

## Patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* sobre mosca blanca (*Bemisia tabaci*)\*

## Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on whitefly (*Bemisia tabaci*)

Emilio García Ramírez<sup>1,2,3§</sup>, Rafael Pérez Pacheco<sup>1</sup>, Bernardino Leonardo León Enríquez<sup>2</sup> y Lina Pliego Marín<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca (CIIDIR-IPN-Oaxaca), Calle Hornos # 1003, Colonia Indeco, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca. C. P. 71230. (951) 5170610, 51704 00 y 5171199. (rafaelperezpacheco@yahoo.com; linapliego@hotmail.com; ciidiroaxaca@ipn.mx). <sup>2</sup>Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca (ITVO), ex-hacienda de Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca. C. P. 71230. Tel. (951) 5170788 y Fax. 5170444. (bernardino.leonardo@gmail.com). <sup>3</sup>Laboratorio Reprodutor de Organismos Benéficos del Sureste, S. A. Calle Lázaro Cárdenas # 10 Reyes, Etlá, Oaxaca. Tel. (951) 52159913. <sup>§</sup>Autor para correspondencia: gare17@hotmail.com.

### Resumen

Las alternativas para el control de *Bemisia tabaci* son insuficientes. El uso de hongos entomopatógenos es una de estas alternativas, pero falta información de patogenicidad en cuanto a concentración de conidios y su almacenamiento. Por otro lado, los protocolos para la evaluación de mortalidad presentan fallas que deben corregirse. La investigación se hizo en el Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, durante 2010. Se evaluaron dos hongos entomopatógenos (*Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*) con distintas concentraciones de conidios para el control de *B. tabaci* en *Solanum lycopersicum* en invernadero, usando el protocolo de Ortega *et al.* (1998) modificada en esta investigación. La mortalidad de *B. tabaci* disminuyó al reducir el tiempo de ayuno y adaptando una puntilla y tela en la micropipeta. Por su parte, la mortalidad de *B. tabaci* en todas las concentraciones de conidios de los dos hongos entomopatógenos sin almacenar, fue igual que el insecticida químico. Cuando los conidios se almacenaron en refrigerador, la mortalidad fue mayor con los tratamientos *B. bassiana* con una concentración de  $2.1 \times 10^6$  conidios mL<sup>-1</sup> y el insecticida químico, lo que

### Abstract

The alternatives for the control of *Bemisia tabaci* are insufficient. The use of entomopathogenic fungus is one of these alternatives, but lack information regarding pathogenicity of conidia concentration and storage. Furthermore, protocols for assessing mortality have flaws that must be corrected. The research was done at the Technological Institute of Oaxaca Valley, in 2010. It were assessed two entomopathogenic fungus (*Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*) with different concentrations of conidia for controlling *B. tabaci* in *Solanum lycopersicum* under greenhouse, using the protocol from Ortega *et al.* (1998) modified in this research; mortality of *B. tabaci* decreased by reducing the time of fasting and adapting a lace and fabric in the micropipette. For its part, the mortality of *B. tabaci* at all concentrations of conidia of the two entomopathogenic fungus without storage was the same as the chemical insecticide. When conidia were stored in a refrigerator, mortality was higher with treatment *B. bassiana* with a concentration of  $2.1 \times 10^6$  conidia mL<sup>-1</sup> and the chemical insecticide, which indicates that storage of conidia decreases pathogenicity mainly in *Metarhizium anisopliae*.

\* Recibido: septiembre de 2013  
Aceptado: marzo de 2013

indica que el almacenamiento de los conidios disminuye su patogenicidad, principalmente en *Metarhizium anisopliae*.

**Palabras clave:** *Bemisia tabaci*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, virulencia.

## Introducción

La mosca blanca es considerada una de las plagas de mayor importancia económica a nivel mundial por causar daños a diversos cultivos como tomate, algodón, calabacitas y a más de 500 especies de plantas ornamentales. El daño más importante de la mosca es como vector de virus (Ortega *et al.*, 1998). El uso irracional de productos químicos sintéticos para su control ha traído diversas consecuencias, como: acumulación de residuos químicos en alimentos, desequilibrio ecológico por la eliminación de organismos benéficos, contaminación del ambiente, intoxicación de operadores y desarrollo de resistencia a productos químicos (Rodgers, 1993; Shah y Pell, 2003). Esta problemática ha desencadenado estrategias alternativas de control de esta plaga; una de ellas y, la cual se vislumbra como más viable, es el control biológico, en el cual están los hongos entomopatógenos.

Se reportan más de 20 especies de hongos entomopatógenos que infectan moscas blancas, entre los que destacan *Aschersonia* spp., *Lecanicillium lecanii*, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces farinosus*, *P. fumosoroseus* y *P. javanicus*. Estos entomopatógenos ocasionan epizootias sobre poblaciones de mosca blanca representando una alternativa viable para su control y demuestra su potencial como bioinsecticidas (Rodríguez y Bernal, 2007). *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* son los hongos más estudiados y utilizados debido a la eficiencia y facilidad de multiplicación en laboratorio, constituyendo uno de los principales grupos de entomopatógenos utilizados en el control microbiano (Ibarra, 2006).

El presente trabajo se realizó con el fin de determinar la patogenicidad de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* en poblaciones de adultos de mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo condiciones de invernadero y sometiendo los conidios a distintos tiempos de almacenamiento en frío.

**Key words:** *Bemisia tabaci*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, virulence.

## Introduction

The whitefly is considered one of the most economically important pests worldwide for causing damage to various crops like tomatoes, cotton, squash and more than 500 species of ornamental plants. The most significant damage of the fly is as vector of virus (Ortega *et al.*, 1998). Irrational use of synthetic chemicals to control has brought many consequences: accumulation of chemical residues in food, ecological imbalance by removing beneficial organisms, pollution, poisoning operators and development of resistance to chemicals (Rodgers, 1993; Shah and Pell, 2003). This problem has triggered alternative strategies for controlling this pest, and one which is seen as more viable, is biological control, which are the entomopathogenic fungus.

Are reported more than 20 species of entomopathogenic fungi infecting whiteflies, among which *Aschersonia* spp., *Lecanicillium lecanii*, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces farinosus*, *P. fumosoroseus* y *P. javanicus*. These entomopathogenic cause epizootics of whitefly populations representing a viable alternative for its control and demonstrates its potential as a bio-insecticide (Rodríguez and Bernal, 2007). *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* are the most studied and used fungi due to the efficiency and ease of replication in laboratory, constituting one of the main groups of entomopathogens used in microbial control (Ibarra, 2006).

The present study was conducted in order to determine the pathogenicity of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in adult populations of whitefly (*Bemisia tabaci*) in tomato (*Solanum lycopersicum*) under greenhouse conditions and subjecting conidia at different times of storage in cold.

## Materials and methods

The research was conducted during 2010 in three institutions: in protected horticulture facilities of the Technological Institute of Oaxaca Valley (ITVO) in the laboratory of Interdisciplinary Research Centre for Integral Development

## Materiales y métodos

El trabajo de investigación se llevó a cabo durante 2010, en tres instituciones: en las instalaciones de horticultura protegida del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca (ITVO); en el laboratorio del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional unidad Oaxaca del Instituto Politécnico Nacional (IPN) y en el Laboratorio Reprodutor de Organismos Benéficos del Sureste S. A.

Para el establecimiento del experimento, fue necesario coleccionar y reproducir las poblaciones del material biológico. La cría masiva de la mosca blanca (*B. tabaci*) se estableció con adultos coleccionados sobre plantas silvestres de Santa Cruz Xoxocotlan, Oaxaca; los insectos fueron confinados en jaulas entomológicas (60 x 60 x 60 cm) cubiertas con malla antiáfidos, en cuyo interior se colocaron plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y de tomate (*Solanum lycopersicum*) como alimento, colocadas en bolsas de plástico negro que contenían una mezcla de suelo y vermiculita como medio de soporte. Los conidios de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* fueron obtenidos de cepas del Laboratorio Reprodutor de Organismos Benéficos del Sureste S. A. La multiplicación de conidios se llevó a cabo en el mismo laboratorio, utilizando la metodología de Monzon (2001), modificada (arroz comercial como sustrato y cepas nativas).

Se utilizó un diseño completamente al azar de ocho tratamientos y tres repeticiones; tratamiento 1 *B. bassiana*  $2.1 \times 10^4$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ; tratamiento 2 *B. bassiana*  $2.1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ; tratamiento 3 *B. bassiana*  $2.1 \times 10^8$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ; tratamiento 4 *M. anisopliae*  $3.1 \times 10^{10}$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ; tratamiento 5 *M. anisopliae*  $3.1 \times 10^{11}$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ; tratamiento 6 *M. anisopliae*  $3.1 \times 10^{12}$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  y dos testigos: uno aplicando sólo agua y el otro donde se aplicó un insecticida químico en su dosis recomendada (2.5 mL/50 mL de agua). Como unidad experimental se tomaron tres foliolos de tomate y diez adultos de mosca blanca.

**El procedimiento incluyó dos fases: la de trasplante y el experimento.** En el invernadero se establecieron las plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cv. SXT 7705 en bolsas de plástico negras, utilizando arena de río desinfectada como sustrato; el manejo del cultivo (tutorado, poda de chupones, eliminación de arvenses, fertirrigación) se realizó con técnicas comunes para los Valles Centrales

Regional unit Oaxaca from the Polytechnic Institute National (IPN) and Beneficial Organisms Replication Laboratory from Southeast S. A.

For the establishment of the experiment, it was necessary to collect and reproduce the populations of biological material. Mass rearing of the whitefly (*B. tabaci*) was established with adults collected on wild plants from Santa Cruz Xoxocotlan, Oaxaca; the insects were confined in entomological cages (60 x 60 x 60 cm) covered with antiaphid mesh, inside which placed plants of bean (*Phaseolus vulgaris*) and tomato (*Solanum lycopersicum*) as food, placed in black plastic bags containing a mixture of soil and vermiculite as support medium. The conidia of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* were obtained from the strains of the Beneficial Organisms Replication Laboratory of Southeast S. A. The multiplication of conidia was carried out in the same laboratory, using the methodology of Monzon (2001), amended (commercial rice as substrate and native strains).

It was used a completely randomized design with eight treatments and three replications; treatment 1 *B. bassiana*  $2.1 \times 10^4$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ , treatment 2 *B. bassiana*  $2.1 \times 10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ , treatment 3 *B. bassiana*  $2.1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ; treatment 4 *M. anisopliae*  $3.1 \times 10^{10}$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ; treatment 5 *M. anisopliae*  $3.1 \times 10^{11}$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ , treatment 6 *M. anisopliae*  $3.1 \times 10^{12}$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  and two controls: one using only water and the other where a chemical insecticide was applied at the recommended dose (2.5 mL/50 mL of water). As experimental unit were taken three tomato leaflets and ten adult whiteflies.

**The procedure included two phases: transplantation and experiment.** In the greenhouse were established tomato seedlings (*Solanum lycopersicum*) cv. SXT 7705 in black plastic bags, using disinfected river sand as substrate; crop management (trellising, pruning suckers, weed removal, fertigation) was performed with common techniques for the Central Valleys of Oaxaca. Once established the seedlings began the experiment that consisted of: storing conidia, preparation of solutions (treatments), application of solutions, capturing whitefly adult for mass rearing and data collection.

**Conidia storage.** In order to know how much it affects time (storage) to the pathogenicity of entomopathogenic fungus, its spores were subjected to three cooling times: zero, six and twelve days after its formulation.

de Oaxaca. Ya establecidas las plántulas se inició el experimento que consistió en: almacenamiento de conidios, preparación de las soluciones (tratamientos), aplicación de soluciones, captura de adultos de mosca blanca de la cría masiva y toma de datos.

**Almacenamiento de conidios.** Con el objetivo de conocer que tanto le afecta el tiempo (almacenaje) a la patogenicidad de los hongos entomopatógenos, sus esporas se sometieron a tres lapsos de tiempo de refrigeración, que fueron: cero, seis y doce días después de su formulación.

**Preparación de las soluciones.** Se tomaron 20 mL de conidios y se disolvieron en 40 mL de agua, adicionándole 0.25 mL de adherente agrícola y se asperjaron con atomizadores de 60 mL. Para el insecticida químico se tomaron 2.5 mL y se disolvió en 50 mL de agua.

**Aplicación.** En una hoja cotiledonal, con la lámina completamente extendida de tomate, se asperjaron cada uno de los tratamientos correspondientes hasta el punto de escurrimiento y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se sujetó una jaula entomológica pequeña (prototipo de Ortega, 2008a) a la hoja tratada y por un orificio lateral de la jaula se introdujeron los 10 adultos de mosca blanca (una a la vez) capturados previamente.

**Captura.** Mediante el método de inmersión de hoja (Ortega *et al.*, 1998), con modificaciones propuestas para esta investigación. Con el fin de mantener vivos a los individuos durante su manejo, se adaptó un tubo de plástico haciendo la función de coplee para sujetar una pequeña tela de organza en la puntilla de micropipeta; para evitar la muerte de los individuos por las altas temperaturas se les dejó en ayuno sólo por media hora; y para mantener viables a las esporas de los hongos se dejó escurrir el producto asperjado en la hoja, sólo por 20 min.

**Toma de datos.** Los muestreos de mortalidad de adultos se realizaron a las 24, 48 y 72 h después de la aplicación de los tratamientos. Con la ayuda de una lupa se contaron los individuos muertos.

#### Análisis estadístico

Para cumplir los supuestos de normalidad de errores y homogeneidad de varianzas los datos fueron transformados a raíz cuadrada ( $\sqrt{x+1}$ ); se les aplicó un ANOVA y una prueba

**Preparation of solutions.** 20 mL of conidia were taken and dissolved in 40 mL of water, adding 0.25 mL of agricultural adherent and sprayed with a 60 mL atomizer. For chemical insecticide 2.5 mL were taken and dissolved in 50 mL of water.

**Application.** In a cotyledon leaf, with the tomato sheet fully extended were sprayed each one of the corresponding treatments, up to the point of runoff and left to dry at room temperature. Subsequently a small Entomological cage was hold (prototype of Ortega, 2008a) to the treated leaf and through a hole on the side of the cage introduced 10 adult whitefly (one at a time) previously captured.

**Capture.** Through the leaf immersion method (Ortega *et al.*, 1998) with modifications proposed for this research. In order to keep individuals alive during handling, was adapted a plastic tube making a junction function to attach a small organza fabric on the tip of the micropipette, to prevent the death of individuals by high temperatures were fasting for half an hour only, and to maintain viable fungi spores was allowed to drain the product sprayed on the sheet, only for 20 min.

**Data collection.** Sampling adult mortality was made at 24, 48 and 72 h after the application of treatments. With the help of a magnifying glass were counted dead individuals.

#### Statistical analysis

To meet the assumptions of normality of error and homogeneity of variance the data was transformed to square root ( $\sqrt{x+1}$ ); was applied ANOVA test and multiple comparison of means by Tukey test (0.05) through the Statistical Analysis System (SAS Institute, 2005).

## Results and discussion

### Conidia without storing

All treatments were applied conidia of entomopathogenic fungus unstored caused a mortality equal to the chemical insecticide, as shown in Figure 1 and were superior to the control in which only sprayed water. *Beauveria bassiana* with a concentration of  $2.1 \times 10^6$  conidia mL<sup>-1</sup> was the one that caused higher mortality in *B. tabaci*, followed

de comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey (0.05) mediante el programa Statistical Analysis System (SAS, Institute, 2005).

## Resultados y discusión

### Conidios sin almacenar

Todos los tratamientos donde se aplicaron conidios de hongos entomopatógenos sin almacenar causaron una mortalidad igual al insecticida químico, como se aprecia en la Figura 1 y fueron superiores al testigo donde sólo se asperjó agua. *Beauveria bassiana* con una concentración de  $2.1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  fue el que mayor mortalidad provocó en *B. tabaci*, seguido por el tratamiento químico y por *Metarhizium anisopliae* con una concentración de  $1.3 \times 10^{10}$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  y  $1.3 \times 10^{12}$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  (Figura 1).

A las 48 h de aplicación, la mortalidad de *B. tabaci* fue igual para el insecticida químico y *B. bassiana* con una concentración de  $2.1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  y *M. anisopliae* con una concentración de  $1.3 \times 10^{10}$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ . A las 72 h, al comparar el efecto del insecticida químico en la mortalidad de *B. tabaci* con la mortalidad provocada por las esporas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en todas sus concentraciones de conidios, sus efectos son iguales y superiores al testigo donde sólo se aplicó agua.

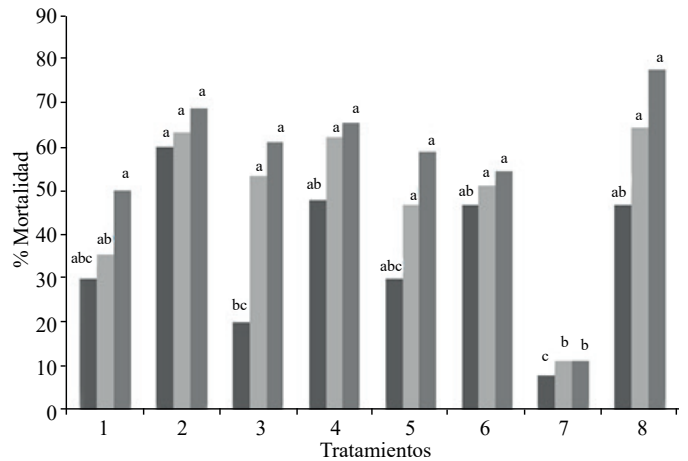
### Evaluación de la patogenicidad de los conidios sometidos a refrigeración

En los muestreos hechos a las 24 h, se analizó que la efectividad de los conidios se ve disminuida por el almacenamiento bajo refrigeración. No se ve diferencia cuando los conidios se usan sin almacenar y al almacenarlos por seis días. Sin embargo, cuando los conidios se almacenan por 12 días su efecto se ve reducido.

Por otro lado, se puede notar (Cuadro 2) que el almacenamiento de conidios durante seis días afectó más a *M. anisopliae* que a *B. bassiana* lo anterior demuestra la diferencia en resistencia de ambas especies.

La mortalidad de *B. tabaci* en general, esto es, considerando conidios almacenados o sin almacenar en refrigeración, a las 24 h se observó que no hay diferencia entre la mortalidad (Cuadro 2) provocada por el insecticida químico y la

by chemical treatment and *Metarhizium anisopliae* with a concentration of  $1.3 \times 10^{10}$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  and  $1.3 \times 10^{12}$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  (Figure 1).



**Figura 1. Porcentaje de mortalidad de *Bemisia* en diferentes tiempos causada por los tratamientos: 1) *B. bassiana*  $2.1 \times 10^4$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ; 2) *B. bassiana*  $2.1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ; 3) *B. bassiana*  $2.1 \times 10^8$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ; 4) *M. anisopliae*  $3.1 \times 10^{10}$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ; 5) *M. anisopliae*  $3.1 \times 10^{11}$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ; 6) *M. anisopliae*  $3.1 \times 10^{12}$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ; 7) agua; y 8) un insecticida químico, usando conidios sin refrigeración.**

**Figure 1. Mortality percentage of *Bemisia tabaci* at different times caused by treatments: 1) *B. bassiana*  $2.1 \times 10^4$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ; 2) *B. bassiana*  $2.1 \times 10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ; 3) *B. bassiana*  $2.1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ; 4) *M. anisopliae*  $3.1 \times 10^{10}$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ; 5) *M. anisopliae*  $3.1 \times 10^{11}$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ; 6) *M. anisopliae*  $3.1 \times 10^{12}$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ; 7) water; and 8) chemical insecticide, using conidia without refrigeration.**

At 48 h of application, the mortality of *B. tabaci* was equal for the chemical insecticide and *B. bassiana* with a concentration of  $2.1 \times 10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  and *M. anisopliae* with a concentration of  $1.3 \times 10^{10}$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ . At 72 h, to compare the effect of chemical insecticide on the mortality of *B. tabaci* with mortality caused by spores of *B. bassiana* and *M. anisopliae* in all its conidia concentration, its effects are the same and higher than the control where only water was applied.

### Evaluation of the pathogenicity of conidia under refrigeration

In the samplings made at 24 h, was analyzed that the effectiveness of the conidia is diminished by refrigerated storage. No difference was seen when the conidia are used

mortalidad provocada por la patogenicidad de los hongos entomopatógenos. *B. bassiana* con una concentración de  $2.1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  fue el más cercano al tratamiento químico.

A las 48 h de aplicación al igual que en el muestreo a las 24 h se sigue observando que el almacenamiento de conidios bajo refrigeración afectó su patogenicidad causada a *B. tabaci*. El efecto del almacenamiento durante seis y 12 días en refrigeración se ve menos drástico en *B. bassiana* que en *M. anisopliae*. Los mejores tratamientos fueron: el insecticida químico y *B. bassiana* con una concentración de  $2.1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  este último tratamiento ligeramente por debajo del químico (Figura 2), así como lo encontrado por Wraight *et al.* (2000), quienes evaluaron el control microbiano de *B. bassiana* y *P. fumosoroseus* contra *B. argentifolii*, los ensayos de laboratorio demostraron la capacidad de los agentes patógenos que infectan ninfas en hojas de hibisco aproximadamente 35% de infección, aplicando  $0.6$  a  $1.4 \times 10^3$  conidios  $\text{mm}^{-2}$  de la superficie de la hoja.

A las 72 h se observa que los tratamientos han ejercido un efecto semejante (Figura 2) sobre las poblaciones de *B. tabaci*. Se obtuvo una superioridad en la mortalidad de *B. tabaci* provocada por el insecticida químico aplicado en su dosis recomendada y *B. bassiana* con una concentración de  $2.1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ . En éste resultado hay que considerar que este tratamiento tiene un buen resultado cuando sus conidios se usan sin almacenar y e almacenados hasta por 12 días. Quesada-Moraga *et al.* (2006), evaluaron la infectividad de 25 aislamientos nativos de *B. bassiana* y un micoinsecticida comercial contra ninfas de IV instar de *B. tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum* a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  en condiciones de laboratorio. Todos los aislamientos fueron patogénicos para ambas especies de moscas blancas con tasas de mortalidad que varían de 3 a 85%.

También se puede notar que los dos hongos evaluados en este experimento y en sus distintas dosis de esporas tuvieron un efecto en la mortalidad de *B. tabaci*, siendo estos superiores en todos los casos (concentraciones de conidios y almacenamiento bajo refrigeración por diferentes lapsos de tiempo) a la simple aplicación de agua y adherente. Éste resultado confirma que los hongos entomopatógenos son una alternativa real en el control de esta plaga tan conflictiva (denominada así por la resistencia cruzada que ha logrado, resultando en una baja mortalidad a diferentes insecticidas químicos aplicados en altas concentraciones) y que ha sido considerada devastadora en el campo agrícola oaxaqueño.

without storing and store for six days. However, when the conidia are stored for 12 days the effect is reduced.

Furthermore, it may be noted (Table 2) that the storage of conidia for six days affected more to *M. anisopliae* than *B. bassiana*; this shows the difference in resistance of both species.

**Cuadro 2 Promedio del porcentaje de mortalidad de *B. tabaci* ocasionada por tratamientos con hongos entomopatógenos cuyos conidios fueron sometidos a diferentes tiempos (cero, seis y doce días) de almacenamiento en distintos tiempos-**

**Table 2. Average of the mortality percentage from *B. tabaci* caused by treatments with entomopathogenic fungus whose conidia were subjected to different times (zero, six and twelve days) of storage and samplings at different times.**

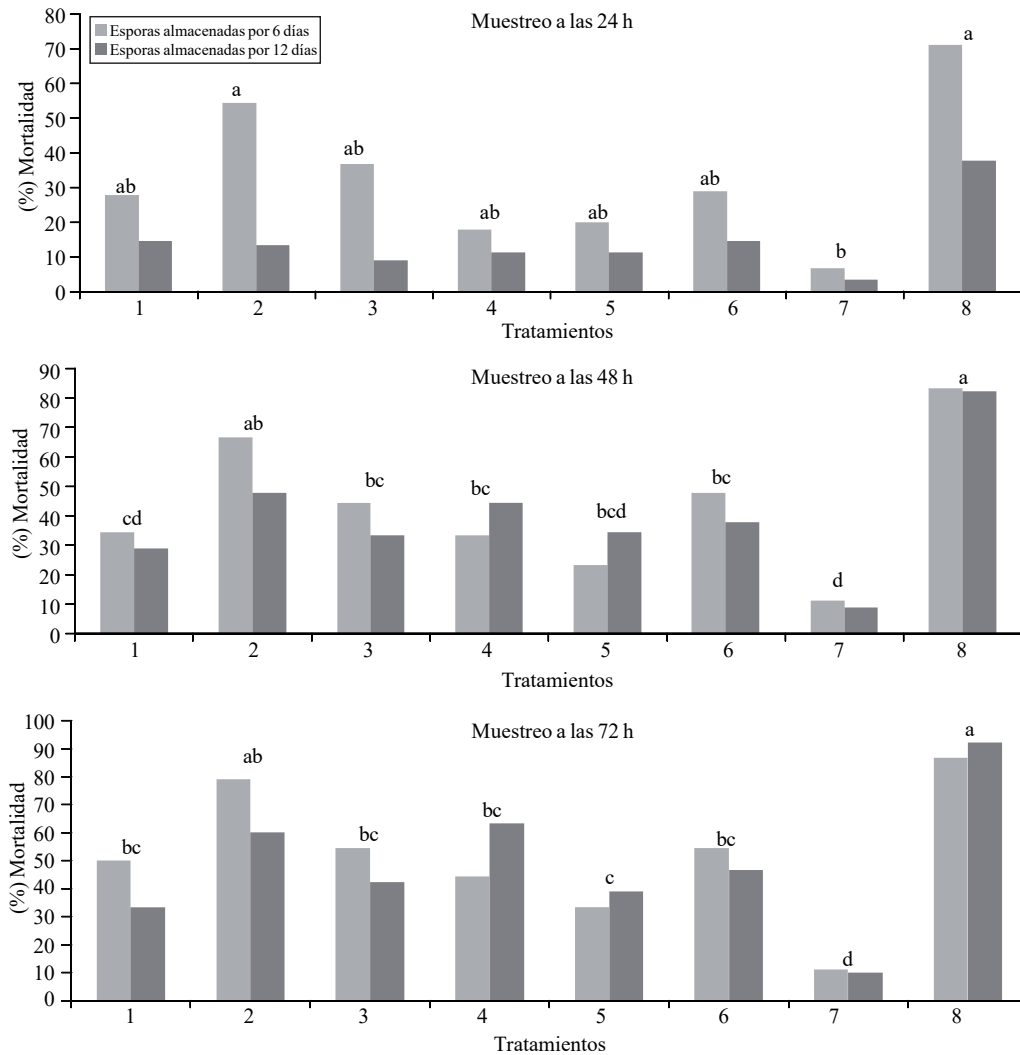
Tratamientos	24 h	48 h	72 h
1	30 <sup>abc</sup>	34.44 <sup>bc</sup>	33.33 <sup>c</sup>
2	60 <sup>a</sup>	66.67 <sup>ab</sup>	60 <sup>a<sup>bc</sup></sup>
3	20 <sup>b<sup>c</sup></sup>	44.44 <sup>bc</sup>	42.22 <sup>bc</sup>
4	47.78 <sup>ab</sup>	33.33 <sup>bc</sup>	63.33 <sup>ab</sup>
5	30 <sup>abc</sup>	23.33 <sup>bc</sup>	38.88 <sup>bc</sup>
6	46.67 <sup>ab</sup>	47.77 <sup>abc</sup>	46.66 <sup>bc</sup>
7	7.78 <sup>c</sup>	11.11 <sup>d</sup>	10 <sup>d</sup>
8	46.67 <sup>ab</sup>	83.33 <sup>a</sup>	92.22 <sup>a</sup>

Mortality of *B. tabaci* in general, that is, considering conidia stored or not stored under refrigeration at 24 h, there was no difference between mortality (Table 2) caused by chemical insecticide and mortality caused by the pathogenicity of entomopathogenic fungi. *B. bassiana* with a concentration of  $2.1 \times 10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  was the closest to the chemical treatment.

After 48 hours of application as well as sampling at 24 h is still observed that the storage of conidio under refrigeration affected its pathogenicity caused to *B. tabaci*. The effect of storage for six and 12 days under refrigeration is less dramatic in *B. bassiana* than *M. anisopliae*. The best treatments were: chemical insecticide and *B. bassiana* with a concentration of  $2.1 \times 10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ; this last treatment slightly below than the chemical (Figure 2) as well as those found by Wraight *et al.* (2000), who evaluated the microbial control of *B. bassiana* and *P. fumosoroseus* against *B. argentifolii*, the laboratory trials demonstrated the ability of the pathogens that infect nymphs on hibiscus leaves approximately 35% infection, using  $0.6$  to  $1.4 \times 10^3$  conidia  $\text{mm}^{-2}$  leaf surface.

La investigación no debe dejar de considerar otras cepas de estos hongos ni dejar de probar otros entomopatógenos. *B. tabaci* puede ser controlada con otros hongos diferentes a *B. bassiana* y *M. anisopliae* y en concentraciones diferentes a las probadas en esta investigación. Como lo mencionan Hernández *et al.* (2008) quienes encontraron que el formulado en emulsión del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* presentó mayor mortalidad con una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  sobre *B. tabaci*.

At 72 h is observed that the treatments have had a similar effect (Figure 2) on populations of *B. tabaci*. It was obtained a superior mortality of *B. tabaci* caused by chemical insecticide applied in its recommended dose and *B. bassiana* with a concentration of  $2.1 \times 10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ . In this result must consider that this treatment has a good outcome when its conidia are used with and without storage up to 12 days. Quesada-Moraga *et al.* (2006) evaluated the infectivity of 25 native isolates of *B. bassiana* and a commercial microbial insecticide



**Figura 2. Mortalidad en *Bemisia tabaci* en las 24, 48 y 72 horas después de la aplicación de los diferentes tratamientos: 1) *B. bassiana*  $2.1 \times 10^4$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ; 2) *B. bassiana*  $2.1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ; 3) *B. bassiana*  $2.1 \times 10^8$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ; 4) *M. anisopliae*  $3.1 \times 10^{10}$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ; 5) *M. anisopliae*  $3.1 \times 10^{11}$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ; 6) *M. anisopliae*  $3.1 \times 10^{12}$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ; 7) agua; y 8) un insecticida químico. Se presentan los valores de mortalidad alcanzados por los conidios sometidos a diferentes tiempos de almacenamiento en refrigerados.**

**Figure 2: Mortality of *Bemisia tabaci* at 24, 48 and 72 hrs after application of the different treatments: 1) *B. bassiana*  $2.1 \times 10^4$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ; 2) *B. bassiana*  $2.1 \times 10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ; 3) *B. bassiana*  $2.1 \times 10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ; 4) *M. anisopliae*  $3.1 \times 10^{10}$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ; 5) *M. anisopliae*  $3.1 \times 10^{11}$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ; 6) *M. anisopliae*  $3.1 \times 10^{12}$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ; 7) water; and 8) chemical insecticide. Mortality values reached by conidia subjected to different times of storage in refrigerator.**

Por su parte ya se ha comprobado el efecto entomopatógeno de *Beauveria bassiana* tanto en *Bemisia tabaci* como en otros insectos plaga. Maldonado *et al.* (2005) mencionan que el hongo *B. bassiana* a una concentración de  $1.2 \times 10^{12}$  esporas/ha controló de 60 a 85% de las siguientes plagas: picudo del chile (*Anthonomus eugenii*), gusano elotero (*Heliothis zea*) en el cultivo de chile; mayate dorado (*Acalymma vittatum*), mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en el cultivo de calabacita, al gusano falso medidor (*Trichoplusia ni*), paloma blanca de la col (*Pieris rapae*) y a la palomilla dorso diamante (*Plutella xylostella*) en el cultivo de repollo. Por su parte *M. anisopliae* sólo controló de 20 a 40% de las plagas antes mencionadas.

En lo que respecta a *M. anisopliae* se han tenido ya algunas experiencias que denotan su efecto entomopatógeno. La mortalidad causada por *M. anisopliae* en esta investigación tiene cierta semejanza con la mortalidad reportada por Mancebo *et al.* (2008) los autores localizaron que *M. anisopliae* causó mortalidades en cepas de *Boophilus microplus* con una concentración de  $1 \times 10^4$  conidios/ml, esta concentración está por debajo de las concentraciones que se usaron en la presente investigación ( $1.3 \times 10^{10}$ ,  $1.3 \times 10^{11}$  y  $1.3 \times 10^{12}$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ), lo que nos indica que *M. anisopliae* tiene un rango amplio de patogenicidad desde concentraciones bajas hasta concentraciones altas de esporas hacia diversos insectos considerados plagas.

Se observó que el insecticida químico presentó una mortalidad de 35 a 90% durante los tres días de muestreos, manteniendo un alto porcentaje de mortalidad sobre adultos de *B. tabaci* durante las tres evaluaciones. En cambio los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* disminuyeron sus porcentajes de mortalidad en cuanto al tiempo de evaluación, lo que muy probablemente se debe a diversos factores, como mencionan Ignoffo (1992); Tanada y Kaya (1993) determinaron que la humedad y temperatura influyen en la capacidad de los hongos para infectar a sus insectos hospederos.

## Conclusiones

Los tratamientos con entomopatógenos cuyos conidios no se almacenaron, provocaron una mortalidad sobre *Bemisia tabaci* igual a la causada por el insecticida químico. A las 24 h tres tratamientos con entomopatógenos no sobresalieron en su patogenicidad, pero a las 72 h la mortalidad de todos los tratamientos se igualó, con excepción del testigo donde sólo se aplicó agua.

against IV instar of nymphs of *B. tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* at a concentration of  $1 \times 10^7$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  in laboratory conditions. All isolates were pathogenic to both whitefly species with mortality rates ranging from 3 to 85%.

Also be noted that the two fungi tested in this experiment and its different spore doses had an effect on the mortality of *B. tabaci*, being superior in all cases (conidia concentration and storage under refrigeration for various periods of time) than the application of water and agricultural adherent. This result confirms that entomopathogenic fungus are a real alternative in the control of this pest so conflicting (named like that for the cross-resistance that has achieved, resulting in a low mortality to different chemical insecticides applied in high concentrations) and has been considered devastating agricultural fields of Oaxaca.

The research should not stop considering other strains of these fungi nor can stop testing other *B. tabaci* entomopathogens can be controlled with other fungi different to *B. bassiana* and *M. anisopliae* and in different concentration to those tested in this research. As reported by Hernandez *et al.* (2008) who found that the formulated emulsion of entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* showed higher mortality with a concentration  $1 \times 10^7$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  on *B. tabaci*.

For its part has already proven the entomopathogenic effect of *Beauveria bassiana* both in *Bemisia tabaci* as other insect pests. Maldonado *et al.* (2005) mention that the fungus *B. bassiana* at a concentration of  $1.2 \times 10^{12}$  spores/ha controlled 60 to 85% of the following pests: pepper weevil (*Anthonomus eugenii*), corn earworm (*Heliothis zea*) in pepper; striped cucumber beetle (*Acalymma vittatum*), whitefly (*Bemisia tabaci*) in zucchini, the cabbage looper (*Trichoplusia ni*), cabbage white dove (*Pieris rapae*) and the diamond back moth (*Plutella xylostella*) on cabbage crop. Meanwhile *M. anisopliae* controlled only 20 to 40% of the abovementioned pests.

Regarding *M. anisopliae* have already had some experiences that denote its entomopathogenic effect. The mortality caused by *M. anisopliae* in this research has some resemblance to the mortality reported by Mancebo *et al.* (2008) the authors found that *M. anisopliae* caused mortalities on strains of *Boophilus microplus* with a concentration of  $1 \times 10^4$  conidia/ml, this concentration is below the concentrations used in the present investigation ( $1.3 \times 10^{10}$ ,  $1.3 \times 10^{11}$  and  $1.3 \times 10^{12}$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ ), which indicates that *M. anisopliae* has a wide range of pathogenicity from low to high concentration levels of spores to various insects considered pests.



*Beauveria bassiana*  $2.1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  no tuvo reducción en la mortalidad (que fue superior a 60%) al ser almacenada hasta por 12 días en refrigeración ( $7^\circ \text{C}$  aproximadamente), contrario a *Metarhizium anisopliae* que disminuyó su patogenicidad al ser refrigerado por seis y doce días.

Al usar conidios almacenados, los tratamientos más efectivos para el control de poblaciones de adultos de mosca blanca fueron: el insecticida químico y las esporas del hongo entomopatógeno *B. bassiana* con una concentración de  $2.1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ .

De acuerdo a los resultados de mortalidad provocados por conidios almacenados bajo refrigeración por lapsos de tiempo diferentes, *Metarhizium anisopliae* disminuyó su patogenicidad en mayor grado que *Beauveria bassiana*.

## Literatura citada

- Claire, V.; Lance, S.; Osborne, L.; Lacey, A. and Fargues, J. 1998. Effect of host plant on the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* y (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for Controlling the Silver leaf Whitefly, *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) in Greenhouses. Biol. Control. 12:191-199.
- Hernández, V. V.; Peña C. G.; Trejo, L. A.; Toriello, C. y Lina-García, L. P. 2008. Evaluación *in vitro* de formulados a base de *Paecilomyces fumosoroseus* para el control de *Bemisia tabaci*. In: Sociedad Mexicana de Control Biológico. 2008. XXXI. Congreso Nacional de Control Biológico. Memorias. 12-14 pp.
- Ibarra, J. E.; Del Rincón, C. M. C.; Galindo, E.; Patiño, M.; Serrano, L.; García, R.; Carrillo, J. A.; Pereyra, A. B.; Alcázar, P. A.; Luna, O. H.; Galán, W. L.; Pardo, L.; Muñoz, G. C.; Gómez, I.; Soberón, M. y Bravo, A. 2006. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. Rev. Latinoam. Microbiol. 48(2):113-120.
- Ignoffo, C. M. 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. Florida Entomologist. 75:516-525.
- Monzon, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas. 63:95-103.
- Maldonado, G. M. B.; García, G. C. y Rivas, A. S. 2005. Evaluación del uso de *Beauveria bassiana* (Vuill) y *Metarhizium anisopliae* (Metschi) para el control de plagas de hortalizas en unidades de producción rural. In: Sociedad Mexicana de Control Biológico. 2005. XXVIII. Congreso Nacional de Control Biológico. Memorias. 196-197 pp.
- Mancebo, A. M.; Fernández, R. M.; Peña, C. G. y Hernández, V. V. 2008. Virulencia de *Metarhizium anisopliae* sobre cepas de *Boophilus microplus* triple resistente a ixodicidas. In: Sociedad Mexicana de Control Biológico. 2008. XXXI. Congreso Nacional de Control Biológico. Memorias. 6-9 pp.
- Ortega, A. L. D. 2008a. Bioecología de las moscas blancas. In: moscas blancas: temas selectos sobre su manejo. Infante, G. S. (Ed.). Editorial Colegio de Postgraduados- Mundi Prensa. México, D. F. 146 p.

It was observed that the chemical insecticide showed a mortality of 35 to 90% during the three days of sampling, maintaining a high percentage of mortality on adults of *B. tabaci* during the three evaluations. Instead *B. bassiana* and *M. anisopliae* reduced their mortality rates in the time of assessment, which is likely due to several factors, as mentioned by Ignoffo (1992); Tanada and Kaya (1993) who found that temperature and humidity affect the ability of fungi to infect their insect hosts.

## Conclusions

Entomopathogens treatments, whose conidia were not stored, caused mortality on *Bemisia tabaci* equal to that caused by chemical insecticide. After 24 h three treatments with entomopathogens did not excel in their pathogenicity, but at 72 h the mortality of all treatments was equal, except the control where only water was applied.

*Beauveria bassiana*  $2.1 \times 10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  had no reduction in mortality (which was greater than 60%) when stored for 12 days in the refrigerator ( $7^\circ \text{C}$  approximately), contrary to *Metarhizium anisopliae* that decreased its pathogenicity when cooled for six and twelve days.

By using conidia stored, the most effective treatments for controlling adult populations of whiteflies were: chemical insecticide and spores of the entomopathogenic fungus *B. bassiana* with a concentration  $2.1 \times 10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ .

According to the results of mortality resulting from conidia stored under refrigeration for different time periods, *Metarhizium anisopliae* pathogenicity decreased to a greater degree than *Beauveria bassiana*.

End of the English version



- Ortega, A. L. D. 2008b. Moscas blancas. Temas selectos sobre su manejo. Infante, G. S. (Ed.). Editorial Colegio de Postgraduados- Mundi Prensa. México, D. F. 146 p.
- Ortega, A. L. D.; Lagunes, A.; Rodríguez, J. C.; Rodríguez, C.; Alatorre, R. y Barcenas N. M. 1998. Susceptibilidad a insecticidas en adultos de mosquita blanca *Trialeurodes vaporariorum* (West.) (Homóptera: Aleyrodidae) de Tepoztlán, Morelos, México. Agrociencia 32(3):249-254.

- Quesada-Moraga, E.; Maranhao E. A. A.; Valverde-García, P. and Santiago-Álvarez C. 2006. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. *Biological Control* 36:274-287.
- Rodríguez, A. y Del Pozo, E. 2003. Aislamiento de hongos entomopatógenos en Uruguay y su virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum* West. *Agrociencia*. 7(2):71-78.
- Rodríguez, B. L. A. y Bernal, H. C. A. 2007. Teoría y aplicación del control biológico. *Sociedad Mexicana de Control Biológico*, México. 128-129 pp.
- Rodgers, P. B. 1993. Potential of biopesticides in agriculture. *Pestic. Sci.* 39:117-129.
- Ruíz, V. J. y Medina, Z. J. 2001. Avances en el manejo integrado de *Bemisia tabaci* en tomate y chile en Oaxaca, México. 34-40 pp.
- Ruiz, V. J.; Aquino, B. T.; Ibarra, R. J.; Arce, G. F. y García, G. J. 1998. Barreras de maíz envenenadas y hongos entomopatógenos para el control de mosca blanca. *Horticultura Mexicana*. 6(1):8-14.
- Salas, J. y Mendoza, P. 1994. Manejo integrado de la mosca blanca en Venezuela. *Rev. Fonolap. Divulgada* Núm. 45.
- Statistical Analysis System (SAS) Institute. 2005. SAS user's guide. *Statistics*. Version 9.01. SAS Inst., Cary, NC. USA.
- Shah, P. A. and Pell, J. K. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:413-423.
- Tanada, Y. and Kaya, H. 1993. *Insect pathology*. Academic Press. San Diego, California. USA. 666 p.
- Wraight S. P.; Carruthers, R. I.; Jaronkis, T.; Bradley, C. A.; Garza, C. J. and Galaini-Wraight, S. 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silver leaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biological Control* 17:203-217.