
**EFFECTO COMPARATIVO DE LA VIRULENCIA DE LOS HONGOS
APHANOCLADIUM ALBUM (Preuss) Gams Y TOLYPOCLADIUM
CYLINDROSPORUM Gams (DEUTEROMYCOTINA- HYPHOMYCETES),
CONTRA LARVAS DE MOSQUITO (DIPTERA, CULICIDAE).***

Claudia Cristina Lopez Lastra A
Juan José García G., Guillermo Raúl Reboredo O

CEPAVE (Centro de estudios Parasitológicos y de Vectores, UNLP).
Calle 2 # 584-1900 La Plata Argentina.

Palabras Clave: Virulencia, *Aphanocladium album*, *Tolyposcladium cylindrosporum*, larvas de *Culex pipiens*

Keys word: Virulence, *Aphanocladium album*, *Tolyposcladium cylindrosporum*, *Culex pipiens* larvae

RESUMEN

El presente trabajo ha sido realizado con el objeto de evaluar el efecto potencial patogénico de conidios y blastosporas de *Aphanocladium album* y *Tolyposcladium cylindrosporum* contra larvas de *Culex pipiens* L.

Un alto porcentaje de mortalidad larval se observó frente a las 2 especies fúngicas, siendo para *A. album*, 85,6% y para *T. cylindrosporum* 80%, con dosis de 1×10^6 conidios/ml.

En *A. album* la actividad de blastosporos y conidios fué similar, mientras que para *T. cylindrosporum* fueron más virulentos los conidios que las blastosporas.

De los resultados obtenidos se deduce que ambas especies fúngicas tienen una elevada virulencia contra larvas de *C. pipiens* y sus potencialidades patogénicas justifican nuevos estudios sobre este tema.

INTRODUCCION

Varias especies fúngicas son consideradas como agentes potenciales para el control de mosquitos, entre ellas se pueden citar a *Coelomomyces spp*, *Culicinomy-*

SUMMARY

[Comparative study of Virulence of Fungi: *Aphanocladium album* (Preuss) Gams and *Tolyposcladium cylindrosporum* Gams (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Against mosquitoes larvae (Diptera : Culicidae)].

The present work evaluates the pathogenic potential effect of conidia and blastospores in fungi *Aphanocladium album* and *Tolyposcladium cylindrosporum* against *Culex pipiens*, larvae. A high larval percentage of mortality was observed in both fungi species. At a dosage of 1×10^6 conidia/ml, was 85.6% for *A. album*, and 80% for *T. cylindrosporum*.

A similar activity was observed between conidia and blastospores for *A. album* while for *T. cylindrosporum* it was more virulent conidia than for blastospores.

Finally results revealed that both fungi species have a high virulence against *C. pipiens* larvae, so that their pathogenic potential would justify new studies on this subject.

ces clavispurus, *Metarhizium anisopliae*, *Tolyposcladium cylindrosporum* y *Lagenidium giganteum* (Riba et al. 1986).

Tolyposcladium cylindrosporum fue citado como patógeno de insectos, particularmente de larvas de

*Trabajo subsidiado por UNDP/WORLD BANK/WHO. Special programme for the research and training in tropical diseases. ID 890076

mosquitos por Soares et al. (1979) y Weisser & Pillai (1981). Su patogenicidad fue comprobada para varias especies de culicidos por Pinnock et al. (1973), Soares et al. (1979), Soares et al. (1985), Weiser y Pillai (1981), Yu et al. (1980) y Goettel (1987 a y b.).

A pesar de que han sido realizados pocos estudios referentes a su aplicación en el campo (Gardner et al. (1986) y Pillai, 1987, Goettel 1987), los ensayos de laboratorio revelan que esta especie puede ser un potencial agente de control de mosquitos (Soares, 1982, Weisser y Pillai, 1981, Riba et al., 1986, Gottle, 1987).

Respecto de *Aphanocladium album*, no ha sido evaluado hasta el presente como agente patógeno de mosquitos, sólo se ha citado como patógeno de adultos de *Aedes albifasciatus* en Argentina (López Lastra, 1990) y existen estudios preliminares (aún no publicados) a fin de comprobar la viabilidad de esta especie y *T. cylindrosporum*, bajo condiciones variables de temperatura y salinidad.

El presente trabajo ha sido realizado con el objeto de evaluar el efecto patógeno de *A. album*, comparándolo en su virulencia con un aislamiento de *T. cylindrosporum* (obtenido de suelo de la Antártida), el cual ha sido evaluado en pruebas de patogenicidad preliminares contra larvas de *Culex pipiens*, en condiciones controladas de laboratorio, a fin de considerar la perspectiva de su posterior aplicación y evaluación en pruebas de campo.

MATERIAL Y METODOS

Para la realización de los bioensayos se procedió de igual forma con conidios y blastosporas de *Toly-pocladium cylindrosporum*, aislado de suelo de Antártida (NT.c.3.4. Colección Micológica CEPAVE) y con *Aphanocladium album* aislado a partir de adultos de *Aedes albifasciatus* (N.A.a.1.7. Col. Mic. CEPAVE).

Para cada prueba se emplearon lotes de 10 larvas de segunda estadio de *Culex pipiens*, procedentes de la colonia instalada en el CEPAVE (Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores), las que fueron colocadas en recipientes de plástico de 3 cm. de diámetro por 8 cm. de altura, conteniendo 10 ml. de agua destilada. Las larvas fueron alimentadas con alimento para peces (previo molido ultrafino). Cada lote fué tratado con diferentes concentraciones de conidios y blastosporas. Las dosis empleadas fueron 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , y 1×10^8 esporas por ml.

Cada ensayo contó con un testigo, al que se agregó agua destilada estéril pura, realizándose 5 repeticiones de cada ensayo. Todos los recipientes con las larvas se mantuvieron a 25° C y 80% de H.R. El control de la mortalidad larval fué efectuado cada 24 horas durante

16 días, extrayéndose las larvas muertas para comprobar su causa. Las infecciones fúngicas se detectaron bajo microscopio óptico con contraste de fase.

Los conidios de ambas especies fúngicas se obtuvieron a partir de cultivos realizados en cápsulas de Petri con 10 ml. de medio Sabouraud dextrosa agar, con 2% de extracto de levadura (SDA-Y), incubados a 25° C durante 10 días. Los conidios fueron extraídos de la superficie del cultivo con un pincel de pelo de marta estéril, preparándose con ellos una suspensión en agua destilada estéril, la que fué homogeneizada por agitación manual.

Las blastosporas de ambas especies se cultivaron en medio líquido Sabouraud Dextrosa caldo con 2% de extracto de levadura (SDA-Y) en Erlenmeyers, los que se mantuvieron en agitación permanente a 78 r.p.m. durante 7 días a 25° C. El número de esporas (conidios y blastosporas) se cuantificó con una cámara de Neubauer.

Se obtuvieron datos de mortalidad larval acumulada y la mortalidad final fué corregida por la fórmula Abbott (1925), el tiempo letal 50 (TL 50) se obtuvo método de Biever y Hostetter (1971) y la dosis letal 50 (DL50) por el método de Reed y Muench (1938).

RESULTADOS

Los datos obtenidos sobre la mortalidad de larvas, dosis letal 50 (DL 50) y el tiempo letal (TL 50) se expresan en tablas 1 y 2.

Los valores de DL 50 obtenidos con blastosporas y conidios de *A. album* fueron 1×10^3 blastosporas/ml y 1×10^3 conidios/ml respectivamente. El menor TL 50 para la misma especie fué 2.25 días a una dosis y 1×10^7 blas./ml y 2.97 días con 1×10^8 con./ml. Los mayores TL 50 obtenidos con blastosporas y conidios de *A. album* fueron de 11 y 12.6 días respectivamente, con dosis de 1×10^4 blas./ml y 1×10^3 con./ml. Se obtuvieron porcentajes de mortalidad de 100% en larvas expuestas a dosis de 1×10^7 blas./ml y 1×10^8 con./ml de *A. album* durante 5 y 14 días respectivamente.

Los resultados de los bioensayos realizados con blastosporas y conidios de *T. cylindrosporum*, fueron: DL 50: 5×10^4 blas./ml y 1×10^4 con./ml. respectivamente, siendo el menor TL 50 para blastosporas de 2.87 días con la dosis: 1×10^8 blas./ml y el mayor TL 50 de 15 días con 1×10^3 blas./ml. El menor TL 50 obtenido solamente con conidios de *T. cylindrosporum* fue de 3.26 días a una dosis de 1×10^8 con./ml, siendo el mayor TL 50 de 13 días con una dosis de 1×10^4 con./ml.

Se obtuvieron porcentajes de mortalidad de 100% con blastosporas de *T. cylindrosporum*, luego de 11 días

de exposición de las larvas a una dosis de 1×10^8 blas./ml., mientras que los porcentajes no superaron el 95% cuando se utilizó la misma dosis de conidios durante los 16 días que duró el ensayo.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Comparando la actividad de ambas especies fúngicas se observó un desarrollo más rápido de la infección con *A. album* que con *T. cylindrosporum* y en ambas especies fué mayor para blastosporas que para conidios presentando los dos hongos valores de DL 50 bajos, entre 1×10^3 y 1×10^4 esporas/ml.

Riba et al. (1986), evaluaron la patogenicidad de un aislamiento de *T. cylindrosporum* contra larvas de segundo estadio de *Aedes aegypti*, determinando la mayor actividad de las blastosporas que de los conidios a una dosis: 1×10^7 esporas/ml. para ambos casos, mientras que hallaron un TL 50 de 4.1 días para blastosporas contra 26.6 días para los conidios.

Gardner y Pillai (1987) determinaron las potencialidades de un aislamiento de *T. cylindrosporum* a partir de *Aedes australis* de Nueva Zelandia contra larvas de esa especie. Los autores demostraron el desarrollo más rápido de las infecciones con blastosporas (TL 50: 3.8 días) que con conidios (TL 50: 7.9 días), utilizando una dosis: 2×10^5 esporas/ml. La DL 50 determinada para las blastosporas de este aislamiento

varía entre 9.5×10^4 y 4.2×10^5 blas./ml, mientras que con los conidios correspondió a 3×10^6 con/ml., siendo menor a la determinada para el aislamiento antártico de *T. cylindrosporum* y para *A. album*. El TL 50 para las dosis mencionadas fué mayor para los aislamientos evaluados en el presente trabajo que para los resultados de *T. cylindrosporum* de Nueva Zelandia.

Soares y Pinnock (1984), evaluaron la infectividad de *T. cylindrosporum* aislado de *Aedes sierrensis* en California, USA, contra larvas de esa misma especie. En esos estudios también se demostró la mayor infectividad evidenciada por las blastosporas en relación a los conidios, obteniendo valores de TL 50 con ambos tipos de esporas, inferiores a los que presentaron los aislamientos citados previamente. El TL 50 fue el menor en relación a los aislamientos considerados, con valores bajos para blastosporas, de 5.6 días y 0.6 días para conidios y blastosporas respectivamente, con una dosis de 5×10^5 esporas/ml.

De la comparación de nuestros resultados con los obtenidos por otros autores que utilizaron distintos aislamientos de *T. cylindrosporum*, se deduce que la cepa de suelo antártico y *A. album*, requieren mayor número de días para el desarrollo de la infección, aunque los bajos valores de la DL 50 correspondientes a ambos tipos de esporas y los elevados porcentajes de mortalidad registrados, permiten considerar sus potencialidades como patógenos para el control biológico de mosquitos.

Tabla 1 Mortalidad larval de *Culex pipiens* con blastosporas y conidios de *Aphanocladium album*

DOSIS	T I E M P O (DIAS)						DL50	E.S.DL50	TL50
	Blast./ml	1	5	10	16	M.T.			
1MO3	0	0	60	60	60	58			10
1MO4	0	0	60	63	63	61			11
1MO5	0	50	60	65	65	63			9
1MO6	10	50	75	90	90	88			4.38
1MO7	30	70	70	100	100	98			2.25
1MO8	0	50	60	100	100	98			3
Control	20	0	0	20	20	0	1MO3	0.62	
Conid./ml									
1MO3	0	0	15	42	42	40			12.6
1MO4	0	10	28	68	68	66			10.4
1MO5	10	10	25	68	68	66			10.36
1MO6	0	26	65	86	86	83			6.05
1MO7	10	56	80	100	100	98			5.9
1MO8	10	100	100	100	100	98			2.97
Control	0	20	20	20	20	0	1MO3	0.81	

M.T. = Mortalidad larval total (%) M.C. = Mortalidad larval corregida % (Fórmula de Abbott) DL50 = Dosis letal 50 E.S. = Error standard T.L.50 = Tiempo letal 50 (días)

Tabla 2 Mortalidad larval de *Culex pipiens* con blastosporas y conidios de *Tolypocladium cylindrosporium*

DOSIS	T I E M P O (DIAS)									
	Blast./ml	1	5	10	16	M.T.	M.C.	DL50	E.S.DL50	TL50
1M03	0	0	20	27	27	26				15
1M04	0	0	30	30	30	29				13
1M05	0	0	30	70	70	69.5				8
1M06	0	0	80	80	80	80				6
1M07	40	50	90	90	90	90				6
1M08	50	70	80	100	100	100				2.9
Control	0	0	10	10	10			1M03	0.58	
Conid./ml										
1M03	0	0	40	53	53	52				11
1M04	0	0	10	60	60	59				13
1M05	0	0	20	70	70	69				10.9
1M06	0	10	45	80	80	79				10.2
1M07	0	20	80	92	92	92				5.8
1M08	0	55	82	95	95	95				3.3
Control	0	0	10	10	10			1M03	0.62	

M.T. = Mortalidad larval total (%) M.C. = Mortalidad larval corregida % (Fórmula de Abbott) DL50 = Dosis letal 50
E.S. = Error standard T.L.50 = Tiempo letal 50 (días)

REFERENCIAS

- 1.-Abbot, W. S., (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18:265-267.
- 2.-Biever, K. D. & Hosteter, D. L. (1971). Activity of the Nuclear Polyhedrosis virus of the Cabbage Looper evaluated at programmed temperature regimen Jour. Inv. Path. 18: 81-84.
- 4.-Gardner, J.M. & Pillai, J.S. (1987) *Tolypocladium cylindrosporium* (Deuteromycotina. Moniliales) a fungal pathogen of the mosquito *Aedes australis* III Fields trials against two mosquito species. Mycopathologia 97: 83-88.
- 5.-Gardner, J.M. & Ram, R.C., Kumar, S. & Pillai, J.S. (1986). Field trials of *Tolypocladium cylindrosporium* against larvae of *Aedes polynesiensis* breeding in crab holes in Fiji. J. Am. Mosq. Control. Assoc. 2: 292-295.
- 6.-Goettel, M.S. (1987 a) Preliminary field trials with the entomopathogenic Hyphomycete *Tolypocladium cylindrosporium* in Central Alberta. J. Am. Mosq. Contr. Assoc. 3: 239-245.
- 7.-_____ (1987 b). Studies on bioassay of the entomopathogenic Hyphomycete *Tolypocladium cylindrosporium* in mosquitoes. J. Am. Mosq. Control Assoc. 3 (4): 561-567.
- 8.-Lopez Lastra, C. C. (1990). Primer registro de *Aphanocladium album* (Deuteromycotina. Hyphomycetes) como patógeno de insectos en la República Argentina. Bol. Soc. Arg. Bot. 26 (3-4): 259-261.
- 9.-Lopez Lastra, C. C., Reboredo, G. R. & Spinedi, H. A. (1991). Primer registro de *Tolypocladium cylindrosporium* Gams (Deuteromycotina. Hyphomycetes) para la Antártida. Consideraciones preliminares sobre su patogenicidad en larvas de *Culex pipiens* L. (Diptera. Culicidae). Contrib. I.A.A. 392 11 p.
- 10.-Pinnock, D. E., García, R. & Cubbin, C. M. (1973). *Beauveria tenella* as a control agent for mosquito larvae. J. Inv. Path. 22: 143-147.
- 11.-Reed, L. J. & Muench, H. (1938). A simple method for estimate the end fifty percent point. Am. J. Hyg. 27 (3): 493-497.
- 12.-Riba, G., Keita, A. Soares, Jr. G. G. & Ferron, P. (1986). Comparative studies of *Metarhizium anisopliae* and *Tolypocladium cylindrosporium* as pathogens of mosquito larvae Jour. The AM. Mosq. Contr. Assoc. 2 (4): 469-473.
- 13.-Soares, Jr. G. G., Pinnock, D. E. & Samson, R.A. (1979) *Tolypocladium* a new fungal pathogen of mosquito larvae with promise for use in microbial control. Proceedings 47th Ann. Conf. Mosquit. and Vector Contr. Assoc. January 28-31. 1979.
- 14.-Soares, Jr. G. G. & Duddley, E. P. (1984). Effect of temperature on germination, growth and infectivity of the mosquito pathogen *Tolypocladium cylindrosporium* (Deuteromycotina, Hyphomycetes) Jour. of Inv. Path. 43,242-247.
- 15.-Soares, Jr., G. G., Riba, G., Caudal, A. & Vincent, J.J. (1985). Comparative studies of eleven isolates of the fungal entomopathogen *Tolypocladium cylindrosporium* and two isolates of *T. extinguens*. J. Inv. Path. 46: 115-120.
- 16.-Weisser, J. & Pillai, J. S. (1981). *Tolypocladium cylindrosporium* Gams (Deuteromycetes. Moniliales) a new pathogen of mosquito larvae. Entomophaga 26:357-361
- 17.-Yu, H., Cho, H.W. & Pillai J.S. (1980). Infection studies of mosquito pathogen *Culicicomyces* sp. against *Aedes* and *Culex* larvae. Korean J. Entomol. 10: 62-63.