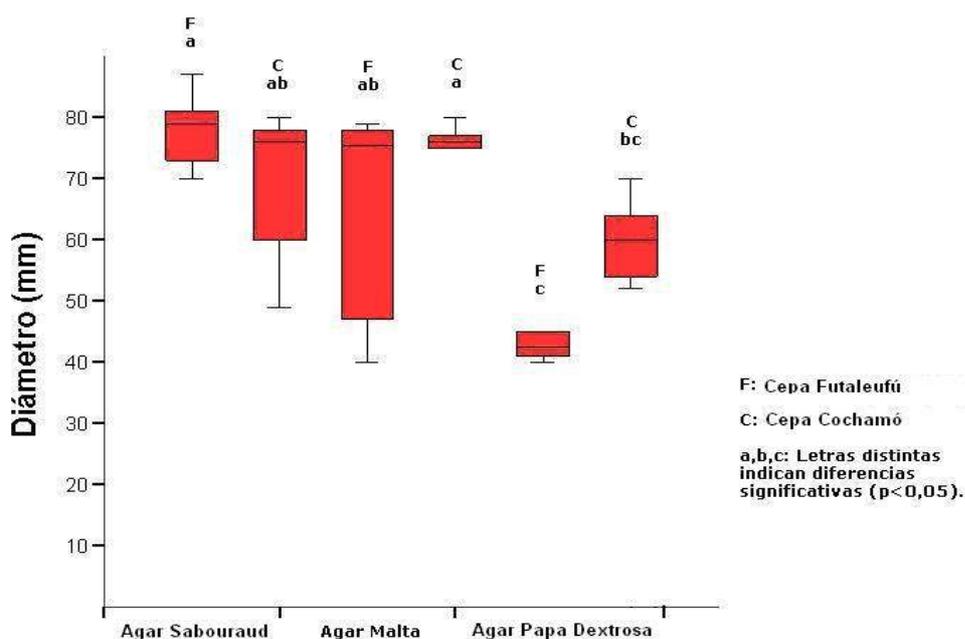


Figura 7. Análisis estadístico comparativo (Tukey) del diámetro de crecimiento promedio de *L. Lecanii* cepas Futaleufú (F) y Cochamó (C) a los treinta y tres días de incubación sobre los medios de cultivo Agar Sabouraud, Agar Malta y Agar Papa Dextrosa.

Los resultados obtenidos demuestran que los diámetros de crecimiento de ambas cepas sobre los medios agar Sabouraud y agar malta no presentan diferencias

estadísticamente significativas entre sí. Por otra parte, los mayores diámetros de crecimiento se obtuvieron sobre el medio agar Sabouraud para la cepa Futaleufú y agar malta para la cepa Cochamó siendo ambos estadísticamente superiores al obtenido sobre agar papa dextrosa con ambas cepas por lo que el medio agar papa dextrosa resultó ser el menos apropiado para el crecimiento de ambas cepas del hongo.

En relación a los valores del diámetro de crecimiento obtenidos en este ensayo, éstos son comparables a los señalados por otros autores, al respecto la cepa Futaleufú sobre el medio agar Sabouraud presentó un diámetro de crecimiento promedio de $77,9 \pm 5,5$ mm, lo que concuerda con los resultados de Barbosa *et al.*, (2002) y Ayala-Zermeño *et al.*, (2005), quienes indican que el mejor medio de cultivo para el crecimiento de *L. lecanii* es agar Sabouraud. Sin embargo, Ayala-Zermeño *et al.*, (2005) indican un diámetro de crecimiento promedio superior (84,2 mm) a los treinta y tres días de incubación, posiblemente atribuible a que el ensayo de estos autores se realizó a 1°C más de temperatura comparado con el presente estudio. Al realizar el análisis estadístico de la producción de conidias (esporulación) obtenida para ambas cepas sobre los distintos medios de cultivo evaluados a los 33 días de crecimiento, se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre estos tratamientos (Figura 8).

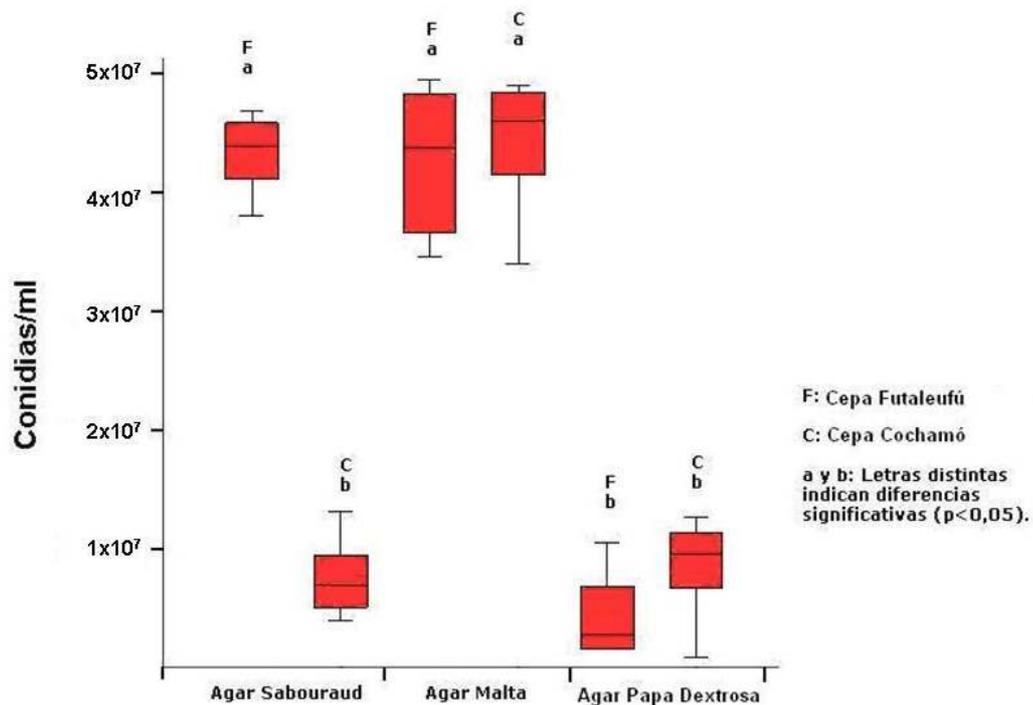


Figura 8. Análisis estadístico comparativo (Tukey) de la concentración de conidias producidas por *L. lecanii* cepas Futaleufú (F) y Cochamó (C) a los treinta y tres días de incubación sobre los medios de cultivo agar Sabouraud, agar malta y agar papa dextrosa.

La cepa Futaleufú presentó una mayor esporulación sobre el medio agar Sabouraud con una concentración promedio de $4,41 \times 10^7$ conidias/ml, valor que no difiere estadísticamente al obtenido sobre el medio agar malta, no obstante sobre ambos medios de cultivo la esporulación de esta cepa fue significativamente superior a la obtenida sobre el medio agar papa dextrosa. Por su parte la cepa Cochamó presentó la mayor esporulación sobre el medio agar malta con un promedio de $4,43 \times 10^7$ conidias/ml. siendo esta concentración estadísticamente superior a la obtenida sobre el medio agar Sabouraud y agar papa dextrosa. Cabe señalar que al igual que en el ensayo de diámetro de crecimiento el medio de cultivo agar papa dextrosa presentó una esporulación significativamente menor a la obtenida en los restantes medios de cultivos para ambas cepas evaluadas, lo que es coincidente con el menor crecimiento observado sobre este medio de cultivo.

En Chile no existe información respecto al crecimiento y esporulación de este hongo entomopatógeno bajo condiciones *in vitro*. Dado los resultados del presente estudio, en futuras investigaciones que involucren las cepas de *L. lecanii* Futaleufú y Cochamó, se recomienda utilizar los medios de cultivo agar Sabouraud y agar malta respectivamente en consideración al buen crecimiento y esporulación logrado por estas cepas en estos dos medios de cultivo.

4.2 Virulencia de cepas de *Lecanicillium lecanii*

4.2.1 Tiempo Letal 50 (TL₅₀) para *Lecanicillium lecanii* cepa Cochamó y Futaleufú

De acuerdo a los resultados anteriores, se determinó una concentración de 1×10^7 conidias/ml como la concentración máxima obtenida para ambas cepas al cabo de los 33 días de incubación. Se utilizó esta concentración de conidias para la determinación del TL₅₀ obteniéndose diferencias entre las cepas Cochamó y Futaleufú (Figura 9).

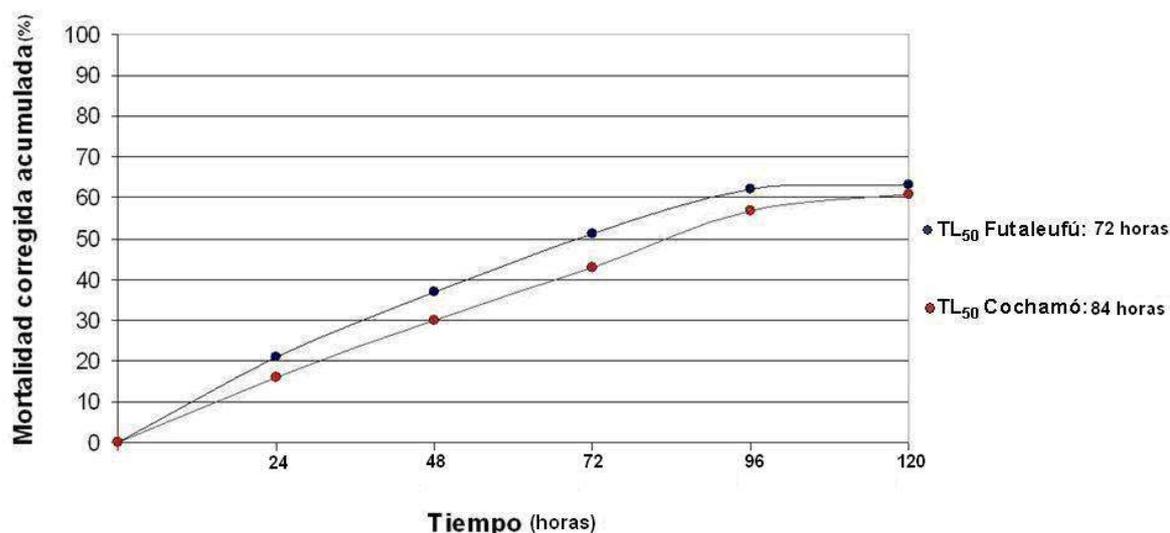


Figura 9. Tiempo letal 50 (TL₅₀) en horas para poblaciones de *C. cupressi* tratadas con *L. lecanii* cepa Cochamó y Futaleufú

La cepa Futaleufú obtuvo un TL_{50} de 72 horas, valor inferior a las 84 horas obtenidas con la cepa Cochamó. Esto demuestra una mayor virulencia de la cepa Futaleufú, ya que ésta demora menos tiempo en reducir al 50% la población de *C. cupressi*, por ello se seleccionó esta cepa para el ensayo de CL_{50} . Al respecto Kim *et al.*, (2001), desarrollaron un ensayo con los hongos entomopatógenos *L. lecanii*, *B. bassiana* y *Paecilomyces spp*, en el cual demostraron que *L. lecanii* fue el hongo más virulento contra *Aphis gossypii* provocando un 100% de mortalidad con un TL_{50} de 2,7 días, siendo este valor muy similar al obtenido en el presente estudio con la cepa Futaleufú.

Por su parte Vu *et al.*, (2007) señalan que la aplicación del hongo *L. lecanii* a una concentración de 1×10^7 conidia/ml sobre poblaciones de *Myzus persicae* resultó en un TL_{50} de 2,1 días, mientras que la aplicación de este entomopatógeno sobre poblaciones de *Aphis gossypii* dió un TL_{50} de 1,5 días a una temperatura de 25°C. Estos valores de TL_{50} difieren con los obtenidos en el presente estudio, lo cual se podría explicar por el diferente comportamiento de las especies de áfidos evaluadas en estos ensayos.

En un estudio similar al realizado en esta investigación, Pereira *et al.*, (2005) indican un TL_{50} de 6,9 días al aplicar suspensiones de esporas de *L. lecanii* sobre poblaciones del áfido *Cinara atlántica*, este mayor tiempo puede ser debido a que el ensayo de estos investigadores se realizó con otra especie de *Cinara* y a una temperatura menor a la realizada en el presente estudio. No existen estudios publicados en que se determine el TL_{50} para el hongo *L. lecanii* sobre *C. cupressi*, dado esto, no es posible comparar estos resultados con los de otros autores.

Cabe señalar que en todos los análisis realizados en este trabajo que consideraron la evaluación de la mortalidad de *C. cupressi*, se constató la presencia de la esporulación de *L. lecanii* sobre la mayor parte de los áfidos muertos.

4.2.2 Concentración Letal 50 (CL_{50}) para *Lecanicillium lecanii* cepa Futaleufú

En este ensayo utilizando la cepa Futaleufú como la más virulenta, se determinó que a las 72 horas después de la aplicación se muere más del 50 % de la población de *C. cupressi* en las concentraciones de conidias más altas que se evaluaron (10^8 y 10^7 conidias/ml) (Figura 10) Al analizar estas concentraciones mediante análisis Probit se determinó un CL_{50} de $3,7 \times 10^7$ conidias/ml.

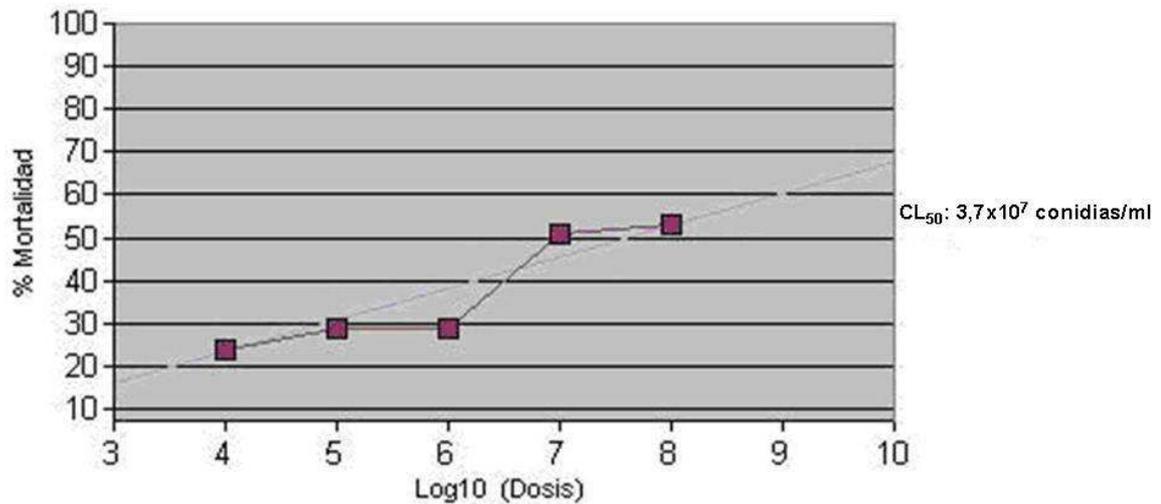


Figura 10. Concentración letal 50 (CL_{50}) de *L. lecanii* cepa Futaleufú a las 72 horas de aplicación sobre poblaciones de *C. cupressi*.

En otras investigaciones en las cuales se ha evaluado la CL_{50} de cepas de *L. lecanii* se obtuvo una CL_{50} de $4,98 \times 10^4$ conidias/ml al tratar poblaciones de mosquitas blancas (*Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae)), presentes en hojas de tomates sumergiéndolas en una solución de conidias del hongo (Rodríguez y del Pozo, 2003).

Otros trabajos como el de Fatiha *et al.*, (2007) determinaron la CL_{50} para cuatro cepas diferentes de *L. lecanii*, al tratar poblaciones de la mosquita blanca *Bemisia tabaci* con el mismo método de aplicación descrito por Rodríguez y del Pozo, (2003). Los resultados obtenidos en este estudio con una de las cepas evaluadas dan una CL_{50} de $1,2 \times 10^7$ conidias/ml valor similar al determinado en ese trabajo.

Las diferencias del valor CL_{50} obtenido entre las distintas investigaciones realizadas, pueden estar asociadas a las distintas metodologías utilizadas para la aplicación del hongo, a características propias de las cepas del hongo o a diferencias en la susceptibilidad entre las diferentes especies de insectos a este hongo entomopatógeno.

De acuerdo a los resultados obtenidos bajo condiciones de laboratorio en este trabajo, se sugiere evaluar a futuro si la CL_{50} obtenida con la cepa de *L. lecanii* Futaleufú ocasionaría los mismos daños sobre este áfido a nivel de campo.

5. CONCLUSIONES

En condiciones de laboratorio, las cepas de *Lecanicillium lecanii* Futaleufú y Cochamó presentaron diferencias significativas en el crecimiento y esporulación sobre los tres medios de cultivo evaluados. El medio de cultivo agar Sabouraud proporcionó las mejores condiciones de crecimiento y esporulación para la cepa Futaleufú, en tanto el medio de cultivo agar malta dió las mejores condiciones de crecimiento y esporulación para la cepa Cochamó, El medio de cultivo agar papa dextrosa no resultó ser apropiado para el crecimiento y esporulación de ambas cepas de *L. lecanii*.

La cepa Futaleufú presentó la mayor virulencia para *C. cupressi* alcanzando un TL₅₀ de 72 horas y una CL₅₀ de $3,7 \times 10^7$ conidias/ml. Dado estos resultados, se sugiere evaluar esta cepa bajo condiciones de campo como un controlador biológico complementario al parasitoide *Pauesia juniperorum*, de tal manera de disminuir las poblaciones de este áfido que amenaza las especies forestales alerce y ciprés de la cordillera, las cuales son de gran valor para nuestro patrimonio nacional.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. 1996. Fitopatología. Tercera edición. Editorial Limusa, México. 838 p.
- Allend, D. 1982. *Verticillium lecanii* on the bean rust fungus *Uromyces appendiculatus*. *Transactions of the British mycological society* 79, 362-364.
- Allendes, G. 2007. Evaluación de ocho cepas de nativas de *Metarhizium anisopliae* (Metsh) Sorokin., para el control de *Aleurothrixus floccosus* (Maskell). Tesis Ing.Agro. Valparaiso. Universidad Católica de Valparaiso. Facultad de Agronomía. 30 p.
- Ayala-Zermeño, M.; Mier, T.; Robles, J.; Toriello, C. 2005. Variabilidad intraespecifica del crecimiento de *Lecanicillium lecanii* (= *Verticillium lecanii*) por efecto de la temperatura. *Revista Mexicana de micología*. 20:93-97.
- Barbosa, C.; Monteiro, A.; Correia, A.; Pereira, G. 2002. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes condições nutricionais. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 37(6): 821-829.
- Blackman, R.; Eastop, V. 1994. Aphids on the world's trees. Inglaterra. 987p.
- Benoit, I. 1989. Libro Rojo de la flora terrestre de Chile. CONAF, Chile. 157 p.
- Carreño, I. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la Yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Tesis. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Microbiología Agrícola y Veterinaria. 116 p.
- Carter, C.; Maslen, N. 1982. Conifer Lachnids in Britain. London, England. 75p.
- Charnley, A. 1984. Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: A speculative review. In: *Invertebrate-microbial Interactions*. Cambridge University Press. Cambridge. pp 229-270.
- Ciesla, M. 1991. Cypress aphid, *Cinara cupressi*, a new pest of conifers in eastern and southern Africa. FAO. *Plant protection bulletin*. 39(2-3): 723-731.
- CONAF.; CONAMA.; BIRF.; UACH.; Pontificia Universidad Católica de Chile.; Universidad Católica de Temuco. 1999. Catastro y Evaluación de los Recursos Vegetacionales Nativos de Chile. Informe Nacional con Variables Ambientales. Santiago, Chile. 88 p.
- Dajoz, R. 2001. Entomología Forestal: los insectos y el bosque: papel y diversidad de los insectos en el medio forestal. Editorial Mundi-Prensa. Madrid. 548 p.

- Domsch, K. J.; W. Gams; Traute-Heidt A. 1993. Compendium of Soil Fungi, vol. 1, Academic Press, Londres, 1980
- Eskiviski, E.; J. Agostini.; R. Toloza.; O. de Coll. 2005. Daños producidos por el pulgón del pino *Cinara atlantica* W. (Hemiptera: Aphididae) en plantas jóvenes de *Pinus taeda* L. **INTERNET:** http://www.inta.gov.ar/montecarlo/INFO/documentos/forestales/c_eskiviski_cinara.pdf(diciembre 12, 2008)
- Fatiha, L.; A, Shaukat.; R, Shunxiang.; A, Muhammad. 2007. Biological characteristics and pathogenicity of *Verticillium lecanii* against *Bemisia tabaci* (HOMOPTERA: AleyrodidaE) on eggplant. *Pakistan Entomology*. 29 (2).
- Footitt, R.; R, William. 1993. The Insects and Arachnids of Canada, Part 22. The genera of Aphids of Canada (Homoptera: Aphidoidea and Phylloxeroidea). Centre for Land and Biological Resources, Ottawa, Ontario, Research Branch, Agriculture Canada. 766 p.
- Gillespie, A. 1988. Use of fungi to control pest of agricultural importance. In: Burge, M. (Ed) Fungi in biological control systems. Manchester University Press, Manchester, England. 269 p.
- Gindin, G.; N, Geschtovt.; B, Racciah.; I, Barash. 2000. Pathogenicity of *Verticillium lecanii* to different developmental stages of the silverleaf whitefly (*Bemisia argentifilii*). *Phytoparasitica* 28(3).
- Hall, R.1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In Burgues, Microbial control of pest and plant diseases. Academic Press, New york, 483-498.
- Hall, R. 1984. Epizootic potential for aphids of different isolates of the fungus *Verticillium lecanii*. *Entomophaga* 29:311-321.
- Heie, O. 1995. The Aphidoidea (Hemiptera) of Fennoscandia and Denmark. VI. Family Aphididae: Part 3 of tribe Macrosiphini of subfamily Aphidinae and family Lachnidae. 222 p.
- Hsiao, W.; M, Bidochka.; G, Khachatourians. 1992. Effect of temperatura and relative humidity on the virulence of the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii*, toward the oat-bird berry aphid, *Rhopalosiphum padi* (Hom., Aphidiae). *Journal of Applied Entomology* 114:484-490.
- INFOR. 2008. Manejo integrado: Técnica para la recuperación del crecimiento de *Austrocedrus chilensis*. 129 p.

- INFOR. 2008. Proyectos INFOR Bosque Nativo. **INTERNET:** http://www.infor.cl/areas_investigacion/proyectos_bosque_nativo.htm(mayo 14, 2008).
- Kim, J.; M, Lee.; C, Yoon.; H, Kim.; J, Yoo.; K, Kim. 2001. Control of cotton aphid and greenhouse whitefly with a fungal pathogen. **INTERNET:** www.agnet.org/library/eb/502b/eb502b.pdf(Julio 15, 2008)
- Landa, Z.; L, Osborne.; F, Lopez.; J, Eyal. 1994. A bioassay for determining pathogenicity of entomogenous fungi on white flies". *Biol.Control* 4: 341-350.
- Lenteren, J. 2003. Quality control and production of biological control agents Theory and testing procedures. England. 327 p.
- Mills, N. 1990. Biological control of forest aphid pests in Africa. *Bulletin of Entomological Research* 80:31-36.
- Milner, R. 1997. Prospects for pesticides for aphid control. *Entomophaga* 42:227-239.
- Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas*. Costa Rica. (63): 95-103
- Nielsen, C.; E, Jørgen.; D, Karsten. 2001. Entomophthorales on cereal aphids. Dinamarca. 75 p.
- Obiri, F; G, Giathi.; A, Masaje. 1994. The effect of cypress aphid on *cupressus lustitanica* in Kenya and Tanzania. *East African agricultural and forestry journal*. 59(3): 227-234.
- Penteado, S.; R, Trentini.; E, Tadeo.; W, Reis. 2000. Ocorrência, distribuição, dano e controle de Pulgoes do genero *Cinara* em *Pinus* spp. no Brasil. *Floresta* 30: 55-64.
- Pereira, M.; S, Chiarello. 2005. Seleção de isolados de *Verticillium lecanii* para o controle de *Cinara atlantica*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* (Brasil) 40(11):1141-1144.
- Rodríguez, M; Gerding, M.; France, A. 2005. Virulencia de aislamientos de hongos entomopatógenos sobre larvas de polilla del tomate *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera:Gelechiidae). *Agricultura Técnica* (Chile) 66(2):159-165.
- Rodríguez, A.; E, del Pozo. 2003. Aislamientos de hongos entomopatógenos en Uruguay y su virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum west*. *Agrociencia* 7(2): 71-78.
- Samson, R.; H, Evans.; J, Latgé. 1988. "Atlas of Entomopathogenic Fungi". Springer-Verlag, Berlin. 300 p.

- Samson, R. ; M, Rombach. 1985. Biology of the fungi *Verticillium lecanii* and *Aschersonia*. In : Biological pest control. The glasshouse experience. Blanford Press. England 2: 34-42.
- Spencer, D.; P, Atkey. 1981. Parasitic effects of *Verticillium lecanii* on two rust fungi. Transactions of the British Mycological Society 77: 535-542.
- Sugimoto, M.; M, Koike.; N, Hiyama.; H, Nagao. 2002. Genetic, morphological, and virulence characterization of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 82 :176–187
- Tanada, Y.; Kaya, H. 1993. Insect Pathology. Academic Press. San Diego, California. Estados Unidos. 666 p
- Tuite, J. 1969. Plant pathological methods; fungi and bacteria. Burgess Publications . Minneapolis, EE.UU. 239 p.
- Vu, V.; S, Hong.; K, Kim. 2007. Selection of entomopathogenic fungi for aphid control. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104(6):498-505.
- Watanabe, T. 2002. Soil and seed fungi morphologies of cultured fungi and key to species. Segunda edición, Florida, Estados Unidos. 486p.
- Watson, G.; D, Voegtlin.; S, Murphy.; R, Footitt. 1999. Biogeography of the *Cinara cupressi* complex (Hemiptera: Aphididae) on Cupressaceae, with description of a pest species introduced into Africa. *Bulletin of Entomological Research*. 89: 271-283.
- Watt. D.; Stork, E.; Hunter,D.1997. Forest and Insects.Primera Edición, Gran Bretaña.406p.
- Yokomi, R.; T, Gottwald. 1998. Virulence of *Verticillium lecanii* isolates in aphids determined by detached-leaf bioassay. *Journal Invertebrate Pathology* 51: 250-258.
- Zare, R.; W, Gams.; A, Culham. 2000. A revision of *Verticillium* section *Postrata* I. Phylogenetic studies using ITS sequences. *Nova Hedwigia* 71: 465-480.
- Zare, R.; W, Gams. 2001. A revision of *Verticillium* section *Postrata* IV. The genera *Lecanicillium* y *Simplicillium*. *Nova Hedwigia* 73: 1-50

Anexos

Anexo 1

Abstract and keywords

ABSTRACT

The cypress aphid *Cinara cupressi* (Buckton) is considered one of the 100 most important exotic invading species in the world. It is present in all Chilean continental territory and threat the growth and performance of the native cupressaceae species *Austrocedrus chilensis* (D.Don) (Ciprés de la Cordillera) and *Fitzroya cupressoides* (Molina) (Alerce), both categorized like vulnerable in the book "red list of Chilean terrestrial flora".

Until now, it has been considered the use of parasitoid for its biological control; however, the role of entomopathogenic fungi for its control remains unknown. In this study, it was evaluated the virulence, under laboratory conditions, of two strains of *Lecanicillium lecanii* kept in the Laboratorio Regional SAG Osorno for the biological control of *C. cupressi*. One of the strains used comes from the commune of Futaleufú, Province of Palena and the other comes from the commune of Cochamó, Province of Llanquihue, both of the Region de Los Lagos.

The growth and sporulation of both strains of the fungi in three different culture medium: potato dextrose agar (PDA), Sabouraud agar (SA) and Malt agar (MA) were determined and there were significant differences among treatments, reaching the bigger growth and sporulation with the strain Futaleufú in the SA culture medium.

The virulence of the two strains of the fungi was evaluated by spraying conidial suspension over twigs containing nymphs of *C. cupressi* determining the Letal Time 50 (LT₅₀) for both strains. The Futaleufú strain showed higher virulence (LT₅₀ of 72 hours) than Cochamó strain (LT₅₀ of 84 hours). After that it was determined the 50% Letal Concentration (LC₅₀) of the Futaleufú strain using five concentrations of conidia/ml (1 X10⁴, 1 X10⁵, 1 X10⁶, 1 X10⁷ y 1 X10⁸) and one control with distilled sterile water. The 50% letal concentration (LC₅₀) of the conidial suspension of this fungus was determined to be 3,7x10⁷ conidia/ml at the 72 hours of evaluation.

It is suggested that the Futaleufú strain of *L. lecanicillium* could be an effective biocontrol of *C. cupressi* and its evaluation under field conditions is recommended.

Keywords: *Cinara cupressi*, *Lecanicillium lecanii*, virulence, biological control, entomopathogenic.

Anexo 2

Análisis estadísticos de la evaluación del crecimiento y esporulación.

1.1 Análisis de varianza para el diámetro de las colonias

Prueba de homogeneidad de varianza para el diámetro por cepas

	Prueba
Hartley's	2,01

Análisis de Varianza para el diámetro por cepas

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Coefficiente-F	P-valor
Entre grupos	141,067	1	141,067	0,61	0,4378
Intra grupos	13405,9	58	231,136		
Total corregido	13546,9	59			

Prueba de múltiple rango Tuckey HSD para el diámetro por cepas

Cepas	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
Futaleufú	30	63,9	X
Cochamó	30	67	X

Prueba de homogeneidad de varianza para el diámetro por medios de cultivo

	Prueba
Hartley's	2,0919

Análisis de Varianza para el diámetro por medios de cultivo

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Coefficiente-F	P-valor
Entre grupos	5309,63	2	2654,82	18,37	0,0000
Intra grupos	8237,3	57	144,514		
Total corregido	13546,9	59			

Prueba de múltiple rango Tuckey HSD para el diámetro por medios de cultivo

Cepas	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
Agar Sabouraud	20	74,0	X
Agar Malta	20	70,1	X
Agar Papa Dextrosa	20	52,4	X

1.2. Prueba "t" de medias para el diámetro de las colonias (mm), según procedencia.

Procedencia		Prueba t	P valor
Futaleufú	Cochamó		
63,9	67	-0,96	0,345

1.3 Análisis de varianza para la esporulación de las cepas

Prueba de homogeneidad de varianza para la esporulación por cepas

	Prueba
Hartley's	1,14

Análisis de Varianza para la esporulación por cepas

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Coficiente-F	P-valor
Entre grupos	1,19002E17	1	1,19002E17	3,45	0,0695
Intra grupos	1,58465E18	46	3,44489E16		
Total corregido	1,70365E18	47			

Prueba de múltiple rango Tuckey HSD para la esporulación por cepas

Cepas	Cantidad	Media	Grupos homogéneos
Futaleufú	24	3,01172E7	X
Cochamó	24	2,01589E7	X