

Identificación de hongos entomopatógenos asociados a pulgones en cultivos hortícolas en la zona centro de la Península Ibérica

B. M. DÍAZ, C. C. LÓPEZ LASTRA, M. OGGERIN, A. FERERES, V. RUBIO

El objetivo de este trabajo fue identificar las especies de hongos entomopatógenos asociados a distintas especies de pulgones de los principales cultivos hortícolas de la región central de la Península Ibérica

Los muestreos se realizaron en cultivos hortícolas al aire libre y en invernadero, durante la primavera de 2006 y el otoño de 2006 y 2007. Para la identificación de las estructuras de los hongos se realizaron preparados coloreados y montados en acetoorceína 1%. Los aislamientos se hicieron en medio Sabouraud dextrosa agar + 1% de extracto de levadura enriquecido con yema de huevo + leche.

Los hongos identificados correspondieron al orden Entomophthorales, siendo *Pandora neoaphidis* (Remaudière & Hennebert) Humber la especie predominante sobre *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) y *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) en lechuga, sobre *Aphis fabae* (Scopoli) en acelga tanto en otoño como en primavera y sobre *Aphis gossypii* (Glover) en cultivos de pepino en primavera y calabacín en otoño. También se identificó la especie *Conidiobolus coronatus* (Constantin) en individuos de *A. fabae* recogidos en acelga durante la primavera y en *M. euphorbiae* en cultivos de lechuga en otoño.

Los resultados obtenidos por taxonomía clásica fueron confirmados por análisis molecular de la región ITS, usando primers generales y específicos para *P. neoaphidis*. En estas mismas muestras no se obtuvieron productos de amplificación cuando se utilizaron primers específicos para *Entomophthora planchoniana* Cornu, por lo que se descartan infecciones mixtas con estas dos especies de hongos.

Se obtuvieron sólo tres cultivos puros de *P. neoaphidis* a partir de *A. fabae*. La dificultad de aislamiento y producción artificial del hongo sugiere que sería recomendable desarrollar una estrategia de control de estos pulgones de hortícolas basada en Control Biológico por Conservación

B. M. DÍAZ, M. OGGERIN, A. FERERES, V. RUBIO. Instituto de Ciencias Agrarias, Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Serrano 115 dpdo. 28006 Madrid. E-mail: vrubio@ccma.csic.es

C. C. LÓPEZ LASTRA. Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores CONICET-CEPAVE-UNLP, Calle 2 N° 584, 1900 La Plata, Argentina.

Palabras clave: Entomophthorales, *Pandora neoaphidis*, *Conidiobolus coronatus*, Aphididae, PCR, Control Biológico

INTRODUCCIÓN

Los pulgones constituyen una de las plagas más importantes de los cultivos hortícolas, ya que reducen el rendimiento y/o calidad de los productos de cosecha, debido a los daños directos e indirectos que

ocasionan en los mismos, constituyéndose en los principales agentes transmisores de virus vegetales.

Estos insectos son capaces de producir en un tiempo corto una gran cantidad de biomasa que provee de alimento para muchos depredadores, parasitoides y microorganismos.

mos patógenos (KELLER, 2006). Este último grupo constituye uno de los componentes principales del complejo de enemigos naturales de los pulgones, destacándose principalmente a los hongos, ya que la infección se inicia con la adhesión y posterior germinación de los conidios sobre el tegumento del insecto, posibilitando así el desarrollo de enfermedades en estos insectos con aparato bucal chupador-suctor (MILNER, 1997).

Los hongos que afectan a los pulgones pertenecen al orden Hypocreales, destacándose los géneros, *Beauveria*, *Lecanicillium* (= *Verticillium*) e *Isaria* (= *Paecilomyces*) (MILNER, 1997), sin embargo, dentro del orden Entomophthorales se han descrito 29 especies que afectan a pulgones en Europa, pertenecientes a los géneros *Conidiobolus*, *Batkoa*, *Entomophaga*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Neozygites*, *Pandora*, *Tarichium* y *Zoophthora* (KELLER, 2006). De esta manera los Entomophthorales se constituyen, como importantes antagonistas de los pulgones, causando epizootias naturales capaces de reducir drásticamente sus poblaciones (NIELSEN, 2002, KELLER, 2006, MORALES *et al.*, 2006). El desarrollo de estas epizootias se ve facilitado por una serie de características morfológicas (cuerpo blando y tamaño pequeño) y biológicas (ciclo de vida corto, a menudo partenogenéticos, vivíparos, las formas ápteras y aladas del adulto) propias de los pulgones que favorecen la transmisión de los hongos entre los individuos de una población y el medio donde habitan (STEINKRAUS, 2006). Por ello, es interesante su consideración como agentes de biocontrol dentro del Control Biológico de pulgones.

Estudios previos realizados en otros sistemas hortícolas del mundo han permitido identificar a 6 especies del orden Entomophthorales parasitando a distintas especies de pulgones en cultivos protegidos y al aire libre (SCORSETTI *et al.*, 2007). En la zona centro de España, se ha determinado que los hongos entomopatógenos y los sírfidos son los principales enemigos naturales de los pulgones que afectan lechuga (MORALES *et al.*, 2006; MORALES *et al.*, 2007). Sin embar-

go, hasta el momento existe muy escasa información sobre las especies de hongos entomopatógenos causante de la mortalidad de pulgones en otros cultivos hortícolas de la Península Ibérica. Es por ello, que el objetivo del presente trabajo fue identificar por taxonomía clásica y molecular a los hongos entomopatógenos que parasitan a los pulgones presentes en los cultivos hortícolas de la zona central de España.

MATERIAL Y MÉTODOS

La prospección de hongos entomopatógenos en pulgones presentes en cultivos de acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla*), pepino (*Cucumis sativus*), repollo (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*), calabacín (*Cucurbita pepo*), calabaza (*Cucurbita máxima*); judías (*Phaseolus vulgaris* var. *vulgaris*), berenjena (*Solanum melongena*), tomate (*Solanum lycopersicum*), pimiento (*Capsicum annum*) coliflor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) y lechuga (*Lactuca sativa*) de la región central de España. Los muestreos se realizaron durante el otoño y primavera de 2006 y en otoño de 2007, en las localidades de Villa del Prado (Madrid) (Lat. 40° 16' N; Long. 4° 18' O) y La Poveda (Arganda del Rey, Madrid) (lat. 40° 18' N; Long. 3° 28' O). En el Cuadro 1 se presentan los cultivos muestreados en cada localidad de estudio, así como las características de los mismos y las especies de pulgones presentes en cada ciclo de producción, cuando la plaga estaba presente.

El muestreo se realizó por observación visual de las plantas, deteniéndose en aquellas hojas con desarrollo de colonias de pulgones para retirar los cadáveres de los individuos que presentaban síntomas de mortalidad por hongos entomopatógenos. Dado que los síntomas externos varían en función del momento del ciclo de la infección, los pulgones que no presentaban desarrollo externo de micelio fueron transportados al laboratorio y allí fueron colocados en cámara húmeda para favorecer el desarrollo externo de las estructuras fúngicas. En todos los casos, los insectos fueron colectados con un trozo de

material vegetal y de forma individual fueron colocados dentro de un tubo Eppendorf de 1,5 ml hasta su llegada al laboratorio.

Identificación de los hongos entomopatógenos por microscopía óptica

La realización de preparados microscópicos se llevó a cabo colocando una gota de aceto-orceína (1%) sobre un portaobjeto, sobre la que se colocó la mitad de cuerpo del pulgón, cubriéndose la preparación con un cubreobjeto de 18 mm. Los preparados fueron observados al microscopio óptico con contraste de fases (Nikon Contrast Phase 2) con un aumento de 40X. Las estructuras externas del hongo, como conidios primarios y secundarios, conidióforos, cistidios, y presencia de rizoides fueron tenidas en cuenta para la identificación. Para determinar el género y la especie se utilizaron claves generales (HUMBER, 1997) y específicas para Entomophthorales (KELLER, 1987, 1991, 2006; BALAZY, 1993). La mitad restante del cuerpo de cada pulgón se mantuvo en nevera a 4°C en Eppendorf estériles como material de herbario.

Identificación molecular

Para la identificación molecular se tomaron muestras representativas de pulgones de cada lugar de muestreo, las cuales fueron conservadas en etanol (96%) a 4°C hasta la realización extracción de ADN. Para ello, se utilizó el kit PowerSoil (MO BIO) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En primer lugar se amplificó la región ITS completa usando los primers específicos ITS1F (GARDES y BURNS, 1993) e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990). Las reacciones de PCR se desarrollaron en un volumen de 50 μ l añadiendo 1X de buffer de reacción que contenía 1,5 mM MgCl₂ (Roche Diagnostics Ltd.), 0,25% (v/v) Tween 20 (Merck), 5% dimetil sulfóxido (v/v) (Merck), 0,25 mM de cada dNTP (GE Healthcare), 2 μ M de cada primer, 1,25 unidades de Taq ADN polimerasa (Roche Diagnostics Ltd.) y 5 μ l de ADN fúngico diluido (alrededor 10 ng de ADN), como control negativo se empleó agua

miliQ estéril. Las amplificaciones fueron realizadas con un termociclador Perkin-Elmer CETUS 480 usando un ciclo de desnaturalización de 2,5 min a 94°C, seguido de 40 ciclos cada uno de los cuales constaba de tres pasos: un paso de desnaturalización de 30 seg a 94°C, un paso de anillamiento de 30 s a 57°C, un paso de extensión de 1,5 min a 72°C, la amplificación se finalizó con un ciclo de extensión de 10 min a 72°C. Los productos fueron posteriormente secuenciados siguiendo la metodología de MOORE *et al.* (1999).

Las secuencias obtenidas de la región ITS completa fueron comparadas con las secuencias existentes en la base de datos del GenBank (National Center for Biotechnology Information) usando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Se realizaron, además, otra serie de PCR utilizando primers específicos para *Pandora neoaphidis* y *Entomophthora planchoniana*. En este caso se colocó a cada pulgón en un tubo de PCR de 0,2 ml y la extracción de ADN se realizó añadiendo a cada tubo 50 μ l 0,7M NH₄OH y posteriormente el pulgón se trituró con una punta de micropipeta, según la metodología de RUMKEMA *et al.* (1996) ligeramente modificada. El ADN extraído fue diluido 10 veces en agua miliQ estéril. La reacción de PCR fue preparada con 1,5 mM MgCl₂ (Roche Diagnostics Ltd.), 0,20 mM de cada dNTP (GE Healthcare), 1 μ M de cada primer, 1 unidad de Taq ADN polimerasa (Sigma Aldrich Co.) y 1 μ l de ADN fúngico diluido (10X). Los primers específicos utilizados para *P. neoaphidis* fueron ITS4 e ITS1-E432 (TYMON *et al.*, 2004) y para *E. planchoniana*, ML2 y 5,8-3' (TYMON *et al.*, 2004). En ambas PCR se colocó un control negativo (agua miliQ estéril) y tres controles positivos (ADN de *E. planchoniana*, *C. obscurus* y *P. neoaphidis*). Las amplificaciones fueron realizadas con un termociclador Perkin-Elmer GeneAmp (Mod. 9600) usando un ciclo de desnaturalización de 3 min a 96°C, seguido de 38 ciclos que incluían un



Fig. 1. Adulto alado de *Macrosiphum euphorbiae* infectado con *Pandora neoaphidis*.

primer paso de desnaturalización de 10 seg a 94°C, un segundo paso de anillamiento de 20 s a 55°C, y un tercer paso de extensión de 1 min a 72°C finalizando la amplificación con un ciclo de extensión de 10 min a 72°C. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% (p/v) en TBE 1X a 100 v durante 2,5 horas en el que se incluyó bromuro de etidio. Para la electroforesis se tomaron unas alícuotas de 5 µl de cada reacción de PCR a las que se les añadieron 2 µl de tampón de carga. Como patrón de referencia de peso molecular se emplearon 5 µl de marcador molecular de 100 bp. Los resultados se fotografiaron exponiendo el gel de agarosa en un transiluminador de luz ultravioleta.

Aislamiento de hongos Entomophthorales

Se siguió el método descendiente de lluvia de conidios, propuesta por PAPIEROK & HAJEK (1997). La misma consistió en realizar una esterilización superficial del insecto y posteriormente el pulgón se pegó con una cinta adhesiva de doble cara a la tapa de una placa Petri de 60 mm de diámetro, con medio de cultivo Sabouraud Maltosa Agar con extracto de levadura 1% y suplementado con yema de huevo y leche (SEMA). Las placas fueron incubadas durante 12 h a 20°C y en oscuridad, para permitir la descarga de conidios. Al cabo de ese tiempo la tapa fue reemplazada por una nueva manteniendo las

condiciones de esterilidad. Los cultivos se mantuvieron a 24°C y en oscuridad durante 7 días y posteriormente en nevera a 4°C.

Además, se utilizó otra metodología para inducir la descarga de conidios de los pulgones recogidos en campo, realizando una cámara húmeda en placas de Petri de 6 cm y colocando al pulgón sobre un portaobjeto estéril. Las placas fueron incubadas como se describió anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el período de muestreo realizado durante la primavera así como en otoño sobre cultivos hortícolas de la región central de la Península Ibérica, se registró la presencia de hongos entomopatógenos pertenecientes al orden Entomophthorales (Clase Zygomycetes) produciendo mortalidad sobre distintas especies de pulgones. Se determinaron dos especies fúngicas *Conidiobolus coronatus* (Constantin) perteneciente a la familia Ancylistaceae y *Pandora neoaphidis* (Remaudière & Hennebert) Humber perteneciente a la familia Entomophthoraceae (Fig.1). Estos dos géneros forman parte de los ocho descritos por KELLER (2006) parasitando pulgones en Europa.

Considerando, cada situación en particular se pudo observar que en la localidad de Villa del Prado se encontraron durante la primavera de 2006 pulgones parasitados con hongos entomopatógenos sólo en cultivos bajo plástico (acelga y pepino), mientras que en repollo cultivado al aire libre se registró la presencia de *Brevicoryne brassicae*, sin encontrar individuos muertos por hongos. En los cultivos de acelga se analizaron 24 cadáveres de *Aphis fabae* (Scopoli) en los que se identificó a *P. neoaphidis* en el 17% de las muestras analizadas, a lo que debe agregarse que en el 33% de las muestras restantes se observó la presencia de micelio inmaduro de Entomophthorales por lo cual no se pudo llegar a determinar la especie, pero si es importante tener en cuenta este valor a la hora de considerar la incidencia de este hongo en la mortalidad natural de la mencionada especie

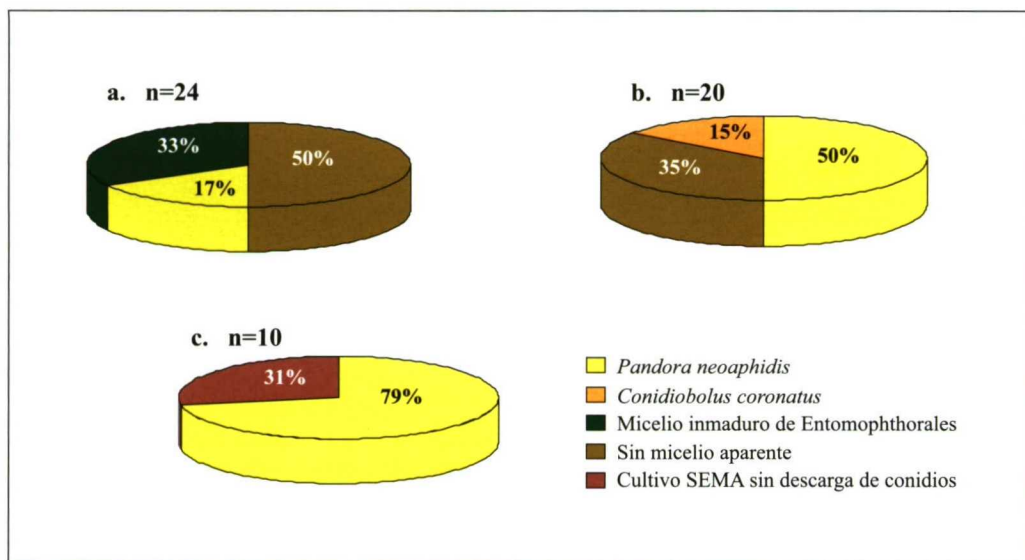


Fig. 2. Incidencia de hongos entomopatógenos en *Aphis fabae* en cultivos de acelga de primavera y otoño en Villa del Prado (Madrid). a. Cultivo de primavera, b y c. Cultivos de otoño.

de pulgón (Fig. 2a). En cultivos de pepino muestreados en primavera sobre un total de 30 muestras se detectó la presencia de *P. neoaphidis* sobre *Aphis gossypii* (Glover) en el 80% de las mismas, mientras que la incidencia de este hongo sobre la misma especie de pulgón en cultivos de calabacín fue del 42% calculado sobre un total de 12 pulgones analizados (Fig. 3a y b).

En otoño de 2006 no se registró la presencia de pulgones en los cultivos producidos a campo de repollo, pimiento, tomate y berenjena producido en invernadero. Sin embargo, en los cultivos de judías y calabaza en invernadero se registró la presencia de *Aphis craccivora* y *Aphis gossypii* respectivamente sin registrar mortalidad por hongos. Una situación similar a la anterior se observó en un cultivo de coliflor con alta densidad de *Brevicoryne brassicae* en el cual no se registraron hongos.

Sin embargo en dos cultivos de acelga bajo plástico, al igual que en primavera se identificó a *P. neoaphidis* en el 79% de las 10 individuos de *A. fabae* y en otro cultivo de acelga se identificó el mismo hongo en el

50% de muestras analizadas, sobre un total de 20 ejemplares de la misma especie. (Fig. 2b y 2c). En este último caso se detectó además la presencia de *C. coronatus* en 3 individuos (15%) de *A. fabae* de las 20 muestras analizadas (Fig. 2b).

En la localidad de La Poveda, durante la primavera en cultivos de lechuga al aire libre se determinó la presencia de *P. neoaphidis* sobre el 42% de un total de 10 individuos de *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) que fueron analizados, mientras que en un 6% la mortalidad de los individuos se debió al hongo *C. coronatus* (Fig. 4a). Sobre un cultivo de lechuga de otoño el hongo *P. neoaphidis* fue identificado en un 50% de los 10 individuos examinados de *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Fig. 4b). La identificación de *P. neoaphidis* afectando a *M. euphorbiae* y *N. ribisnigri* en cultivos de lechuga de región central confirma lo hallado por MORALES *et al.* (2007) en un trabajo previo realizado en la misma región de estudio.

El hongo *C. coronatus* ha sido identificado en este estudio parasitando a *A. fabae* y *M. euphorbiae*, mientras que no se registró

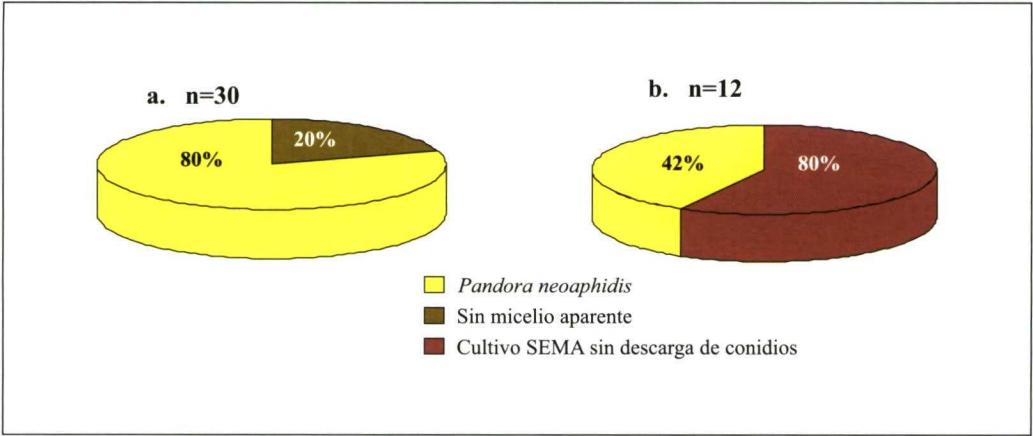


Fig. 3. Incidencia de hongos entomopatógenos en *Aphis gossypii* en a. cultivo de pepino y b. calabacín en primavera y otoño, respectivamente en Villa del Prado (Madrid).

parasitando a *N. ribisnigri* ni a *A. gossypii*. Sobre ésta última especie fue identificado sólo a nivel de género, como *Conidiobolus sp.* en Argentina (LÓPEZ LASTRAS y SCORSETTI, 2007). La especie *C. coronatus* tiene una amplia distribución mundial y ha sido identificado como agente de mortalidad en distintas especies de pulgones entre los que cita a

A. fabae, coincidiendo con los resultados obtenidos en este estudio (KELLER, 2006). Cabe mencionar también que a diferencia de *P. neoaphidis*, que es especialista de pulgones, *C. coronatus* posee un amplio rango de hospedadores y ha sido aislado además de detritos (KELLER, 2006). Este hecho se suma a que estudios realizados señalan su poten-

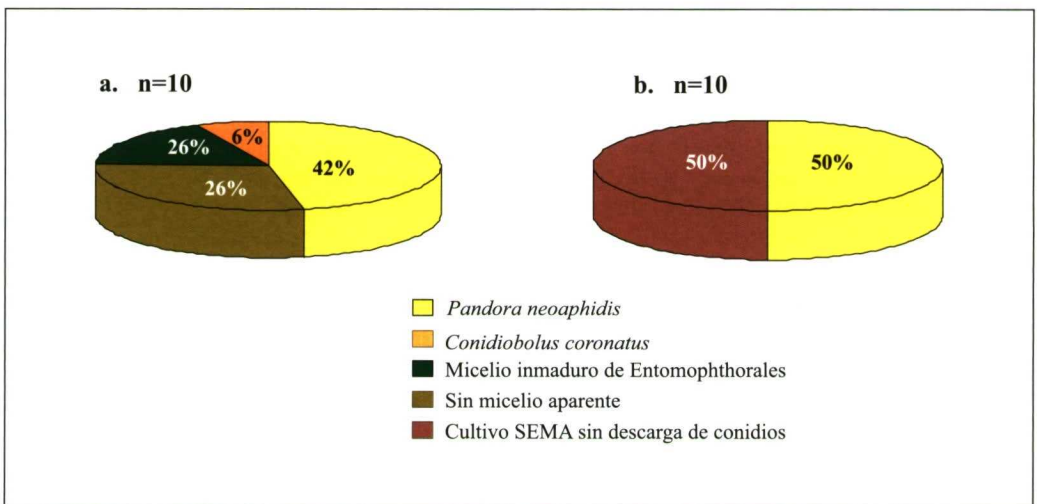


Fig. 4. Incidencia de hongos entomopatógenos en *Macrosiphum euphorbiae* y *Nasonovia ribisnigri* en cultivo de lechuga en La Poveda (Madrid).

cial patogenicidad hacia el ser humano y otros animales (SUTTON *et al.*, 1998), causando alergias e infecciones respiratorias con lo cual no es posible su uso en el Control Biológico de plagas.

En el muestreo realizado en el año 2007 no se detectaron focos de pulgones en cultivos de repollo y lechuga (Cuadro 1) a excepción del de acelga en invernadero donde se registraron pequeños focos de *A. fabae* sin evidenciar la presencia de hongos entomopatógenos. Una situación similar se registró en el cultivo de lechuga al aire libre de La Poveda, donde no se registraron prácticamente presencia de pulgones desde su transplante en setiembre hasta la cosecha en noviembre, lo cual no permitió tener datos sobre los enemigos naturales presentes en este ciclo de producción.

De los resultados obtenidos se concluye que la especie *P. neoaphidis* fue la más frecuente y abundante afectando a los pulgones presentes en los cultivos hortícolas de la región de estudio. La especie *P. neoaphidis* junto a *E. planchoniana*, *Conidiobolus obscurus* (Hall & Dunn) y *Neozygites frenesii* (Nowakowski) Remaudière & Keller, poseen el mayor impacto sobre los pulgones presentes en diferentes sistemas agrícolas de Europa Central (BARTA, 2004). En otros agroecosistemas hortícolas del mundo, como los de la región central de Argentina, *P. neoaphidis* fue determinada como la especie con mayor abundancia en diferentes cultivos y especies de pulgones, siendo mayor su prevalencia en el otoño y primavera y menor en invierno y verano (SCORSETTI *et al.*, 2007).

Cuadro 1. Características de los cultivos hortícolas y especies de pulgones presentes en las localidades de muestreo

Localidad: Villa del Prado		Año: 2006	
Cultivo	Ciclo de producción	Modo de producción	Especie de pulgón
Acelga	Primavera	Invernadero	<i>Aphis fabae</i>
Pepino	Primavera	Invernadero	<i>Aphis gossypii</i>
Repollo	Primavera	Aire libre	<i>Brevicoryne brassicae</i>
Calabacín	Otoño	Invernadero	<i>Aphis gossypii</i>
Acelga	Otoño	Invernadero	<i>Aphis fabae</i>
Calabaza	Otoño	Invernadero	<i>Aphis gossypii</i>
Judías	Otoño	Invernadero	<i>Aphis craccivora</i>
Berenjena	Otoño	Invernadero	—
Tomate	Otoño	Invernadero	—
Pimiento	Otoño	Aire libre	—
Coliflor	Otoño	Aire libre	<i>Brevicoryne brassicae</i>
Repollo	Otoño	Aire libre	—
Localidad: La Poveda		Año: 2006	
Cultivo	Ciclo de producción	Modo de producción	Especie de pulgón
Lechuga	Primavera/otoño	Aire libre	<i>Macrosiphum euphorbiae</i> <i>Nasonovia ribisnigri</i>
Localidad: Villa del Prado		Año: 2007	
Cultivo	Ciclo de producción	Modo de producción	Especie de pulgón
Acelga	Otoño	Invernadero	<i>Aphis fabae</i>
Repollo	Otoño	Aire libre	—
Localidad: La Poveda		Año: 2007	
Cultivo	Ciclo de producción	Modo de producción	Especie de pulgón
Lechuga	Primavera/otoño	Aire libre	—

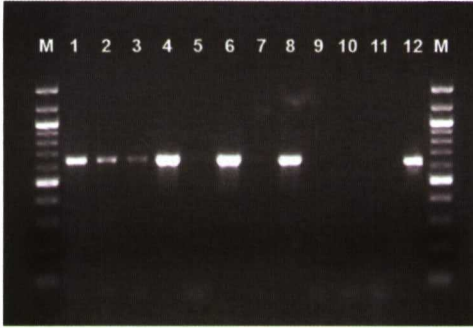


Fig. 5. Análisis molecular por PCR de la región ITS usando primers específicos (ITS4 e ITS1-E432) para *Pandora neoaphidis*. Muestras 1, 2, 3, 4, 5: *Macrosiphum euphorbiae*; 6, 7 y 8: *Aphis fabae*; 9: Control negativo; 10: Control positivo, *Entomophthora planchoniana*; 11: Control positivo, *Conidiobolus obscurus*; 12: Control positivo, *Pandora neoaphidis*, M: marcador de peso molecular.

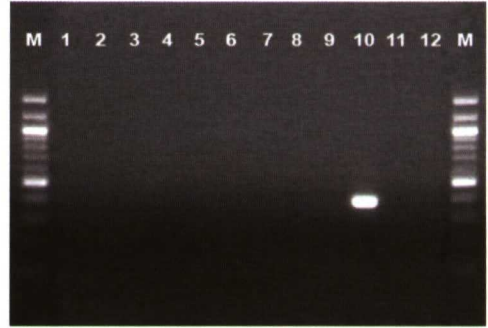


Fig. 6. Análisis molecular por PCR de la región ITS usando primers específicos (ML2 y 5,8-3') para *Entomophthora planchoniana*. Muestras 1, 2, 3, 4, 5: *Macrosiphum euphorbiae*; 6, 7 y 8: *Aphis fabae*; 9: Control negativo; 10: Control positivo, *Entomophthora planchoniana*; 11: Control positivo, *Conidiobolus obscurus*; 12: Control positivo, *Pandora neoaphidis*, M: marcador de peso molecular.

La identificación de *P. neoaphidis* obtenida por taxonomía clásica fue confirmada mediante técnicas moleculares de PCR. Así, cuando se amplificó la región ITS total se identificó a *P. neoaphidis* con una banda de ADN de alrededor de 1100 bp. Los alineamientos con la secuencia obtenida permitieron determinar un 100% de homología con el aislado ARSEF 1609 que fue aislada del pulgón *Acyrtosiphon pisum* en Francia y un 99% de homología con los aislados ARSEF 835, NW 415, NW 356, NW 316, NW 327, ARSEF 5374 y NW343, depositados todos en GenBank. Cuando se utilizaron primers específicos para *P. neoaphidis*, se logró amplificar una banda de ADN correspondiente a este hongo de alrededor de 650 bp en 6 de las 8 muestras estudiadas, las primeras 3 corresponden a *M. euphorbiae* colectados en primavera sobre lechuga en La Poveda y las 3 últimas a *A. fabae* colectados en otoño sobre acelga en Villa del Prado (Fig. 5). Cabe destacar que cuando las mismas muestras fueron analizadas utilizando primers específicos para *E. planchoniana* no se obtuvo amplificación en ninguna de ellas (Fig. 6), descartándose así la existencia de infecciones mixtas con estas dos especies de hongos. Si bien en este estudio no se ha iden-

tificado a *E. planchoniana*, este hongo ha sido encontrado parasitando a *N. ribisnigri* en lechuga y *A. fabae* en berenjena en sistemas hortícolas de Argentina (SCORSETTI *et al.*, 2007), lo cual indica que habría que seguir realizando muestreos en los cultivos hortícolas de la región central, así como otras regiones de España para determinar o descartar su presencia.

La obtención de aislados puros de *P. neoaphidis* presentó dificultad en muchos de los casos para obtener la descarga de conidios sobre el medio de cultivo artificial (SEMA), con lo cual un porcentaje de las muestras no pudieron ser identificadas, especialmente como se indica en las Fig. 2c, 3b y 4b. Mientras que cuando se realizó la descarga directa de conidios sobre un portaobjetos dentro de una cámara húmeda, los mismos fueron obtenidos sin dificultad y luego fueron transferidos a placas de Petri con medio SEMA a fin de obtener un cultivo puro. De todas las muestras (50 individuos) se obtuvieron solo 3 cultivos puros de *P. neoaphidis* a partir de *A. fabae* en cultivos de acelga de otoño en la localidad de Villa del Prado, que se conservan en la colección de hongos entomopatógenos del ICA-CCMA-CSIC (Madrid) junto con ejemplares de distintas especies de pul-

gones infectados con *P. neoaphidis* conservados como material de herbario. Por ello, se aconsejaría realizar este paso previo al aislamiento para obtener mayor probabilidad de aislar a *P. neoaphidis*, aunque esta especie está considerada en la literatura como una de las que puede ser aislada de la mayoría de las especies de pulgones, mientras que de algunas pocas como *Brevicoryne brassicae* (L.) no es posible (KELLER, 1991). En nuestro caso hemos tenido dificultad de obtener aislados partiendo de otras especies de pulgones, por causas que no han podido ser determinadas.

Ante la dificultad presentada por los hongos Entomophthorales para su aislamiento y por consiguiente su posterior producción masiva, la estrategia del Control Biológico por Conservación es la más recomendable para favorecer e incrementar el desarrollo de epizootias y por consi-

guiente reducir las poblaciones de pulgones plaga en hortícolas.

AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Educación y Ciencia de España por financiar el proyecto AGL-2005-01449/AGR y al Programa de Promoción de Colaboración Internacional del CSIC con Instituciones Científicas Extranjeras, que me permitió realizar una estancia en el Laboratorio de Ecología y Biología Molecular de la Faculty of Life Sciences de la Universidad de Copenhague, donde se realizaron parte de los estudios moleculares. Se agradece la colaboración prestada por los Dres. J. Eilenberg y A. Jensen, de la Universidad de Copenhague, así como la asistencia técnica de M. del Mar de la Torre del ICA-CCMA-CSIC y C. Wolsted de la Universidad de Copenhague.

ABSTRACT

DÍAZ B. M., C. C. LÓPEZ LASTRA, M. OGGERIN, A. FERERES, V. RUBIO. 2008. Identification of entomopathogenic fungi attacking aphids in horticultural crops in the central region of the Iberian Peninsula. *Bol. San. Veg. Plagas*, **34**: 287-296.

The aim of this work was to identify entomopathogenic fungi attacking different aphid species in several horticultural crops cultivated in the central region of the Iberian Peninsula. Surveys were conducted in open-grown crops and in greenhouse crops, during the Spring 2006 and the Autumn 2006 and 2007. For identification of the samples, fungal structures were mounted and stained in aceto-orcein (1%). Isolation was made using an artificial media; Sabourand dextrose agar + 1% yeast extract + egg yolk and milk.

Fungi belonging to the order Entomophthorales. *Pandora neoaphidis* (Remaudière & Hennebert) Humber was determined as the predominant specie affecting *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) and *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) on lettuce, *Aphis fabae* (Scopoli) on chard in Spring and Autumn and *Aphis gossypii* (Glover) on cucumber in Spring and zucchini during the Autumn growing season. Also, the species *Conidiobolus coronatus* (Constantin) was found attacking *A. fabae* collected on swiss chard during Spring and on *M. euphorbiae* in lettuce crops during Autumn.

The results obtained by classical taxonomy were confirmed by molecular techniques, by amplification of the ITS region, using general and specific primers for *P. neoaphidis*. In the same samples no amplification products were obtained when specific primers for *Entomophthora planchoniana* Cornu were used, concluding that no mixed infections were found.

Only three pure cultures of *P. neoaphidis* were obtained from *A. fabae*. Therefore, Conservation Biological Control is the most recommended strategy for managing aphid pests in horticultural systems due to problems related to isolation and artificial production of this group of fungi.

Key words: Entomophthorales, *Pandora neoaphidis*, *Conidiobolus coronatus*, Aphididae, PCR, Biological Control.

REFERENCIAS

- BALAZI, S. 1993. Flora of Poland. Fungi (Mycota), vol. 24., Entomophthorales. Polish Academy of Sciences, 356 pp.
- BARTA, M. 2004. Fungi of the order Entomophthorales infecting aphids in Slovakia. PhD Tesis. Slovak University of Agriculture, Nitra.
- GARDES, M., BRUNS, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* **2**, 113-118.
- HUMBER, R. A. 1997. Fungi: Identification. In: Lacey L. ed. Manual of Techniques in insect pathology. San Diego, California. Academic Press.
- KELLER, S. 1987. Arthropods-pathogenic Entomophthorales in Switzerland. I. *Conidiobolus*, Entomophaga and Entomophthora. *Sydowia* **40**: 122-167.
- KELLER, S. 1991. Arthropods-pathogenic Entomophthorales in Switzerland. II. *Erynia*, *Eryniopsis*, *Neozygites*, *Zoophthora* and *Tarichium*. *Sydowia* **43**: 39-122.
- KELLER, S. 2006. Species of Entomophthorales attacking aphids with description of two new species. *Sydowia*, **58**(3): 38-74.
- LÓPEZ LASTRA, C. C., SCORSETTI, A. C. 2007. Revisión de los hongos Entomophthorales (Zygomycota: Zygomycetes) patógenos de insectos de la República Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* **42**(1-2): 33-37.
- MILNER, R. J. 1997. Prospects for bioinsecticide for aphid control. *Entomophaga* **42**(1-2): 227-239.
- MOORE, E. R. B., ARNSCHIEDT, A., KRÜGER, A., STRÖMPL, C., MAU, M. 1999. Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. In *Molecular Microbial Ecology Manual*, pp. 1.6.1.1-1.6.1.15. edited by A.D.L. Akkermans, J.D van Elsas & F.J. de Bruijn. Dordrecht: Kluwer Academic.
- MORALES, I., AGUADO, J. M., NEBREDÁ, M., DÍAZ, B. M., ROMERO, A., PINEDA, A., MARCOS-GARCÍA, M. A., FERERES, A. 2006. Enemigos naturales de pulgones en cultivos de lechuga en la región de Madrid. *Cuadernos CIBIO*, Universidad de Alicante, **21**(2): 15-19.
- MORALES, I., AGUADO, J. M., DÍAZ, B. M., NEBREDÁ, M., LOPEZ-LASTRA, C., GOLDARAZENA, A., SÁNCHEZ, J. A., PINEDA, A., MARCOS-GARCÍA, M. A., FERERES, A. 2007. Principales agentes de biocontrol de pulgones en cultivos de lechuga en la zona centro de España. Consideraciones sobre su conservación. *Horticultura* **201**: 46-49.
- NIELSEN, C. 2002. Interaction between aphids and entomophthorean fungi. Characterisation, epizootiology and potencial for microbial control. Ph.D Tesis, Royal Veterinary and Agricultural University of Copenhagen, Denmark.
- PAPIEROK, B., HAJEK, A. E. 1997. Fungi Entomophthorales. In: Lacey L. (ed.) *Manual of Techniques in insect pathology*. San Diego, California. Academic Press. p. 187-211.
- RUIJKEMA, S., GOLUBIC, D., MOLKENBOER, M., VERBEK-DE KRUIF, SCHELLEKENS, J. 1996. Identification of four groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis region of northern Croatia. *Experimental and Applied Acarology* **29**: 23-40.
- SCORSETTI, A. C., HUMBER, R. A., GARCÍA, J. J., LÓPEZ LASTRA, C. C. 2007. Natural occurrence of entomopathogenic fungi (Zygomycota: Entomophthorales) of aphid (Hemiptera: Aphididae) pests of horticultural crops in Argentina. *BioControl* **52**(2): 641-655.
- STEINKRAUS, D. C. 2006. Factors affecting transmission of fungal pathogens of aphids. *J. Invertebr. Pathol.* **92**: 125-131.
- SUTTON, D. A., A. W. FOTHERGILL, RINALDI, M.G. 1998. *Guide to Clinically Significant Fungi*, 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- TYMON, A. M., SHAH, P. A., PELL, J. K. 2004. PCR-based molecular discrimination of *Pandora neoaphidis* isolates from related entomopathogenic fungi and development of species-specific diagnostic primers. *Mycol. Res.* **108**: 419-433.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, White, T.J. (Eds.) *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press Inc. San Diego, California. pp. 315-322.

(Recepción: 11 febrero 2008)

(Aceptación: 29 abril 2008)