

PRIMER REPORTE EN MÉXICO DEL AISLAMIENTO DE
Verticillium lecanii A PARTIR DE LA MOSQUITA BLANCA
Y PRUEBAS DE PATOGENICIDAD *IN VITRO* SOBRE ESTE INSECTO

por Teresa Mier *
Facundo Rivera *
Juan Carlos Bermúdez *
Yolanda Domínguez *
Calixto Benavides ** y
Miguel Ulloa **

FIRST REPORT IN MEXICO ON THE ISOLATION OF
Verticillium lecanii FROM WHITEFLY AND *IN VITRO*
PATHOGENICITY TESTS ON THIS INSECT

SUMMARY

The entomopathogenic hyphomycete *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas was isolated in México from the nymphs (stages 2 and 3) of *Trialeurodes vaporariorum* and *Bemisia tabaci*, pests known as whitefly, which attack very important crops in the country's economy. *In vitro* pathogenicity bioassays were performed by inoculating healthy nymphs with a suspension containing 3.2×10^6 conidia/ml in 0.05% Tween 80, and incubating at 26°C for 10 days, both on glass slides contained in moist chambers, and on plates made with agar previously washed and sterilized, contained in Petri dishes; 92 and 100% parasitism were respectively obtained. For the Hall tests, a suspension containing 1×10^7 conidia/ml was applied onto healthy nymphs, placed on moist filter paper contained in Petri dishes, which were also incubated at 26°C for 10 days; 78.8% of parasitism was obtained with this test. Results suggest that this fungus is potentially useful for the biological control of whitefly.

RESUMEN

El hifomicete entomopatógeno *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas, fue aislado en México a partir de ninfas (estadios 2o. y 3o.) de *Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci*, plaga conocida

* Departamento El Hombre y su Ambiente, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, 04960 México, D.F.

** Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-233, 04510 México, D.F.

como mosquita blanca, que ataca cultivos de gran importancia económica en todo el país. Se hicieron bioensayos de patogenicidad *in vitro*, inoculando ninfas sanas con una suspensión de 3.2×10^6 conidios/ml en Tween 80 al 0.05%, e incubando durante 10 días a 26°C, tanto sobre portaobjetos contenidos en cámaras húmedas, como sobre placas de agar lavado y esterilizado, en cajas de Petri; se obtuvo el 92 y el 100% de parasitismo, respectivamente. Con la prueba de Hall se utilizó una suspensión de 1×10^7 conidios/ml, aplicada a ninfas sanas mantenidas sobre discos de hojas de frijol, colocados sobre papel filtro humedecido, contenidos en cajas de Petri e incubando también 10 días a 26°C; en esta prueba se obtuvo el 78.8% de parasitismo. Los resultados sugieren que este hongo es potencialmente útil en el control biológico de la mosquita blanca.

INTRODUCCIÓN

La mosquita blanca, *Trialeurodes vaporariorum* West. y *Bemisia tabaci* Gen., es una plaga cosmopolita que ataca una gran variedad de cultivos y de plantas silvestres. La acción succionadora del insecto, su papel como vector de enfermedades (Vetten y Allen, 1983; Sharaf, 1984) y el hecho de que las secreciones del insecto, ricas en sustancias nutritivas, propicien la proliferación de hongos fitopatógenos (Venezia et al., 1983), hacen que esta plaga ocasione grandes pérdidas económicas en la productividad de los cultivos. Además, ha desarrollado resistencia hacia insecticidas (Elhag y Horn, 1984, 1985; Pacheco, 1986) lo que repercute aún más en la problemática que representa el control químico en los agrosistemas.

En México, la mosquita blanca afecta cultivos de gran importancia económica, como algodón, soya, frijol, tomate rojo, chile, papa y diversas hortalizas, así como plantas de ornato como la nochebuena. La mosquita blanca ha causado bajas considerables en la producción de tomate rojo en el estado de Morelos, correspondientes a las cosechas de 1960; en 1980 y 1986 se registraron pérdidas de 51.0% y 71.7%, respectivamente (Rodríguez, 1974).

Existen antecedentes de la acción entomopatógena de *Verticillium lecanii* sobre esta plaga (Hall, 1981, 1982; Kanagaratnam et al., 1982). El hongo tiene amplia distribución y puede provocar grandes epizootias en regiones de climas tropical y subtropical, así como en los ambientes cálidos y húmedos de invernaderos. Sus hospederos más comunes son los áfidos y las mosquitas blancas, pero también ha sido encontrado en coleópteros, dípteros y ácaros eriófidios. En México, se ha aislado a partir del hongo causante de la roya del caféto (*Hemileia vastatrix*), donde actúa como hiperparásito (Carrión, 1988; Carrión y Ruiz-Belin, 1988; Carrión et al., 1989). Con el objeto de iniciar estudios que nos permitan

explotar la capacidad entomopatógena de *V. lecanii*, en este trabajo presentamos el aislamiento, la identificación y los resultados de las pruebas de patogenicidad *in vitro* del hongo en la mosquita blanca.

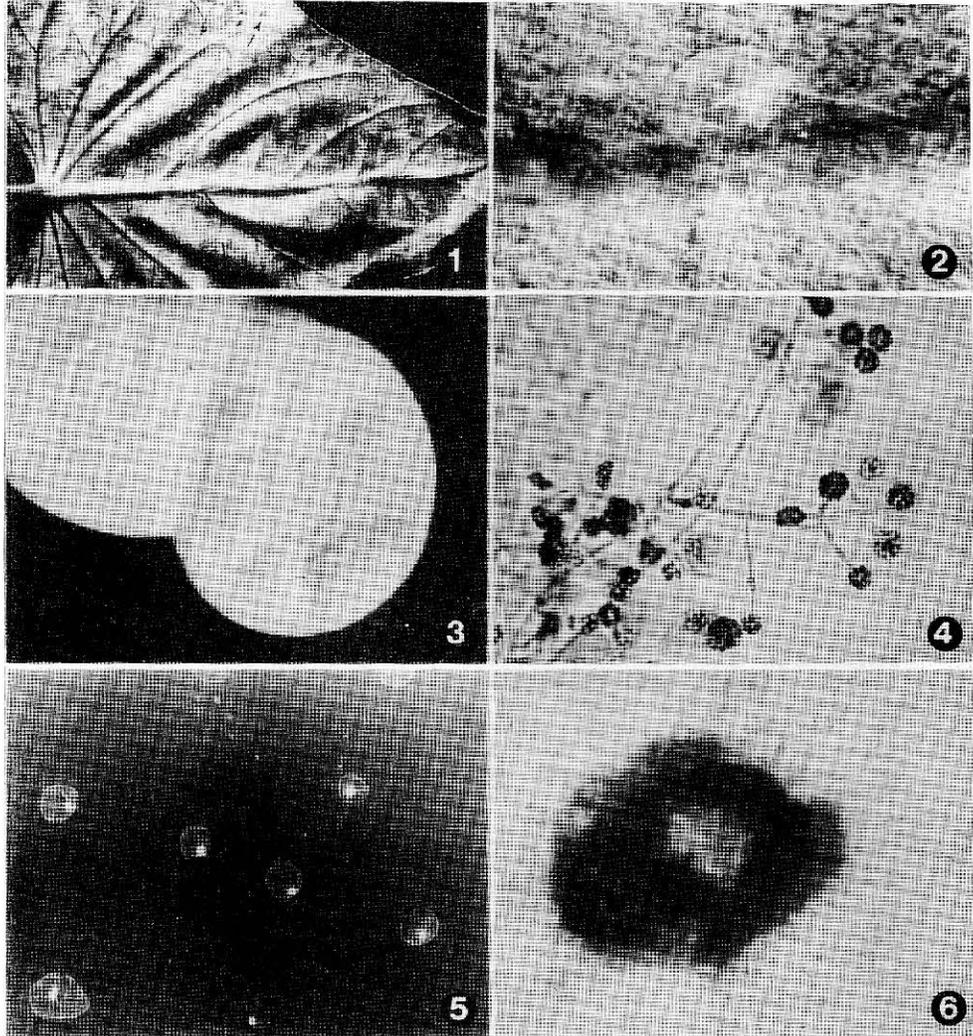
MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y obtención de cultivos puros. Se llevaron a cabo recolecciones en el estado de Morelos, seleccionando al azar plantas de frijol y tomate rojo. En las plantas la recolección fue dirigida; se escogieron hojas tiernas del segundo al cuarto brotes, ubicadas en los sitios con mayor densidad foliar, donde la autosombra propicia el desarrollo del insecto y de los hongos (Figs. 1-2). Las hojas se colocaron en bolsas de papel estériles y se trasladaron cuanto antes al laboratorio; posteriormente se sumergieron durante 15 seg en alcohol de 70° o en bicloruro de mercurio 1:1000 por 5 seg, se pasaron por solución diluida 1:10 de hipoclorito de sodio (4% de cloro libre) durante 1 min y se lavaron con agua destilada estéril. Las ninfas se tomaron con agujas entomológicas y se colocaron en cajas de Petri conteniendo medios de papa-dextrosa-agar (PDA) y extracto de malta-agar (EMA). Se incubaron a una temperatura de 26°C durante una semana aproximadamente. Los hongos aislados a partir de las ninfas se pasaron a tubos con medio de PDA o de EMA y se conservaron en refrigeración, una vez desarrollados.

Identificación taxonómica. A partir de los cultivos puros se realizaron microcultivos en PDA y preparaciones semipermanentes con lactofenol, azul de algodón y alcohol polivinílico, para ser observadas al microscopio. La identificación de género y especie se realizó con base en las características de macro y micromorfología, tanto de las colonias como de sus estructuras reproductoras, consultando bibliografía especializada: Barron (1968), Barnett y Hunter (1972), von Arx (1975), Domsch et al. (1980) y Samson (1981).

Bioensayos de patogenicidad. El hongo aislado se cultivó en medio H (sacarosa 10 g, dextrosa 5 g, peptona 0.5 g, extracto de levadura 5 g, agar 15 g, agua destilada 1000 ml) durante 10 días a 26°C. Se hicieron ensayos de patogenicidad *in vitro* en cámara húmeda, en agar lavado con agua destilada y esterilizada y en hojas de frijol infestadas, siguiendo el método de Hall (1976). Se inocularon un total de 180 ninfas sanas de los estadios 2o. y 3o., y 67 ninfas testigo tratadas solamente con el Tween 80.

Se seleccionaron hojas de frijol parasitadas con la mosquita blanca y se lavaron sucesivamente con agua destilada estéril, solución de hipoclorito de sodio 1:10, alcohol de 70° y agua destilada estéril. Para las pruebas en cámara húmeda y en agar lavado fueron seleccionadas ninfas sanas que no presentaban



Figs. 1-6. *Verticillium lecanii*: 1: parasitando ninfas de mosquita blanca en el envés de una hoja de frijol (flechas), X 3; 2: amplificación de una ninfa infectada *in situ*, X 25; 3: colonia de siete días de edad en medio H, X 2; 4: conidióforos con verticilos de fiálides y conidios mucilaginosos aglutinados en masas globosas, en medio H, X 350; 5: ninfas de mosquita blanca infectadas *in vitro* sobre agar lavado, X 1; 6: amplificación de una ninfa, casi completamente destruida por el hongo patógeno, X

síntomas de micosis. Éstas se lavaron con agua destilada estéril y se depositaron sobre portaobjetos estériles en un cristizador con humedad controlada, y sobre la superficie de placas de agar lavado con agua destilada y esterilizado, en cajas de Petri. Las ninfas se inocularon con 5 μ l de la suspensión de 3.2×10^6 conidios/ml en Tween 80 al 0.05%. Por otra parte, para el método de Hall se cortaron círculos de 25 mm de diámetro a partir de las hojas lavadas, se desecharon las ninfas con síntomas de micosis y los círculos con ninfas sanas se sumergieron durante 5 seg en una suspensión de 1.0×10^7 conidios/ml, diluida 1:3 con Tween 80 para después ser depositados en cajas de Petri, sobre papel filtro humedecido con agua destilada. Se incubaron durante 10 días a 26°C y se hicieron observaciones cada tres días. El porcentaje de parasitismo se estimó con base en el número de ninfas parasitadas por *V. lecanii*.

Se probó la viabilidad y pureza del inóculo por las características de macro y micromorfología de las colonias obtenidas a partir del mismo, en medio H. Para descartar alguna infección endógena previa a la inoculación experimental, se depositaron 20 ninfas en cajas de Petri con agar lavado y se incubaron durante 10 días a 26°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de las ninfas fue aislado e identificado *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas, hifomicete que ha sido interpretado como un agregado heterogéneo de especies entomopatógenas, muy comunes en las regiones con clima tropical y subtropical. Cultivado en EMA desarrolló colonias de crecimiento moderado, de unos 3 cm de diámetro a los 10 días a 20°C, de color blanco, que se tornó amarillento con la edad, y sin pigmentos solubles en el reverso (Fig. 3). Con hifas vegetativas hialinas y conidióforos erectos, provistos de ramificaciones verticiladas a todo lo largo, portadores de fiálides agrupadas o solitarias, generalmente aculeadas y divergentes, con collarillo inconspicuo, productoras de conidios aglutinados en cabezas mucilaginosas, cilíndricos o elipsoidales, con sus extremos redondeados, de 2.3-10.0 x 1.0-2.5 μ m (Fig. 4). Clamidosporas ausentes.

Como puede observarse en la tabla 1, el 92.0% de las ninfas mantenidas en cámara húmeda, el 100.0% de aquellas que se depositaron sobre agar lavado y el 78.8% de las inoculadas directamente en las hojas, desarrollaron la infección. El hongo se implantó en el cuerpo de las ninfas y su crecimiento se hizo evidente al sexto día de la inoculación (Figs. 5-6). Éste fue recuperado en cultivo puro a partir de 22 de las ninfas inoculadas experimentalmente. Se descartó que los resultados se relacionaran con una infección previa a la inoculación experimental, tanto por el aspecto transparente y turgente característico de las ninfas sanas como por la ausencia de crecimiento fúngico a partir de 20

ninfas no tratadas que se depositaron en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo H; se comprobó que el crecimiento de *V. lecanii* estaba sustentado exclusivamente por el cuerpo de las ninfas, por su incapacidad para crecer en el agar lavado.

Estimamos que los resultados del parasitismo de las ninfas inoculadas directamente sobre las hojas, que contrastan con los obtenidos en cámara húmeda y en agar lavado, probablemente simulan lo que ocurre en el campo, donde los hongos contaminantes, colonizadores habituales de la superficie de las hojas, podrían ejercer una acción antagónica sobre los entomopatógenos por ser saprobioicemente muy competitivos.

En este trabajo presentamos evidencias de que *V. lecanii* es capaz de invadir e infectar *in vitro* las ninfas de los estadios 2o. y 3o. de la mosquita blanca, inoculadas experimentalmente con una suspensión de conidios, y que probablemente pueda ejercer un papel importante en la regulación de esta plaga a través de la aplicación de programas de control biológico.

Tabla 1. Parasitismo de *Verticillium lecanii* en ninfas de mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci*).

| Bioensayos de Patogenicidad | Núm. de Ninfas Inoculadas | Ninfas Parasitadas | Parasitismo (%) |
|-----------------------------|---------------------------|--------------------|-----------------|
| Cámara Húmeda | 50 | 46 | 92.0 |
| | (10)* | 0 | 0 |
| Agar Lavado | 40 | 40 | 100.0 |
| | (22) | 0 | 0 |
| Prueba de Hall | 90 | 71 | 78.8 |
| | (35) | 0 | 0 |

* número de ninfas testigo en paréntesis.

LITERATURA CITADA

- Arx, J.A. von, 1975. The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture, 2a. ed. Cramer, Lehre.
- Barnett, H.L. y B.B. Hunter, 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi, 3a. ed. Burgess Pub. Co., Minneapolis.
- Barron, G.L., 1968. The Genera of Hyphomycetes from Soil. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Carrión, G., 1988. Estudios sobre el control biológico de la roya del café mediante *Verticillium lecanii* en México. Mic. Neotrop. Aplic. 1: 79-86.

- Carrión, G. y F. Ruiz-Belin, 1988. Inoculación en el laboratorio de *Verticillium lecanii* sobre la roya del café (*Hemileia vastatrix*). Rev. Mex. Mic. 4: 317-321.
- Carrión, G., F. Ruiz-Belin y R. Alarcón, 1989. Nuevos datos sobre el parasitismo de *Verticillium lecanii* sobre la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*). Rev. Mex. Mic. 5: 217-224.
- Domsch, K.H., W. Gams y T.H. Anderson, 1980. Compendium of Soil Fungi, Vol. 1. Academic Press, Nueva York.
- Elhag, E.A. y D.J. Horn, 1984. Laboratory selection of greenhouse whitefly for resistance to malathion. Entomol. Exp. Appl. 35: 21-26.
- Elhag, E.A. y D.J. Horn, 1985. Resistance of greenhouse whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides in selected Ohio greenhouses. J. Econ. Entomol. 76: 945-948.
- Hall, R.A., 1976. A bioassay of the pathogenicity of *Verticillium lecanii* conidiospores on the aphid *Macrosiphoniella sanborni*. J. Invert. Pathol. 27: 41-48.
- Hall, R.A., 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as microbial insecticide against aphids and scales. In: Burges, H.D. (ed.), Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Academic Press, Londres, p. 949.
- Hall, R.A., 1982. Control of whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, and cotton aphid, *Aphis gossypii*, in glasshouses by two isolates of the fungus *Verticillium lecanii*. Ann. Appl. Biol. 101: 1-11.
- Kanagaratnam, P., R.A. Hall y H.D. Burges, 1982. Control of glasshouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, by an 'aphid' strain of the fungus *Verticillium lecanii*. Ann. Appl. Biol. 100: 213-219.
- Pacheco, M.F., 1986. Plagas de los cultivos agrícolas en Sonora y Baja California. SARH, Cd. Obregón.
- Rodríguez, J.V., 1974. El complejo de la mosquita blanca en México. II Simposio Nacional de Parasitología Agrícola. Mazatlán, Sinaloa, México.
- Samson, R.A., 1981. Identification: Entomopathogenic Deuteromycetes. In: Burges, H.D. (ed.), Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Academic Press, Londres, p. 949.
- Sharaf, N., 1984. Ecology and control of the sweetpotatoe whitefly (*Bemisia tabaci*) in Jordan. Dirasat. 11(9): 45-56.

Venezia, M.M., J. Gerson y S. Tal, 1983. A laboratory method for estimating survival of tobacco whitefly nymphs after insecticide treatment based on honeydew excretion. Phytoparasitica 11(1): 25-32.

Vetten, H.J. y D.J. Allen, 1983. Effects of environment and host on vector biology and incidence of two whitefly-spread disease of legumes in Nigeria. Ann. Appl. Biol. 102: 219-227.