

Zoophthora radicans* (BREFELD) BATKO CAUSANTE DE EPIZOOTIAS EN *Empoasca fabae* (HARRIS)*✉ Humberta Gloria Calyecac-Cortero¹, Nery Javier Zapata-Montes² y Andrés Miranda-Rangel¹.**¹Laboratorio de Micro y Mesofauna del Suelo del Área de Biología, Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carretera México-Texcoco. CP. 56230.²Maestría en Protección Vegetal, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo,

✉ Correo: hcalyecac@yahoo.com

RESUMEN. Se realizaron muestreos dirigidos en noviembre del 2012, 2013 y 2014 en higuierilla, para determinar el porcentaje de mortalidad de *Empoasca fabae* micozadas y coleccionar el hongo entomopatógeno. Se identificó morfológicamente y molecularmente al hongo *Zoophthora radicans* causante de epizootia en *E. fabae*. Se obtuvo un porcentaje máximo de mortalidad de 23% en 2012; 67% en 2013 y 6% en 2014; influenciados por la temperatura, la humedad relativa y la precipitación pluvial. Se encontraron conidios primarios de 15-30 µm; conidios secundarios similares a los primarios pero más pequeños, de 11-19 µm; capiliconidios alargados, fusiformes de 17-22 x 5-6 µm. Con base a las características morfológicas del hongo se concluye que la especie causante de epizootia en *E. fabae* es *Z. radicans*.

Palabras claves: Mortalidad, *Empoasca fabae*, *Zoophthora radicans*, hongos entomopatógenos.

***Zoophthora radicans* (Brefeld) batko causing epizooties in *Empoasca fabae* (Harris)**

ABSTRACT. To determine the percentage of mortality of leafhopper *Empoasca fabae* affected by fungus and to collect the entomopathogenic fungus, targeted sampling was conducted annually in the month of November 2012-2014 on castor oil plants. *Zoophthora radicans* fungus causing epizootic in *E. fabae* was identified morphologically and molecularly. The highest mortality rate found in 2012 was 23%, 67% in 2013 and 6% in 2014, influenced by temperature, relative humidity and rainfall. Primary conidium of 15-30 µm was found; similar to but smaller than primary, secondary conidia of 11-19 µm; elongated, fusiform Capilliconidia of 17-22 x 5-6 µm. Based on the morphological characteristics of the fungus it was concluded that the species causing epizootic in *E. fabae* was *Z. radicans*.

Keywords: Mortality, *Empoasca fabae*, *Zoophthora radicans*, entomopathogenic fungus.

INTRODUCCIÓN

Dada la presión de la inminente pérdida de los combustibles fósiles, hay un esfuerzo global para desarrollar nuevas fuentes de generación de energía a través de tecnologías alternativas. Una tecnología complementaria, que actualmente recibe una atención considerable, dado su potencial de impacto local, es la producción sustentable y uso de biocombustibles, particularmente si estos contribuyen a la reducción de las emisiones de carbono (EIA, 2004). Como parte del Plan Nacional de Energía en México, en la actualidad la promoción de la producción de higuierilla (*Ricinus communis* L.), que se encuentran en forma silvestre en casi todo el país, puede ser una planta con muy buenas proyecciones de comercialización (SENER, 2007). Esta planta es de fácil manejo y adaptación al clima árido y semiárido, con suelos poco aptos para cultivos más exigentes. Además, el aceite de higuierilla es rico en ácido ricinoléico (87 a 91%), esto le confiere el más alto y estable índice de viscosidad entre todos los aceites

vegetales (Zamora *et al.*, 2011). La higuera está siendo estudiada y sembrada masivamente en diferentes zonas de México por lo que se busca estudiar los insectos asociados a la misma, sus enemigos naturales y las posibles alternativas de manejo de insectos plaga. En base a esto, el objetivo de éste trabajo es determinar y caracterizar morfológicamente al hongo entomopatógeno causante de epizootia en *Empoasca fabae* Harris que se encuentran desarrollándose en *R. communis*, además de cuantificar la mortalidad que provoca el *Zoopthora radicans* (Brefeld) Batko. El hongo entomopatógeno podría ser utilizado para brindar una alternativa de manejo de este organismo, que es plaga en otros cultivos y que podría llegar a serlo de la higuera.

MATERIALES Y MÉTODOS

El área de estudio se encuentra ubicada en el Campo Experimental San Ignacio, del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, en la región oriente del Estado de México, con las siguientes coordenadas: 19°29'15.21"N, 98°53'34.18"O y con una Altitud: 2,250 msnm. En esta parcela experimental se cuantificaron 1 200 plantas de *R. communis*.

Muestreo de *Empoasca fabae* en cultivo de higuera. En noviembre de 2012, 2013 y 2014, se realizaron muestreos dirigidos en el envés de cinco hojas tomadas al azar, de una planta tomada cada cinco plantas, dejando un surco de por medio y sin muestrear las cinco primeras plantas así como los surcos de cada orilla. Se contaron el número de chicharritas vivas, chicharritas muertas micozadas y muertas no micozadas. Se colectaron insectos micozados, en bolsas de papel y en cajas plásticas ventiladas, junto con la planta hospedera a la cual estaban adheridos, según la metodología de Keller (1987), para ser transportados al Laboratorio de Micro y Mesofauna del Suelo de Área de Biología de la Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

Agente causal de epizootia en *Empoasca fabae*. Se procedió a la identificación de los patógenos, a través de análisis macroscópico, donde fueron observadas todas las características físicas y el estado micótico del insecto. Anotadas las observaciones básicas externas; algunos ejemplares representativos fueron colocados en "cámara húmeda" por períodos de tiempo variables (Keller, 1993). Posteriormente se procedió al análisis microscópico de las muestras, donde los conidios proyectados en cámara húmeda fueron teñidos con LPAO (Lactofenol-Aceto-Orceina) según Keller, (1987), para la respectiva detección nuclear y caracterización de las mismas. También se recogieron muestras de tejido interno abdominal y de la propia micosis externa de los cadáveres, con la finalidad de reconocer otras estructuras características de estos patógenos, tales como conidióforos y cuerpos hifales. Este material también fue teñido con (LPAO) (Sánchez 1995).

Aislamiento del hongo. Este se realizó por dilución seriada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}). El aislamiento se obtuvo directamente del hongo a partir del cuerpo del insecto, con una pinza seca y estéril, se toma el insecto esporulado, desinfectado y se agitó con movimientos verticales así como horizontales, sobre la superficie del medio de cultivo.

Determinación y caracterización morfológica de *Zoopthora radicans*. La determinación y caracterización morfológica del hongo se realizó usando cinco individuos de chicharritas montadas en lactofenol azul. Para la medida de conidios se tomaron al azar, del cuerpo de los

insectos infectados de 20 a 30 conidios primarios, y se midieron con un microscopio de contraste de fase a magnificación de 400 X. Se observaron otros caracteres morfológicos tales como tipo de rizoide, conidióforos, y conidiación del hongo.

Calculo de la incidencia de *Zoophthora radicans*. La incidencia del hongo fue calculada como el número de chicharritas infectadas divididas entre el total de individuos muestreados. Se midió constantemente la temperatura, humedad relativa y precipitación en la estación móvil.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación y caracterización morfológica del hongo entomopatógeno corresponde a *Z. radicans*. Los conidióforos son generalmente ramificados digitalmente. Los conidios primarios y secundarios son hialinos, uninucleados, y elongados con extremos redondeados, con una papila apical basal y de simetría bilateral. El tamaño del conidio primario de 15-30 μm , el conidio secundario de 11-19 μm . El crecimiento de la colonia del hongo en yema de huevo tiene un aspecto rugoso, se desarrolla en Agar-Glucosa-Sabouraud, donde germinan las esporas de reposo y los conidios son menos abundantes. Los capiliconidios son alargados, fusiformes, con simetría bilateral o amigdaliformes, mide 17-22 x 5-6 μm . Las esporas de reposo son esféricas, café claro, de pared gruesa, aparentemente lisas, contienen gránulos finos y opacos, con un glóbulo central parecido a una gota de aceite, miden de 21 a 32 μm (Remaudière *et al.*, 1976; Humber, 1998).

En el año 2012 se observó mayor incidencia de *Z. radicans* en las plantas ubicadas en la parte central de la parcela experimental, con un 23%, seguido de las plantas aledañas con un 17%. Para el año 2013 se observó que el porcentaje de incidencia aumentaba en las zonas donde las plantas eran de mayor porte (2 a 2.5 m de altura) y se encontraban ubicadas después de ocho plantas del surco y después de tres surcos, el porcentaje de chicharritas micozadas fue del 50 y 48 %. En las plantas de la región central del cultivo, independientemente del tamaño de la planta, se observó el porcentaje más alto de incidencia de *Z. radicans* con un 62 y 67 % sobre *E. fabae*. Las condiciones ambientales y la presencia de plantas arvenses permitieron mantener un microclima favorable para el establecimiento y desarrollo de la epizootia (Figura 1).

En el año 2014 las condiciones ambientales no favorecieron el establecimiento y desarrollo de *Z. radicans*, solo se presentó el 6 % de *E. fabae* micozadas en una planta muestreada. Cabe señalar que para este año se realizaron actividades culturales de manejo dentro de la plantación de higuera como la eliminación de plantas arvenses y eliminación de plantas atípicas dentro del surco disminuyendo de esa manera la densidad de plantas en un 30 a 40%, ya que se está seleccionando clones para su reproducción en proyecto llevado a cabo por la Universidad Autónoma Chapingo. Por tal razón se encontró un bajo porcentaje de chicharritas micozadas y en cambio hubo un alta % de chicharritas vivas con un promedio de 68 %. Wraight *et al.* (1990) han documentado las condiciones ambientales necesarias para la progresión de *Z. radicans* a través de ciertas etapas en su ciclo de vida utilizando *E. kraemeri* como hospedante, y Galaini-Wraight *et al.*, (1991) han caracterizado los factores abióticos que sostienen las epizootias de *Z. radicans* sobre poblaciones de *E. fabae* y *E. kraemeri*. Por tal razón se han estudiado *E. fabae* y factores abióticos como, temperatura, humedad relativa y precipitación, para caracterizar la progresión de *Z. radicans* en el área de estudio.

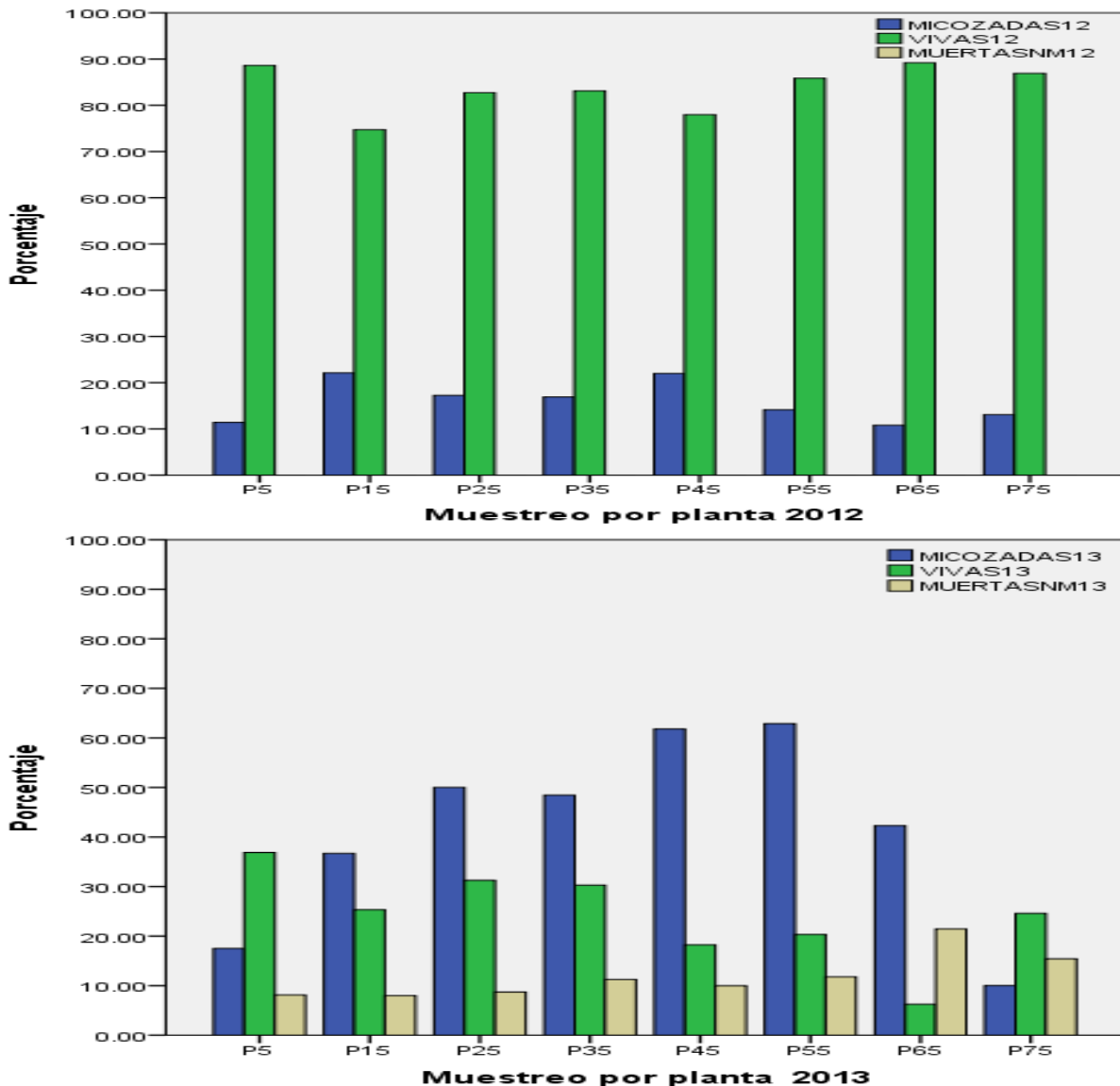


Figura 1. Porcentaje de incidencia de *Empoasca fabae* miconozadas, chicharritas vivas y muertas no miconozadas desarrollándose sobre *Ricinus communis* en el año 2012 y 2013.

Condiciones climáticas que afectaron la incidencia de *Z. radicans* en el área de estudio. En la Figura 2 se observa que para el año 2012 en el mes de noviembre la temperatura promedio fue de 16.4 °C, con una humedad relativa del 53 %, y 4.8 mm de precipitación. Las precipitaciones en los tres meses anteriores al muestreo fueron en promedio de 27.7 mm, proveyendo de esta manera humedad necesaria para el establecimiento de la epizootia en el área de estudio con un 23 % de incidencia en un sitio de muestreo en este año. Remaudiere *et al.*, (1976) mencionan que las condiciones ambientales presentes pueden hacer que los conidios primarios germinen llevando a la invasión del hospedante o que formen uno de dos tipos de conidios secundarios.

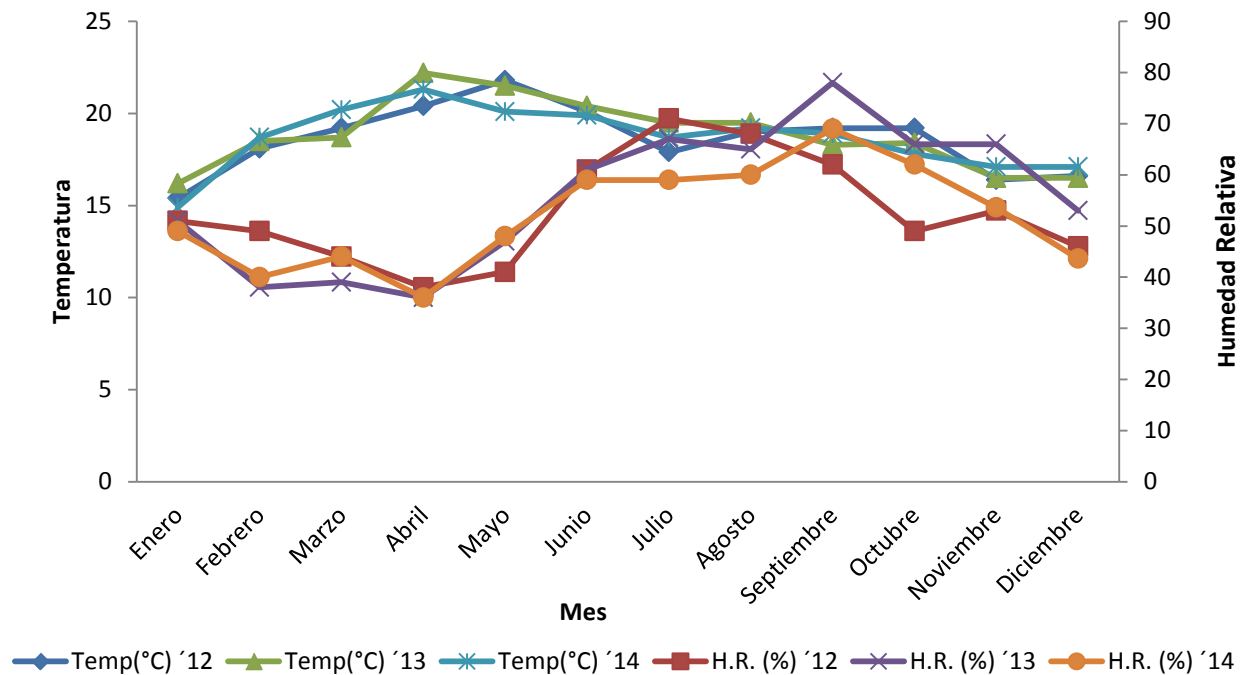


Figura 2. Temperaturas y humedad relativa presentes en el área de estudio en los años 2012, 2013 y 2014.

Para el año 2013 en el área de estudio se presentaron durante el mes de noviembre una temperatura promedio de 16.5 °C, humedad relativa del 66 % y 14.4 mm de precipitación. Las precipitaciones en los tres meses anteriores al muestreo fueron en promedio de 60.5 mm; comparando en el año anterior hubo mayor precipitación y mayor humedad relativa en este año por lo que permitió que la epizootia de *Z. radicans* aumentara su incidencia sobre *E. fabae*, mostrando un máximo de 67% de incidencia en uno de los sitios de muestreo. Durante el año 2013 se presentaron las condiciones climáticas adecuadas junto con una amplia cobertura del suelo por plantas arvenses que mantuvieron el microclima adecuado para el desarrollo de *Z. radicans*. Millstein *et al.*, (1982) mencionan que *Z. radicans* y otros hongos Entomophthorales requieren períodos de humedad relativa alta para la conidiogénesis, descarga de esporas e invasión de hospedantes susceptibles.

En noviembre de 2014, el área de estudio presentó una temperatura promedio de 17.1 °C, humedad relativa del 53.6 %, y 0.05 mm de precipitación. Las precipitaciones en los tres meses anteriores al muestreo fueron en promedio de 51.3 mm; comparando los años anteriores la precipitación fue mayor que en el 2012 y menor que en el 2013 al igual que la humedad relativa, teniendo diferencias en la densidad de plantas ya que se realizaron prácticas culturales dentro del área de estudio realizando raleos y eliminación de plantas arvenses, todo ello contribuyó en variar las condiciones presentes del microclima, aumento de la incidencia de rayos UV dentro del área de estudio así como el aumento de la aireación afectando el desarrollo de *Z. radicans*. Uziel y Kenneth (1991) y Cañedo *et al.*, (2004) confirman que el desarrollo de los Entomophthorales se ve afectado por temperaturas extremas, desecación y luz ultravioleta. Por tal razón durante el año 2014 hubo una casi nula incidencia de *Z. radicans* sobre *E. fabae* encontrándose en promedio un 78 % de chicharritas vivas. La germinación de la espora es favorecido por una humedad alta (70% durante 14h), estas condiciones no se cumplieron en el año 2014 por lo que imposibilitó el

desarrollo de *Z. radicans* en el área de estudio. De igual forma que la deshidratación, exposición a luz solar o inactivación por temperaturas extremas u otros eventos pudieron causar una interrupción fatal del proceso de transmisión de la enfermedad (Millstein *et al.*, 1982).

A su vez Remaudiere *et al.*, (1976) indican que las condiciones ambientales presentes durante la descarga de los conidios primarios pueden afectar la duración y el éxito de la dispersión de esporas.

CONCLUSIONES

De acuerdo con las características morfológicas presentes en el hongo se concluye que la especie causante de epizootia en *Empoasca fabae* fue el hongo *Zoophthora radicans* que presentó un máximo porcentaje de mortalidad a causa de *Z. radicans* del 23 % en el año 2012, un 67 % en el año 2013 y solo una planta con 6% en el 2014.

Las condiciones climáticas y de manejo del cultivo, en el año 2014, no fueron las adecuadas para desarrollo del hongo entomopatógeno, disminuyendo el éxito de la dispersión de esporas y del desarrollo de la epizootia de *Z. radicans* sobre *E. fabae*.

LITERATURA CITADA

- Galaini-Wraight, S; Wraight, S. P.; Carruthers, R. I.; Magalhaes, B. P. y Roberts, D. W. 1991. Description of a *Zoophthora radicans* Zygomycetes: Entomophthoraceae) Epizootic in a Population of *Empoasca kraemeri* (Homoptera: Cicadellidae) on Beans in Central Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* 58: 31 I-326.
- Humber, R. A. 1998. Entomopathogenic fungal identification. USDA-ARS Plant Protection Research Unit US Plant, Soil & Nutrition Laboratory Tower Road Ithaca, NY 14853-2901. APS/ESA Joint Annual Meeting 8-12. Las Vegas, NV.
- International Energy Agency (IEA). 2004. Biofuels for transport An international perspective. París. Consultado el 9 de Septiembre 2014. Disponible en página web: <http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2004/biofuels2004.pdf>
- Keller, S. 1993. Working with arthropod-pathogenic Entomophthorales. IOBC/WPRS. Workshop. Working Group "Insect Pathogens and Insect Parasitic.
- Keller S. 1987. Arthropod-pathogenic Entomophthorales of Switzerland I. *Conidiobolus*, *Entomophaga* and *Entomophthora*. *Sydowia* 40: 122-167.
- Millstein, J. A., Brown, G. C., and Nordin, G. L. 1982. Microclimatic humidity influence on conidial discharge in *Erynia* sp. (Entomophthorales: Entomophthoraceae), an entomophthogenic fungus of the alfalfa weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* **11**, 1166–1169.
- Remaudière, G.; Keller, S.; Papierok, B. y Latgé, J. P. 1976. Considérations systématiques et biologiques sur quelques espèces d'entomophthora du groupe sphaerosperma pathogènes d'insectes (Phycomycetes: Entomophthoraceae). *Entomophaga* 21: 163-177.
- Sánchez, S. E. M. 1995. Reconocimiento, caracterización e incidencia natural de hongos entomopatógenos del orden Entomophthorales (zygomycotina; zygomycetes) en Andalucía. Tesis Doctoral. Córdoba (España): Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes (ETSIAM). 204 p.
- Secretaría de Energía (SENER). 2007. Plan Nacional de Energía. Consultado el 10 de Septiembre 2014. <http://www.sener.gob.mx/webSener/portal/index.jsp?id=57>

- Uziel, A., and Kenneth, R. G. 1991. Survival of primary conidia and capilliconidia at different humidities in *Erynia* (subgen. *Zoophthora*) spp. and in *Neozygites fresenii* (Zygomycotina: Entomophthorales), with special emphasis on *Erynia radicans*. *J. Invertebr. Pathol.* **58**, 118–126.
- Wraight, S. P., Butt, T. M., Galaini-Wraight, S., Allee, L. L., Soper, R. S., and Roberts, D.W. 1990. Germination and infection processes of the entomophthoralean fungus *Erynia radicans* on the potato leafhopper, *Empoasca fabae*. *J. Invertebr. Pathol.* **56**, 157–174.
- Zamora, F.; N. Durán, M. Medina, D. Torres, Y. Acosta, R. Moreno, A. Silvestre, A. Sánchez, P. Zamora y J. Frank. 2011. Comportamiento agronómico de cultivares de tártago (*Ricinus communis* L.) en el sector Cubana, municipio Falcón, estado Falcón, Venezuela. *Multiciencias* **11**: 129-135.