

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**Prospección y caracterización de hongos entomopatógenos en
cultivos hortícolas protegidos**

por

Pablo Federico Núñez López

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magister en Ciencias Agrarias
opción Ciencias Vegetales

Montevideo,
URUGUAY
Junio 2012

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Dr. Carlos Pérez (Presidente), Dra. Sandra Lupo, y Dr. Daniel R. Sosa Gómez, el 26 de junio de 2012. Autor: Ing. Agr. Pablo Núñez. Directora Dra. Nora Altier, Co-director Dr. Enrique Castiglioni

Dedico este trabajo a Mateo y Mariana

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) por la financiación de las actividades.

A la Dra. Nora Altier y el Dr. Enrique Castiglioni, por sus aportes al trabajo y la continua enseñanza respecto a la investigación.

A los Ing. Agr. Augusto Zignago, Mariana Silveira y Lucía Goncalvez por sus aportes en las distintas actividades

A todos los técnicos y personal de apoyo de la sección de protección vegetal y al Dr. Jorge Arbolea de INIA Las Brujas.

A la Dra. Claudia López Lastra (CEPAVE Universidad Nacional de La Plata) por todos sus aportes y su disponibilidad.

A la empresa LAGE y Cía., en especial al Ing. Pedro Lage y la Ing. Agr. Claudine Folch.

A la empresa CIBELES S.A. por el estímulo brindado para finalizar este trabajo, en especial al Ing. Agr. Miguel Bartesaghi.

Al Ing. Agr. Miguel Núñez por ese empuje final.

A mi familia.

TABLA DE CONTENIDO

| | Página |
|---|--------|
| PÁGINA DE APROBACIÓN | II |
| AGRADECIMIENTOS | III |
| RESUMEN | VI |
| SUMMARY | VII |
| 1. <u>INTRODUCCIÓN</u> | 1 |
| 2. <u>MÉTODO PARA EVALUAR LA VIRULENCIA DE <i>Lecanicillium</i> spp. (Zimmerman) SOBRE <i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Westwood)</u> | |
| 2.1. RESUMEN..... | 4 |
| 2.2. ABSTRACT..... | 5 |
| 2.3. INTRODUCCIÓN..... | 6 |
| 2.4. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 9 |
| 2.4.1. <u>Cultivo de plantines de tomate</u> | 9 |
| 2.4.2. <u>Infestación de plantines de tomate con moscas blancas</u> | 9 |
| 2.4.3. <u>Preparación del inóculo fúngico</u> | 10 |
| 2.4.4. <u>Efecto del estadio ninfal de <i>Trialeurodes vaporariorum</i></u> | 11 |
| 2.4.5. <u>Efecto de coadyuvantes usados para la preparación de las suspensiones fúngicas</u> | 13 |
| 2.4.6. <u>Efecto de regímenes de HR (alta) en el período post aplicación de suspensión fúngica</u> | 13 |
| 2.5. RESULTADOS..... | 16 |
| 2.5.1. <u>Efecto del estadio ninfal de <i>Trialeurodes vaporariorum</i></u> | 16 |
| 2.5.2. <u>Efecto de coadyuvantes usados para la preparación de las suspensiones fúngicas</u> | 17 |
| 2.5.3. <u>Efecto de regímenes de HR (alta) en el período post aplicación de suspensión fúngica</u> | 17 |
| 2.6. DISCUSIÓN..... | 19 |
| 2.7. CONCLUSIÓN | 21 |
| 2.8. BIBLIOGRAFÍA | 22 |

| | |
|--|----|
| 3. <u>PROSPECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE <i>Lecanicillium</i></u> | |
| <u>spp. (Zimmerman) PARA EL CONTROL DE <i>Trialeurodes vaporariorum</i></u> | |
| <u>(Westwood)</u> | |
| | |
| 3.1. RESUMEN..... | 27 |
| 3.2. ABSTRACT..... | 28 |
| 3.3. INTRODUCCIÓN..... | 29 |
| 3.4. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 31 |
| 3.4.1. <u>Prospección</u> | 31 |
| 3.4.2. <u>Identificación de colección de trabajo</u> | 32 |
| 3.4.3. <u>Caracterización genotípica</u> | 33 |
| 3.4.4. <u>Actividad enzimática</u> | 34 |
| 3.4.5. <u>Virulencia sobre <i>Trialeurodes vaporariorum</i></u> | 34 |
| 3.5. RESULTADOS..... | 36 |
| 3.5.1. <u>Prospección</u> | 36 |
| 3.5.2. <u>Identificación de la colección de trabajo</u> | 38 |
| 3.5.3. <u>Caracterización genotípica</u> | 39 |
| 3.5.4. <u>Actividad enzimática</u> | 40 |
| 3.5.5. <u>Virulencia sobre <i>Trialeurodes vaporariorum</i></u> | 42 |
| 3.6. DISCUSIÓN | 45 |
| 3.7. BIBLIOGRAFÍA | 48 |
| | |
| 4. <u>DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES</u> | 54 |
| 5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | 57 |

RESUMEN

La mosca blanca de los invernáculos, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), es una de las principales plagas de los cultivos hortícolas del Uruguay. Su control mediante el uso de insecticidas en base a hongos entomopatógenos, particularmente del género *Lecanicillium* (Zimmerman) es una alternativa de poco impacto sobre el ambiente y el ser humano, no utilizada comercialmente en Uruguay. Su éxito depende en parte de la selección de cepas, buscándose alta virulencia y buena adaptabilidad a las condiciones de uso. Los objetivos de este trabajo fueron ajustar un método que estime la virulencia de aislados *Lecanicillium* spp., realizar una prospección de aislados de hongos entomopatógenos y caracterizarlos utilizando el método ajustado. Se determinó que: 1) la mayor mortalidad de insectos se logra cuando se aplica la suspensión de conidios a ninfas de entre segundo y tercer estadio; 2) las suspensiones de conidios que incluyen Tween® 20, al 0,05% v/v, el detergente Nu-Film – 17 al 0,04% v/v o simplemente agua destilada, no afectan la mortalidad de las ninfas; 3) la humedad relativa durante el período post aplicación del entomopatógeno puede afectar en forma diferencial la virulencia de los aislados, por tanto una caracterización completa debería de incluir al menos dos regímenes de humedad relativa (cero y 48 horas de humedad relativa de 100%). Se colectaron 45 aislados fúngicos, 44 de ellos del género *Lecanicillium*. Se identificó una colección de trabajo compuesta por nueve aislados. Esta se caracterizó genotípicamente mediante técnicas de RFLP del ADN ribosomal, identificándose al menos cinco haplotipos. Se evaluó la actividad de enzimas proteolíticas de esta colección, encontrando diferencias entre aislados. No se hallaron asociaciones entre las características evaluadas. Finalmente se identificó al aislado ILB9 (*Lecanicillium longisporum*) como el más virulento y con mayor potencial para el desarrollo de un bioinsecticida y al aislado ILB36 (*Lecanicillium lecanii*) como el menos virulento.

Palabras clave: entomopatógeno, *Lecanicillium lecanii*, *Lecanicillium longisporum*, *Lecanicillium attenuatum*, bioensayo

SURVEY AND CHARACTERIZATION OF ENTOMOPATOGENIC FUNGUS IN HORTICULTURAL PROTECTED CROPS

SUMMARY

The greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) is a major pest of vegetable crops in Uruguay. Its control using bioinsecticides based on entomopathogenic fungi, particularly from the genus *Lecanicillium* (Zimmerman), is an alternative of low impact on environmental and human health that is not commercially available in Uruguay. Its success depends partially on fungal strain attributes like high pathogenicity and adaptability to the environmental field conditions. The aim of this study was to adjust a bioassay technique capable to estimate the pathogenicity of *Lecanicillium* spp., make a survey of entomopathogenic isolates, and characterize them using the adjusted bioassay. We determined that: 1) the highest mortality of insects is achieved when the conidial suspension is applied to nymphs between second and third stage; 2) the conidial suspensions including Tween ® 20 at 0.05% v/v, detergent Nu-Film-17 to 0.04% v/v, or distilled water do not affect the mortality of the nymphs; 3) the relative humidity during the post application of the entomopathogenic suspension can differentially affect the pathogenicity of isolates, therefore the characterization should include at least two regimes of relative humidity (zero and 48 hours of relative humidity of 100%). Forty five fungal isolates were collected, including 44 that belong to the *Lecanicillium* genus. A work collection of nine isolates was selected and characterized genotypically by RFLP techniques ribosomal DNA, identifying at least five haplotypes. The proteolytic enzyme activity was evaluated finding difference among isolates, but this feature could not be associated with pathogenicity on whitefly nymphs. Finally, the isolate ILB9 (*Lecanicillium longisporum*) was identified as the most pathogenic, showing potential for development of a bio-insecticide, and isolate ILB36 (*Lecanicillium lecanii*) was identified as the less pathogenic.

Key words: entomopatogenic, *Lecanicillium lecanii*, *Lecanicillium longisporum*, *Lecanicillium attenuatum*, bioassays

1. INTRODUCCIÓN

Las especies de mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y *Bemisia tabaci* (Gennadius) son plagas primarias en los cultivos hortícolas del Uruguay, y su incidencia se ha incrementado en los últimos años (Rodríguez *et al.*, 2003). Afectan a los cultivos de forma directa por alimentarse succionando la savia y de forma indirecta por la secreción de sustancias azucaradas sobre las que crecen un complejo de hongos denominados fumagina y por la transmisión de enfermedades virósicas (Bentancourt y Scatoni, 2010; Rodríguez *et al.*, 2003). Sus poblaciones suelen incrementarse de tal forma que para lograr niveles productivos comercialmente aceptables es necesario tomar medidas de control.

La herramienta más utilizada para controlar la mosca blanca es la aplicación de insecticidas de síntesis química. El uso indiscriminado de insecticidas ha resultado en el desarrollo de resistencia a muchos de ellos (Quesada-Moraga *et al.*, 2006), con el consecuente aumento de dosis e intensidad de uso. El control biológico de mosca blanca mediante el empleo de enemigos naturales y entomopatógenos constituye una alternativa de gran valor para el control de plagas en la agricultura, con sus consecuentes ventajas en cuanto a inocuidad para el hombre y el medio ambiente.

La utilización de parasitoides para controlar esta plaga ha tenido un desarrollo importante a nivel mundial. En nuestro país existen experiencias exitosas al respecto (Perrachon *et al.*, 2005; Pascal *et al.*, 2003; Basso, 2002). Dentro de los hongos entomopatógenos se han reportado más de 20 especies de hongos infectando especies de mosca blanca, siendo los más estudiados *Aschersonia aleyrodis* (Webber), *Isaria fumosorosea* (Syn: *Paecilomyces fumosoroseus*) (Wise), *Lecanicillium* spp. (syn: *Verticillium lecanii*) (Zimmerman), y *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv) Viull. El género *Lecanicillium* presenta varias especies con capacidad entomopatógena. Si bien su rango de hospederos es amplio, son principalmente controladores naturales de algunos hemípteros, áfidos y aleirodidos (Hall, 1981). En distintos países se han

desarrollado insecticidas biológicos en base a *Lecanicillium* spp. y son utilizados para controlar las moscas blancas (Kim *et al.*, 2008).

En Uruguay, si bien no hay insecticidas microbiológicos registrados para uso agrícola, existen trabajos científico-técnicos enfocados al control de *T. vaporariorum* mediante el uso de formulaciones artesanales en base a *Lecanicillium lecanii* (Paullier *et al.*, 2007; Rodríguez y del Pozo, 2003). Estos trabajos se han basado en un número reducido de aislados de *L. lecanii* y los niveles de control fueron variables, evidenciando la necesidad de mejorar aspectos vinculados a esta tecnología en el manejo de la plaga (Paullier *et al.*, 2007; Rodríguez y del Pozo, 2003).

La probabilidad de éxito en el desarrollo de insecticidas biológicos será mayor si se dispone de un amplio *pool* genético, permitiendo seleccionar microorganismos de alta eficacia en el control de plagas y buena adaptabilidad a las condiciones climáticas de uso. Para ampliar la base genética disponible *ex situ*, es necesario explorar la diversidad existente en la naturaleza y coleccionar parte de la misma. El valor de las colecciones se logra mediante una adecuada caracterización de las mismas. Una caracterización precisa de las colecciones *ex situ* facilita su autenticación, conservación y documentación (FAO, 2009). A su vez, la selección de cepas promisorias para el control biológico se logrará sólo si se dispone de las herramientas adecuadas para caracterizar los aislados disponibles (Hatting y Wright, 2007). Varios autores han caracterizado genotípicamente poblaciones del género *Lecanicillium* utilizando técnicas de reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) (Kouvelis *et al.*, 2008; Sugimoto *et al.*, 2003; Sugimoto *et al.*, 2001; Zare *et al.*, 1999). Por otra parte, características fenotípicas como la producción de enzimas extracelulares, también han sido estudiadas exitosamente para caracterizar aislados de hongos entomopatógenos (Castellanos-Moguel *et al.*, 2008; Bidochka *et al.*, 1999; Goettel *et al.*, 1989).

La capacidad de un hongo entomopatógeno para colonizar y matar un insecto plaga es una cualidad imprescindible al seleccionar aislados potenciales como agentes de control biológico, y este aspecto debe ser considerado en la caracterización. La forma más certera y precisa de estimar esta capacidad es mediante la realización de bioensayos (Butt y Goettel, 2000). El correcto diseño de un bioensayo debe considerar las condiciones ambientales en las cuales el entomopatógeno será utilizado, y cuanto mejor las reproduzca mayor confianza tendrán los resultados (Butt y Goettel, 2000). Para el sistema mosca blanca - planta hospedera - hongo entomopatógeno, varios autores han propuesto metodologías que permiten estimar la virulencia de los aislados de entomopatógenos (Gokce y Er., 2004; Vicentini *et al.*, 2001; Herrera *et al.*, 1999; Landa *et al.*, 1994). En trabajos realizados en INIA Las Brujas, en el marco de la investigación para el desarrollo de insecticidas a base de *Lecanicillium* sp., se identificaron dificultades en las técnicas de los bioensayos disponibles.

El objetivo de este trabajo es contribuir al proceso de selección de cepas de hongos entomopatógenos pertenecientes al género *Lecanicillium*, a fin de desarrollar insecticidas biológicos para su utilización en el control de mosca blanca en condiciones de invernáculo. Para ello es necesario realizar una prospección de aislados de *Lecanicillium* spp. en los agroecosistemas de uso, caracterizar los aislados colectados y diseñar un protocolo de evaluación que permita estimar correctamente la virulencia sobre *T. vaporariorum* en plantas de tomate. Se parte de la base de las siguientes hipótesis: existe en la naturaleza mortandad natural de moscas blancas a causa de hongos entomopatógenos y se pueden identificar aislados de *Lecanicillium* spp; existe diversidad genética entre los aislados de *Lecanicillium* spp. que se colectan; se puede caracterizar fenotípicamente la diversidad genética existente en base a la producción de enzimas y virulencia; y se puede definir una metodología de bioensayo para la situación de estudio.

2. MÉTODO PARA EVALUAR LA VIRULENCIA DE *Lecanicillium* spp. (Zimmerman) SOBRE *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)¹

2.1 RESUMEN

La selección de aislados entomopatógenos de *Lecanicillium* spp. (Zimmerman) para desarrollar insecticidas biológicos necesita de una metodología ajustada que estime el potencial de los mismos. Los atributos deseables en cepas a seleccionar son alta eficacia en el control de plagas y adaptabilidad a las condiciones climáticas de uso. Este trabajo propone una metodología para cuantificar la virulencia de *Lecanicillium* spp. sobre la mosca blanca de los invernáculos, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). Se estudiaron los efectos de: a) estadio de la plaga, b) coadyuvantes utilizados en suspensiones de conidios y c) período de humedad relativa (HR) saturada post aplicación (cero, 48 y 96 horas) en la virulencia de los aislados. Se determinó que la mejor expresión de la virulencia se logra aplicando una suspensión de conidios a ninfas de entre 2º y 3º estadio. El surfactante Triton X-100 a 0,01% v/v puede causar elevada mortandad de insectos (20,8%), por lo que no sería recomendable su uso para preparar las suspensiones. El Tween ® 20 a razón del 0,05% o el humectante Nu-film – 17 a 0,04% v/v pueden ser utilizados sin inconvenientes. En general, al aumentar el período de saturación de humedad durante cero, 48 y 96 horas después de la aplicación, se incrementó la virulencia de los dos aislamientos estudiados. No obstante, este efecto fue diferencial, confirmándose interacción entre el tiempo de HR saturada y los aislados. La metodología propuesta tiene el potencial para utilizarse en una rápida evaluación de la virulencia de aislados de *Lecanicillium* spp. sobre *Trialeurodes vaporariorum*.

Palabras clave: entomopatógeno, *Lecanicillium lecanii*, *Lecanicillium longisporum*, *Lecanicillium attenuatum*, bioensayo

¹ Artículo para publicar en revista AGROCIENCIA Uruguay

2.2 ABSTRACT

Bioassay adjustment to evaluate pathogenicity of *Lecanicillium* spp. (Zimmerman) to *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)

The selection of fungal strains of *Lecanicillium* spp. (Zimmerman) to be used as biological insecticides needs a standard method to estimate the strain potential. The desired attributes are high effectiveness in pest control and adaptability to the environmental field conditions. In this work, a method to estimate the pathogenicity of *Lecanicillium* spp. to the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, is proposed. The larval instars, three coadjuvants frequently used in the spore suspension, and three periods of high relative humidity were studied on how they affect the fungal strain pathogenicity. It was concluded that the higher pathogenicity was reached when the second to third instar were sprayed. The surfactant Triton X-100 at rate of 0,01% v/v caused high mortality of insects (20,8%), so it should not be used to evaluate the pathogenicity of a spore suspension. Tween ® 20, at 0,05%, and the humectant Nu-film – 17 at 0,04% v/v did not affect insects, so they can be safely used. Enhanced period of saturated humidity from zero to 48 and 96 hours after the suspension spray tended to raise the pathogenicity of the two studied strains. However, this effect was different in both strains; when the period of saturated humidity increased from zero to 48 hours, the pathogenicity of the strain ILB9 increased while the strain ILB12 strain did not. This technique has a potential use to perform a screening of *Lecanicillium* spp. strains.

Key words: entomopathogenic, *Lecanicillium lecanii*, *Lecanicillium longisporum*, *Lecanicillium attenuatum*, whitefly

2.3. INTRODUCCIÓN

Las especies de mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y *Bemisia tabaci* (Genadius) son plagas primarias en los cultivos hortícolas del Uruguay y su incidencia se ha incrementado en los últimos años (Rodríguez *et al.*, 2003). El uso indiscriminado de insecticidas ha resultado en el desarrollo de resistencia a muchos de ellos (Quesada-Moraga *et al.*, 2006), con el consecuente aumento de dosis e intensidad de uso de los insecticidas de síntesis química. El control biológico de moscas blancas mediante el empleo de enemigos naturales y entomopatógenos constituye una alternativa de gran valor para el control de plagas en la agricultura, con sus consecuentes ventajas en cuanto a inocuidad para el hombre y el medio ambiente. Entre los hongos, las especies del género *Lecanicillium* (Zimmerman) previamente incluidas en la especie *Verticillium lecanii*, presentan capacidad entomopatógena (Hall, 1981), de forma tal que en diversos países existen formulaciones comerciales a base de especies de este género (Kim *et al.*, 2008).

El proceso de desarrollo de insecticidas a base de hongos entomopatógenos para controlar moscas blancas consta de varias etapas. En primer lugar, se debe disponer de un amplio *pool* genético que permita seleccionar aquellos aislados que presenten alta eficacia en el control de plagas y buena adaptabilidad a las condiciones ambientales de uso. La correcta selección de cepas promisorias para el control biológico se logrará sólo si se dispone de las herramientas adecuadas para caracterizar los aislados disponibles (Hatting y Wright 2007). La herramienta bajo condiciones controladas que mejor logra predecir el comportamiento de los hongos entomopatógenos en las condiciones de campo es un bioensayo.

Un bioensayo puede servir para determinar la virulencia de una especie, comparar niveles de virulencia de distintas cepas, determinar rango de hospederos, determinar potencial de epizootias, estudiar factores bióticos y abióticos que afectan la virulencia, como por ejemplo edad del huésped, temperatura, humedad relativa

(HR), formulación, y efecto de planta hospedera (Butt y Goettel 2000). Si bien se puede predecir la virulencia de un aislado extrapolando resultados obtenidos con insectos fáciles de criar, como ser lepidópteros (El-Hawary y El-Salam, 2009; Posada y Vega, 2005) o tenebrios (*Adatia et al.*, 2010), cuanto mejor se reproduzcan las condiciones ambientales en las cuales el entomopatógeno será utilizado, mayor confianza tendrán los resultados (Butt y Goettel, 2000). Por lo tanto, es necesario conocer el cultivo, la plaga, el entomopatógeno y el ambiente.

Todos los bioensayos generan cierto estrés en los insectos a estudiar, ya sea por la manipulación de los mismos, el uso de surfactantes, las condiciones de humedad y temperatura, la alteración de la planta huésped, etc. Es recomendable que los insectos a utilizar se encuentren en buen estado fisiológico y que se reduzca al máximo el estrés generado (Hatting y Wright, 2007). Todo bioensayo debe incluir un testigo sin la aplicación de los entomopatógenos. Goettel e Inglis (1997) agregan que la mortalidad en el testigo debe estar siempre por debajo del 10%.

Varios autores han diseñado bioensayos para evaluar la acción de hongos entomopatógenos sobre moscas blancas. Herrera *et al.* (1999) desarrollaron una metodología para la evaluación de entomopatógenos sobre *Bemisia tabaci*, utilizando discos de hojas de frijol infestadas por ninfas de cuarto estadio. Landa *et al.* (1994) desprendieron los insectos de las hojas y los colocaron sobre portaobjetos dentro de placas de Petri. Vicentini *et al.* (2001) utilizaron hojas enraizadas de melón como sustrato para las ninfas de *B. tabaci*, logrando mantener la turgencia durante el transcurso del bioensayo. Gokce y Er (2004) mantuvieron ninfas de *T. vaporariorum* sobre plantas de tomate, cortando las hojas al momento de la aplicación y colocando un algodón humedecido en la base del pecíolo. En trabajos realizados previamente en INIA Las Brujas, se estableció que la mejor técnica para mantener de forma saludable las ninfas de *T. vaporariorum* era sobre plantas enteras de tomate (Paullier J. com pers²).

² Ing. Agr. Jorge Paullier. Investigador Principal INIA Las Brujas Noviembre 2007.

El insecto sobre el cual el entomopatógeno será estudiado es en sí mismo una variable biótica y por lo tanto deberá estandarizarse en términos de estadio, edad, tamaño y condición fisiológica (Hatting y Wright, 2007). Existe diversidad de opinión entre autores respecto a cuál es el estadio óptimo de las moscas blancas para evaluar la virulencia de los hongos entomopatógenos. En la metodología propuesta por Vicentini *et al.* (2001) la suspensión de conidios se aplicó sobre ninfas del primer estadio; Vidal *et al.* (1998) trabajaron con ninfas de *Bemisia tabaci* (citada como *B. argentifolii*) de segundo estadio, Gokce y Er (2004) con ninfas de *T. vaporariorum* del segundo estadio y Landa *et al.* (1994) desarrollaron una técnica con ninfas de cuarto estadio. En estudios realizados en INIA Las Brujas se detectó gran variabilidad en la virulencia del aislado ILB3 (*Lecanicillium lecanii*) al aplicarlo sobre distintos estadios de *T. vaporariorum*, sugiriendo la necesidad de ajustar este factor (Paullier *et al.*, 2007; Rodríguez y del Pozo; 2003).

El período inmediato de post aplicación es crucial para el proceso de infección y el desarrollo del entomopatógeno en el insecto. Si bien los conidios de *Lecanicillium* spp. sobreviven a una HR entre 80 y 100%, el óptimo para la germinación está por encima de 97%, la germinación es pobre a 95 % y cesa a 92% (Milner y Lutton, 1986). Por debajo de las condiciones óptimas de HR, el microorganismo puede sobrevivir, pero la eficiencia en el control de los insectos descende (Curtis, citado por Burges, 2007). Hall (1981) menciona que entre 11°C y 25 °C, *Lecanicillium* spp. necesita al menos 14 horas de HR de 100% para que las esporas logren germinar, formar el tubo germinativo y el apresorio antes de que la HR descienda a 63-72% y, por ende, lograr altos niveles de virulencia. Otros estudios de este autor indican que las cepas de *Lecanicillium* sp. con alta virulencia logran el 50% de la germinación antes de las 9 horas post aplicación (Hall, 1984).

El objetivo de este trabajo fue definir un protocolo de evaluación que permita caracterizar la virulencia de cepas de *Lecanicillium* spp. Para ello se evaluó el porcentaje de ninfas de *Trialeurodes vaporariorum* muertas luego de la aplicación de una suspensión de conidios del microorganismo en función del estadio de la plaga,

del efecto de coadyuvantes y del efecto de distintos regímenes de HR post aplicación.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Cultivo de plantines de tomate

En todos los experimentos se utilizaron ninfas infestando plantines de tomate de la variedad Loica. Los plantines se produjeron en invernáculo, hasta la infestación con moscas blancas, momento en que pasaron a una cámara de crecimiento acondicionada con luz artificial a una temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y un fotoperíodo de 12:12 horas. Se implantó una planta por maceta, con sustrato a base de turba. Al llegar a una altura de aproximadamente 35 cm y tres hojas verdaderas completamente desarrolladas se les cortó el ápice (aproximadamente 2 cm), para lograr una mejor nutrición de las hojas desarrolladas, y se consideraron listas para la infestación con insectos. Se optó por el sistema de plantas enteras debido a que en trabajos previos realizados con folíolos u hojas se verificó que las condiciones de las mismas, al momento de la evaluación, no garantizaban la ausencia de estrés en los insectos.

2.4.2. Infestación de plantines de tomate con moscas blancas

Para la infestación de los plantines con los insectos, durante cuatro días se inundó la cámara de crecimiento con adultos de *T. vaporariorum*, procedentes de cultivos comerciales de tomate de invernáculos de la zona de Las Brujas, Canelones. Transcurridos cuatro días, en los que ocurrió la oviposición, se aspiraron todos los adultos de las plantas, con una aspiradora entomológica. Los plantines, libres de adultos, fueron colocados en una cámara de crecimiento con las condiciones descritas de temperatura y fotoperíodo. De esta forma se logró una oviposición concentrada, garantizando que todos los individuos de *T. vaporariorum* utilizados en los experimentos fuesen de la misma edad (\pm dos días). El número de ninfas por

plantas siempre fue superior a 80, llegando a máximos de 500 ninfas por planta. El número de ninfas por plantas fue un criterio utilizado para separar los tratamientos en bloques.

2.4.3. Preparación del inóculo fúngico

Con la excepción del experimento de evaluación de coadyuvantes, en todos los demás se pulverizó una suspensión de conidios de *Lecanicillium* spp. sobre los plantines de tomate. Para estudiar la susceptibilidad al entomopatógeno de los estadios ninfales de *T. vaporariorum*, se utilizó el aislado ILB3 correspondiente a *Lecanicillium lecanii*³, mientras que para estudiar el efecto de los regímenes de HR alta en el período post aplicación de la suspensión fúngica, se utilizaron los aislados ILB9 correspondiente a *Lecanicillium longisporum*³ y el ILB12 correspondiente a *Lecanicillium attenuatum*. Se cultivaron colonias de cada aislado en Erlenmeyer de 250 cc de capacidad, dispensados con 15mL de medio de Agar Papa Dextrosa (PDA). Para iniciar el cultivo, se tomó un disco de un cm de diámetro de PDA proveniente de una colonia del entomopatógeno y se lo introdujo en un tubo de ensayo conteniendo 20 cc de agua destilada estéril. Luego de agitar durante unos minutos el tubo de ensayo, se extrajeron 5 cc de la suspensión resultante con pipeta de Pasteur y se vertieron en el Erlenmeyer. Este se inclinó sobre distintos ángulos, asegurándose que la suspensión cubriera toda la superficie del medio de cultivo. Una vez culminado el proceso de inoculación, el Erlenmeyer se colocó durante dos semanas en incubadora a 21 °C, logrando el crecimiento micelial y la producción de conidios necesaria para los bioensayos. Este sistema de inoculación permitió un rápido crecimiento del micelio y la cobertura total del medio de cultivo transcurridas dos semanas.

La colecta de los conidios se realizó vertiendo 25mL del agua destilada en cada Erlenmeyer, posteriormente se agitó en un vortex durante un minuto y finalmente se extrajo la suspensión resultante. Esta suspensión se volcó en un vaso

³ Identificación a cargo de Lic. MSc. Federico Rivas Investigador Asistente INIA Las Brujas

de Bohemia, inclinando el Erlenmeyer suavemente, de forma tal que los restos de agar desprendidos decantasen y no pasaran al vaso de bohemia. Se cuantificó la concentración de conidios por mL de agua, utilizando una cámara de Neubauer. La cámara de Neubauer se cargó con dos alícuotas por suspensión resultante de cada Erlenmeyer y en cada alícuota se contabilizaron 20 cuadrados de 0,2 mm de lado. Todas las suspensiones se llevaron a una concentración de 1×10^7 conidios por mL, mediante diluciones con agua destilada estéril. Las suspensiones de conidios estandarizadas fueron utilizadas para evaluar la mortalidad de ninfas de *T. vaporariorum* en los distintos experimentos.

2.4.4. Efecto del estadio ninfal de *T. vaporariorum*

Para determinar la variación del porcentaje de mortalidad de distintos estadios de desarrollo de *T. vaporariorum* fue necesario lograr oviposiciones secuenciadas. Utilizando la metodología de oviposición concentrada descrita anteriormente, en la cámara de cría con adultos de moscas blancas se introdujeron secuencialmente cuatro grupos de ocho plantines cada cinco días. A los 20 días de haber iniciado este proceso se disponía de ocho plantines con moscas blancas de 18 ± 2 días de edad, ocho plantines con insectos de 13 ± 2 días de edad, ocho plantines con insectos de 8 ± 2 días de edad y ocho plantines con insectos de 3 ± 2 días de edad. De cada grupo de ocho plantines que presentaban insectos de una misma edad, a cuatro se les aplicó una suspensión de conidios y a cuatro se les aplicó agua destilada (testigo sin tratar). Los estadios de la plaga predominantes al momento de la aplicación de la suspensión de conidios fueron: a) para el grupo de 18 ± 2 días de edad, ninfa cuatro y pupas; b) para el grupo de 13 ± 2 días, ninfas dos y tres; c) para el grupo de 8 ± 2 días, ninfa uno y dos; d) para el grupo de 3 ± 2 días, huevos.

Las pulverizaciones se realizaron con una suspensión de conidios del aislado ILB3 de *L. lecanii*. La forma de cultivo y preparación de la suspensión de conidios fue la descrita anteriormente. La suspensión de conidios se aplicó disparando un pulverizador manual dos veces por planta, apuntando a la cara abaxial de las hojas,

alcanzando un volumen estimado de 0,14 mL por planta (Figura 1). Inmediatamente de realizadas las aplicaciones, los plantines fueron colocados en cámara húmeda, a 22 ± 5 °C y HR de 98 ± 2 % (Data logger DS1923-F5# - Hygrochron iButton). Los plantines permanecieron en la cámara húmeda durante 48 horas, luego se quitó la cobertura de la cámara húmeda y durante los 5 días siguientes permanecieron a la misma temperatura, y con una HR de 75 ± 10 % (Data logger DS1923-F5# - Hygrochron iButton). Siete días después de la pulverización con los conidios, mediante la observación de los folíolos bajo lupa binocular (Olympus, de 7 a 40 aumentos) se contabilizó el número de ninfas muertas por el hongo entomopatógeno, calculando la proporción de muertas sobre el total evaluado. El procedimiento se esquematiza en la Figura 2. Los individuos que al momento de la evaluación habían emergido de las pupas, se contabilizaron como ninfas vivas.



Figura 1. Aplicación de la suspensión de conidios de *Lecanicillium* spp. sobre plantines de tomates infestados con *Trialeurodes vaporariorum*.

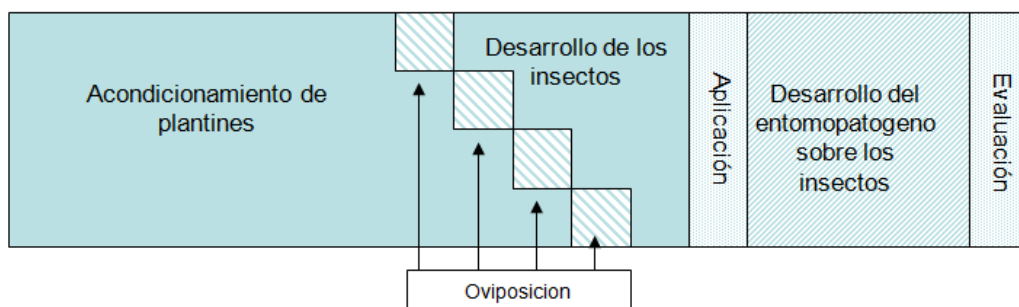


Figura 2. Esquema del acondicionamiento del experimento “Efecto del estadio ninfal de *Trialeurodes vaporariorum*”.

El diseño experimental utilizado fue de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. El criterio para asignar los bloques fue el número de ninfas por planta. A las plantas con menor número de ninfas se les asignó el bloque I, así sucesivamente, hasta que las plantas con mayor cantidad de ninfas conformaron el bloque IV. Para los análisis estadísticos, los valores de proporción fueron transformados a arcoseno de raíz de $p(x)$ para normalizar la distribución y realizar los análisis de varianza correspondientes. Las diferencias entre medias fueron analizadas por el test Tukey ($p= 0,05$) utilizando el paquete estadístico InfoStat (2009).

2.4.5. Efecto de coadyuvantes usados para la preparación de las suspensiones fúngicas

Para estudiar la mortalidad de ninfas de *T vaporariorum* causada por los coadyuvantes frecuentemente utilizados para la preparación de las suspensiones de conidios, se evaluaron: el adherente Polisorbate 20 (Tween ® 20), a razón de 0,05% v/v; el detergente octil-fenol ethoxylado (Triton X-100) a razón de 0,01% v/v; el humectante Pinoleno (Nu-Film – 17) a razón de 0,04% v/v; y un tratamiento control de agua destilada. En el experimento, la suspensión aplicada no contuvo esporas del microorganismo. El acondicionamiento de las plantas, la infestación con los insectos, la aplicación de los tratamientos y las condiciones post-aplicación siguieron las pautas descritas anteriormente. Siete días después de la aplicación, se contabilizó el número de ninfas vivas y muertas, calculando la proporción de muertas sobre el total. El diseño experimental y los análisis estadísticos realizados fueron los mismos que para el experimento anterior.

2.4.6. Efecto de regímenes de HR alta en el período post aplicación de la suspensión fúngica

Se estudió el efecto del período de tiempo luego de la aplicación, en que el sistema planta-plaga-entomopatógeno permaneció a HR de 98 ± 2 %. Con la finalidad de determinar la posible interacción régimen de humedad x aislado, se

aplicó la suspensión de conidios de dos aislados diferentes, más un tratamiento testigo de agua destilada.

Se utilizaron 36 plantines infestados por la plaga; a 12 se les aplicó una suspensión de conidios del aislado ILB12 (*Lecanicillium attenuatum*), a otros 12 se les aplicó una suspensión de conidios del aislado ILB9 (*Lecanicillium longisporum*) y los restantes 12 se dejaron como testigo aplicándoseles agua destilada. Cada grupo de 12 plantas se dividió en tres subgrupos que luego de la aplicación fueron sometidos a distintos regímenes de humedad. Las plantas del subgrupo uno se mantuvieron a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y HR de $70 \pm 5\%$, durante siete días. Las plantas del segundo subgrupo se colocaron en condiciones de saturación de humedad durante dos días y los cinco días restantes, hasta la evaluación, se ubicaron en la misma cámara de crecimiento que las del subgrupo 1. Por último, las plantas del subgrupo 3 se colocaron en condiciones de saturación de humedad durante cuatro días y los tres días restantes hasta la evaluación, en las mismas condiciones del subgrupo 1 (Figura 3). Para lograr la HR de 100 %, las plantas se colocaron en cajas de cartonplast de 40 cm de ancho, 60 cm de largo y 60 cm de alto, cerradas, mantenidas dentro de una cámara de crecimiento (Figura 4). En cada caja se colocaron tres plantas, una de cada tratamiento pulverizado. El número de ninfas por planta de cada caja fue el determinante para la asignación de cada bloque.

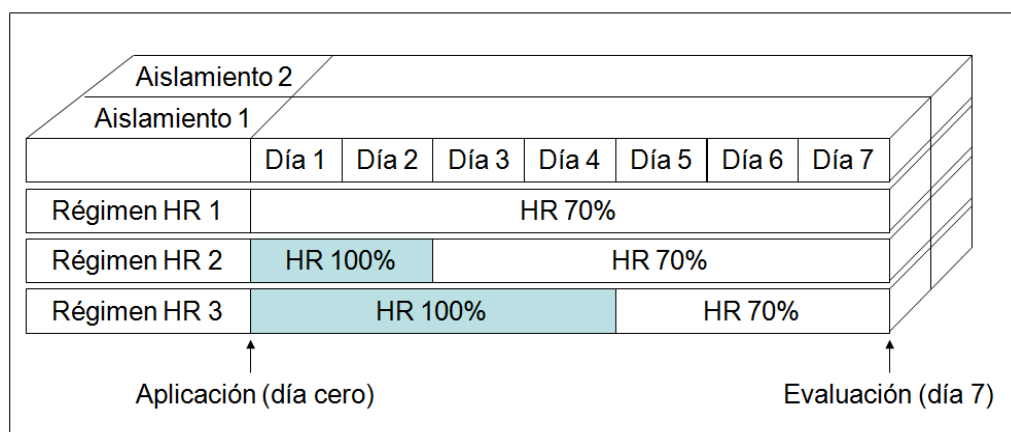


Figura 3. Esquema del diseño del experimento “Efecto de regímenes de HR alta en el período post aplicación de la suspensión fúngica”.



Figura 4. Cámara húmeda donde se conservaron las plantas durante el período de HR alta.

El diseño utilizado fue un arreglo factorial de los tratamientos, con dos aislados de *Lecanicillium* spp., tres regímenes de HR y cuatro repeticiones. Los aislados fueron ILB9 e ILB12, mientras que los regímenes fueron: cero, dos y cuatro días de cámara húmeda, equivalente a HR de 100%. La aplicación de agua destilada no constituyó un tratamiento en el modelo estadístico, ya que su inclusión en el experimento tuvo como objetivo confirmar que la mortandad de los insectos fuese debida a los hongos entomopatógenos. Los datos de proporción fueron transformados a arcoseno de raíz de $p(x)$ para normalizar la distribución, y se analizaron con el modelo: $Y_{ijk} = \mu + \text{Aislado}_i + \text{Régimen de HR}_j + \text{Bloque}_k + \text{Aislado}_i * \text{Régimen de HR}_j + \sum_{ijk}$. Las diferencias entre medias fueron analizadas por el test Tukey ($p= 0,05$) y se utilizó el paquete estadístico InfoStat (2009).

2.5. RESULTADOS

2.5.1 Efecto del estadio ninfal de *T. vaporariorum*

Todos los estadios ninfales fueron susceptibles al aislado ILB3 de *L. lecanii*, diferenciándose significativamente del testigo con agua destilada. No obstante, existió mayor susceptibilidad de las ninfas de segundo y tercer estadio (11 a 15 días de edad) por sobre los otros estadios ninfales (Figura 5).

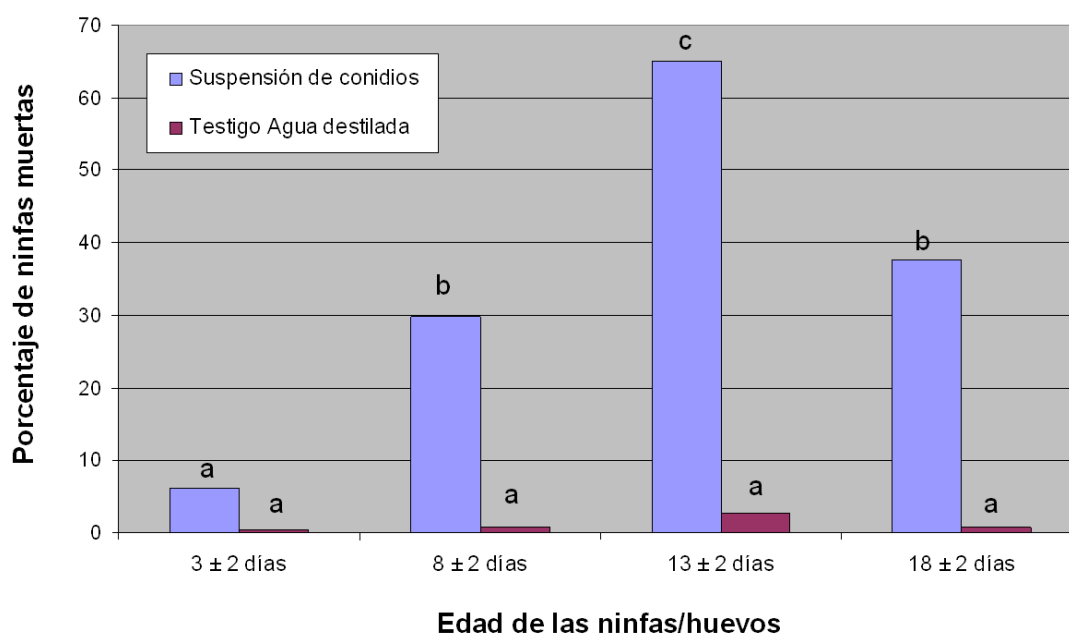


Figura 5. Porcentaje de insectos muertos siete días después de la aplicación de una suspensión de conidios de *Lecanicillium lecanii* de 1×10^7 conidios/mL, según edad al momento de la aplicación. Barras con diferentes letras son significativamente diferentes (Tukey $p=0,05$).

Los insectos que se encontraban en estado de huevo fueron prácticamente insensibles al tratamiento. El promedio de mortalidad de este grupo fue de 6,1%, no diferenciándose significativamente del testigo sin tratar, que fue 1,1% para el promedio general de los cuatro estadios evaluados.

2.5.2 Efecto de coadyuvantes usados para la preparación de las suspensiones fúngicas

La mortandad de ninfas de *T. vaporariorum* fue significativamente diferente según el coadyuvante utilizado (Figura 6). No existieron diferencias significativas entre Nu-Film – 17, Tween ® y el agua destilada estéril, con porcentajes de mortalidad inferiores al 5%. Sin embargo, la aplicación de Triton X 100 al 0,01% causó la muerte al 20,8% de las ninfas utilizadas. Este valor resultó estadísticamente diferente de los otros tres tratamientos.

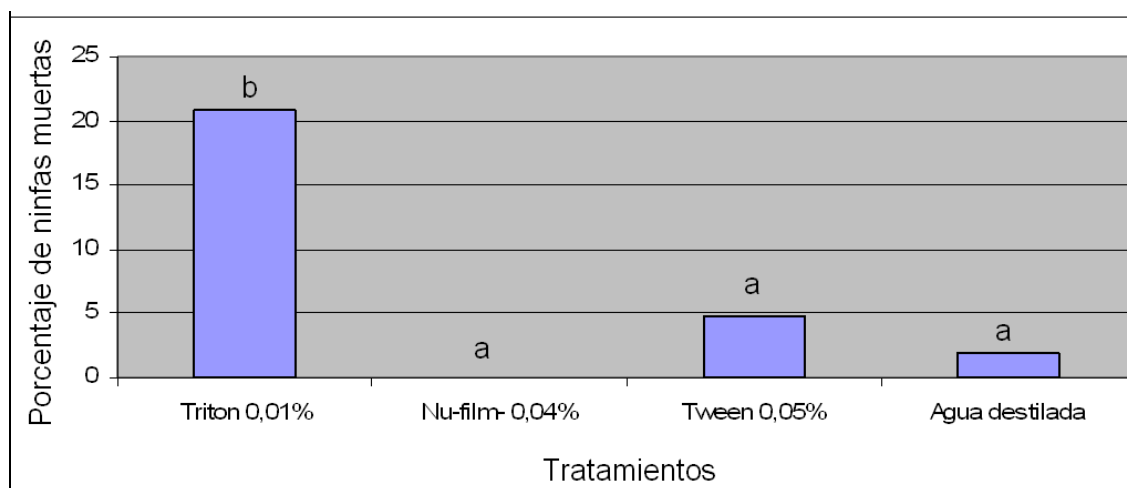


Figura 6 Efecto de coadyuvantes sobre la mortandad de ninfas de segundo estadio de *Trialeurodes vaporariorum*. Barras con diferentes letras son significativamente diferentes (Tukey $p= 0,05$)

2.5.3. Efecto de regímenes de HR alta en el período post aplicación de la suspensión fúngica

Los tratamientos que recibieron aplicación de suspensiones de conidios de *Lecanicillium* spp. (aislados ILB9 e ILB12) presentaron porcentajes de mortalidad de *T. vaporariorum* superiores a 49,9%, mientras que la mortalidad varió entre 2,5 y 4,0% según régimen de HR post aplicación, en aquellos que recibieron sólo agua destilada (testigo).

Cuadro 1. Porcentaje de mortalidad de *Trialeurodes vaporariorum* a los 7 días de la aplicación de los tratamientos según aislado de *Lecanicillium* spp., y condiciones de humedad relativa post aplicación.

| | Régimen de cámara húmeda post aplicación (HR=100%) | | |
|--------------------------------|---|----------------------------|----------------------------|
| | Sin cámara húmeda | 2 días de cámara húmeda | 4 días de cámara húmeda |
| Testigo (agua destilada) | 2,5* | 3,2 | 4,0 |
| ILB9 (<i>L. longisporum</i>) | 49,9 a | 83,6 bc | 96,3 c |
| ILB12 (<i>L. attenuatum</i>) | 56,5 ab | 67,7 ab | 78,1 abc |

* Valores numéricos originales (sin transformación) seguidos por la misma letra, no difieren significativamente por el Test de Tukey ($p=0,05$).

* Coeficiente de variación = 11,85

Para los dos aislados evaluados se registró una tendencia de aumento de la virulencia con el aumento en el período de saturación de humedad. No obstante, estas diferencias no siempre fueron estadísticamente significativas. Para el aislado ILB9, la virulencia con dos y cuatro días de saturación de humedad (83,6 y 96,3%, respectivamente) fue significativamente superior a la registrada en ausencia de cámara húmeda (49,9%). No obstante, para el aislado ILB12, el incremento del período de HR saturada post aplicación no incidió significativamente en su virulencia. Para este aislado los valores de virulencia variaron entre 56,5 y 78,1% para los tres regímenes de humedad, no diferenciándose estadísticamente entre sí (Tukey $p=0,05$). La respuesta diferencial de los dos aislados evaluados al régimen de HR se corrobora por el efecto significativo de la interacción entre factores (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis de varianza del efecto de regímenes de HR alta en el período post aplicación de la suspensión fúngica sobre plantines de tomate infestados con *Trialeurodes vaporariorum*.

| Fuente de Variación | SC | Gl | CM | F | p-valor |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 1 | 5 | 0,20 | 13,12 | 0,001 |
| Aislado | 0,09 | 1 | 0,09 | 6,15 | 0,265 |
| Régimen de HR | 0,71 | 2 | 0,36 | 23,22 | <0,001 |
| Aislado*Régimen de HR | 0,13 | 2 | 0,07 | 4,39 | 0,0332 |
| Error | 0,21 | 14 | 0,02 | | |
| Total | 1,22 | 19 | | | |

2.6. DISCUSIÓN

La mayor susceptibilidad de las ninfas de segundo y tercer estadio, coincide con los resultados de García, citado por Espinel *et al.* (2009), quienes encontraron la mayor susceptibilidad a *Lecanicillum* sp. en ninfas de segundo estadio de *T. vaporariorum*. Trabajos realizados con varios entomopatógenos sobre especies de moscas blancas, presentan resultados con tendencias similares (Cabanillas y Jones, 2009; Espinel *et al.*, 2009; Cuthberston *et al.*, 2005). No obstante, Gindin *et al.* (2000) trabajando con *Lecanicillum* sp. y *B. tabaci* (citado como *B. argentifolii*), determinaron que la mayor susceptibilidad ocurría en las ninfas neonatas. El protocolo de bioensayo sugerido por Burgues (2007) para la evaluación de entomopatógenos sobre moscas blancas menciona a las ninfas de 14 días de edad como más útiles para dicho propósito. Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con esa propuesta.

Considerando la escasa acción patogénica de *L. lecanii* sobre huevos de *T. vaporariorum* la misma ha sido indicada previamente (García, citado por Espinel *et al.*, 2009). Por otra parte, Gindin *et al.* (2000) trabajando con *B. tabaci* (citado como

B. argentifolii), determinaron que huevos con menos de un día desde la oviposición, resultaron inmunes a la aplicación de *Lecanicillium* sp.

Los niveles de mortalidad obtenidos con la aplicación de Triton X 100 al 0,01% fueron superiores al 10%, generalmente considerado como límite para los testigos de bioensayos con entomopatógenos e insectos (Goettel e Inglis, 1997). Por tal motivo, no sería recomendable utilizar este detergente para la preparación de las suspensiones de conidios, ya que puede enmascarar parte de los resultados de mortalidad. Cuthberston *et al.* (2005) obtuvieron similares resultados al evaluar una suspensión conteniendo Agral (ingrediente activo: alkyl fenol etilen oxido) al 0,02%.

Los resultados del efecto de los regímenes de HR alta post aplicación coinciden con los presentados por Drummond *et al.* (1987) al inocular ninfas de *T. vaporariorum* con *Lecanicillium* sp. y conservarlas a HR mayor a 95% durante un período de 96 y 16 horas antes de transferirlas a condiciones de HR de 70%. Los autores hallaron una importante reducción en la actividad del entomopatógeno en el régimen de alta HR de 16 horas. Curtis (citado por Burges, 2007) encontró similares resultados trabajando con áfidos, cuando el período de HR superior a 95% se extendía entre 15 y 18 horas antes de pasar a HR entre 40 y 70 %. Estos resultados se explican porque *Lecanicillium* spp. necesita al menos 14 horas de HR de 100 % para que las esporas logren germinar y formar el tubo germinativo (Hall, 1981).

Algunos autores restan importancia al rol de la HR ambiental al momento de iniciar la infección de los entomopatógenos. Wright *et al.* (2000) trabajando con *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea* lograron entre 56 y 75% de control de *B. tabaci* con humedades relativas próximas al 50% en condiciones de laboratorio y 76% de control en condiciones de campo con humedades relativas entre 39 y 85%. Por su parte, Fargues *et al.* (2003) llegaron a conclusiones similares utilizando *B. bassiana* y *L. lecanii* en invernáculos de tomate infestados por *T. vaporariorum*. Según Boulard *et al.* (2002) la evapotranspiración de las plantas de tomate hace que las condiciones de HR en la capa límite de las hojas (5 mm desde la superficie

foliar), donde habitan las ninfas de mosca blanca, sean sustancialmente mayores que en el ambiente, determinando que la HR pueda no resultar restrictiva para la acción de los entomopatógenos. Por lo tanto, en condiciones en que existe actividad estomática, no sería necesario aumentar la HR ambiente para mejorar el control microbiológico (Fargues *et al.*, 2003). Considerando la respuesta diferencial de los dos aislados estudiados y las dos hipótesis discutidas referentes a este efecto, se estima que para lograr una caracterización completa de los aislados de *Lecanicillium* spp. sería aconsejable estudiar la virulencia en al menos dos regímenes de HR alta post aplicación, 0 y 48 h.

Al seleccionar cepas para el control biológico de la mosca blanca, se busca que posean altos niveles de virulencia y que se adapten a las condiciones climáticas de uso. En condiciones de producción, existen factores de variación (épocas de siembra, cultivos a campo/invernáculo, o densidad de plantación) que afectan las condiciones ambientales, particularmente la duración de los períodos de HR alta. En este sentido, la búsqueda de aislados promisorios para el control biológico puede dirigirse tanto a aislados que presenten altos niveles de virulencia, como a aislados adaptados a períodos cortos de HR alta. Particularmente, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, el aislado ILB9 (*L. longisporum*) presenta mayores niveles de virulencia cuando las condiciones de HR permanecen altas por 48 o más horas, mientras que el aislado ILB12 (*L. attenuatum*) es en general menos patogénico, pero tiene mayor independencia del régimen de humedad prevalente.

2.7. CONCLUSIÓN

A los efectos de definir un protocolo que permita caracterizar correctamente el potencial patogénico de cepas de *Lecanicillium* spp. sobre *T. vaporariorum*, se concluye que: 1) La mayor mortalidad de insectos se logra cuando se aplica la suspensión de conidios a ninfas de segundo y tercer estadio. 2) El detergente Triton X-100 al 0,01% v/v puede ocasionar la muerte a más de un 20 % de las ninfas de

segundo y tercer estadio. El adherente Tween® 20, al 0,05% v/v y el detergente Nu-Film – 17 al 0,04% v/v no afectan significativamente la mortalidad de las ninfas. 3) La humedad relativa durante el período post aplicación del entomopatógeno puede afectar en forma diferencial la virulencia de las distintas especies de *Lecanicillium*, por lo tanto una caracterización completa debería de incluir al menos dos regímenes de humedad relativa (cero horas y 48 horas de humedad relativa de 100%).

2.8. BIBLIOGRAFÍA

Adatia A, Johnson D, Entz S. 2010. Pathogenicity of Two New Isolates of *Metarhizium anisopliae* from Canadian Soil to *Melanoplus bivittatus* (Orthoptera: Acrididae) and *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *The Canadian Entomologist*, 142(2):128-134.

Boulard T, Mermier M, Fargues J, Smits N, Rougier M, Roy JC. 2002. Tomato leaf boundary layer climate: implications for microbiological whitefly control in greenhouses. *Agricultural and Forest Meteorology*, 110(3): 159–176.

Burges DH. 2007. Techniques for testing microbials for control of arthropod pests in greenhouses. En: Lacey L.A. y Kaya H.K. (Eds). *Field manual techniques in Invertebrated Pathology*. Second edition. California, EEUU. University of California Davis. 463-479.

Butt TM, Goettel MS. 2000. Bioassays of Entomogenous Fungi. En: Navon, A. y Ascher (Eds). *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*. Nueva York, EEUU. CABI Publishing. 141-196.

Cabanillas HE, Jones WA. 2009. Pathogenicity of *Isaria sp.* (Hypocreales: Clavicipitaceae) against the sweet potato whitefly B biotype, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Crop Protection*, 28: 333-337.

- Drummond J, Heale JB, Gillepsie AT.** 1987. Germination and effect of reduced humidity on expression of pathogenicity in *Verticillium lecanii* against the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *Annual Applied Biology*, 111: 193–201.
- El-Hawary FM, El-Salam AME.** 2009. Laboratory bioassay of some entomopathogenic fungi on *Spodoptera littoralis* (Boisd.) and *Agrotis ipsilon* (Hufn.) larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Egyptian Academic Journal of biology Science*, 2(2): 1- 4.
- Espinel C, Torres L, Cotes AM.** 2009. Efecto de hongos entomopatógenos sobre estados de desarrollo de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 35 (1): 18-21
- Fargues J, Vidal C, Smits N, Rougier M, Boulard T, Mermier M, Nicot P, Reich P, Jeannequin B, Ridray G, Lagier J.** 2003. Climatic factors on entomopathogenic hyphomycetes infection of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) in Mediterranean glasshouse tomato. *Biological Control*, 28: 320–331.
- Gindin G, Geschtovt NU, Raccah B, Barash I.** 2000. Pathogenicity of *Verticillium lecanii* to Different Developmental Stages of the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Phytoparasitica*, (28)3: 1-11.
- Goettel MS, Inglis, GD.** 1997. Fungi: Hyphomycetes. En: L.A. Lacey (Ed) Manual of Techniques in Insect Pathology. San Diego, USA. Academic Press, 213-249.
- Goettel MS, St Leguer RJ, Rizzo NW, Staples RC, Roberts DW.** 1989. Ultrastructural Localization of a Cuticle-degrading Protease Produced by the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* during Penetration of Host (*Manduca sexta*) Cuticle. *Journal of General Microbiology*, 135.: 2233-2239.

- Gokce A, Er MK.** 2004. Pathogenicity of *Paecilomyces* spp. to the Glasshouse Whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, with Some Observations on the Fungal Infection Process. *Turkey Journal Agricultural Forum*, 29: 331-339.
- Hall RA.** 1984. Epizootic potential for aphids of different isolates of fungus *Verticillium lecanii*. *Entomophaga*, 29: 311–321.
- Hall RA.** 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a Microbial Insecticida against Aphids and Scales. En: Burgues (Ed). *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. Londres. Inglaterra. H. D. Glasshouse Crops Research: 483-498.
- Hatting JL, Wright SP.** 2007. Optimising bioassay precision, with special reference to the Aphididae and Aleyrodidae. En: Ekesi S., Maniania N.K. (Eds). *Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management*. New Delly, India. Research Singspot. 197-237.
- Herrera F, Carballo M, Shannon P.** 1999. Eficacia de cepas nativas de hongos entomopatógenos sobre *Bemisia tabaci*, en el laboratorio. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 54: 37-43.
- Infostat/libre.** 2009. [En Línea] Enero 2012. www.infostat.com.ar
- Kim JJ, Goettel MS, Gillespie DR.** 2008. Evaluation of *Lecanicillium longisporum*, Vertalec[®] for simultaneous suppression of cotton aphid, *Aphis gossypii*, and cucumber powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea*, on potted cucumbers. *Biological Control*, 45(3): 404–409.

- Landa Z, Osborne L, López F, Eyal J.** 1994. A bioassay for determining pathogenicity of entomogenous fungi on whiteflies. *Biological Control*, 4: 341–50.
- Milner RJ, Lutton GG.** 1986. Dependence of *Verticillium lecanii* (Fungi: Hyphomycetes) on high humidities for infection and sporulation using *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) as host. *Environmental Entomology*, 15: 380–382.
- Paullier J, Leoni C, Folch C, Lage P, Núñez P.** 2007. Desarrollo de bioinsecticidas para el control de plagas agrícolas. *Revista INIA, Montevideo. Uruguay, INIA*, 11: 45-47.
- Posada F, Vega F.** 2005. A new method to evaluate the biocontrol potencial of single spore isolates of fungal entomopathogens. *Journal of Insect Science*, 5:37.
- Quesada-Moraga E, Maranhão E, Valverde-García P, Santiago-Alvarez 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 DSA, del Pozo NE.** 2003. Aislamiento de hongos entomopatógenos en Uruguay y su virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum* West. *Agrociencia*, 8(2):71-78.
- Rodríguez M, Paullier J, Buenahora J, Maeso D.** 2003. Mosca blanca: importante plaga de los cultivos hortícolas. Unidad de Agronegocios y Difusión del INIA (Eds) Montevideo, Uruguay. Prontográfica S.A. 1-19.

- Vicentini S, Faria M, de Olivera MRV.** 2001. Screening of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates against nymphs of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) with description of a New Bioassay Method. *Neotropical Entomology*, 30(1): 97-103.
- Vidal C, Osborne LS, Lacey LA, Fargues J.** 1998. Effect of Host Plant on the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for controlling the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) in Greenhouses. *Biological Control*, 12: 191-199.
- Wright SP, Carruthers RI, Jaronski ST, Bradley CA, Garza CJ, Galaini-Wraight S.** 2000. Evaluation of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for Microbial Control of the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biological Control*, 17: 203–217.

3. PROSPECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE *Lecanicillium* spp. (Zimmerman) PARA EL CONTROL DE *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)⁴

3.1. RESUMEN

El control biológico de la mosca blanca de los invernáculos *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) con hongos entomopatógenos, es una alternativa aún no utilizada comercialmente en Uruguay. Una de las carencias que ha presentado esta herramienta es la falta de diversidad genética disponible en las colecciones *ex situ*. Los trabajos realizados con el género *Lecanicillium* (Zimmerman) se han basado en el uso de pocos aislados. El objetivo del trabajo consistió en realizar una prospección de aislados de hongos entomopatógenos, específicamente del género *Lecanicillium* y caracterizarlos fenotípicamente y genotípicamente. A su vez, se buscaron asociaciones entre las características evaluadas. Se colectaron 45 aislados fúngicos, 44 de ellos del género *Lecanicillium*, en su mayoría infectando ninfas de *T. vaporariorum* en invernáculos de la zona Sur del Uruguay. Se identificó una colección de trabajo compuesta por nueve aislados la cual se caracterizó genotípicamente mediante técnicas de RFLP del ADN ribosomal, identificándose al menos cinco haplotipos. En la caracterización fenotípica, se estableció que la actividad de enzimas proteolíticas difirió entre aislados, pero esta característica no pudo asociarse a la virulencia sobre ninfas de mosca blanca. Por último, se identificó al aislado ILB9 (*Lecanicillium longisporum*) como el más virulento y al aislado ILB36 (*Lecanicillium lecanii*) como el menos virulento, los cuales podrán ser utilizados para comparar nuevas cepas que ingresen a la colección. El aislado ILB9 fue el que presentó las características más promisorias para utilizarse como insecticida microbiológico.

Palabras clave: entomopatógeno, hongo, actividad enzimática, virulencia, genotípica

⁴ Artículo a presentarse en revista AGROCIENCIA Uruguay

3.2. ABSTRACT

Survey, characterization and selection of *Lecanicillium* spp. (Zimmerman) isolates to control *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)

Biological control of the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) using entomopathogenic fungi is an alternative that has no commercial use in Uruguay. One of the constraints presented by this tool is the lack of available genetic diversity in *ex situ* collections. The local work done so far with the genus *Lecanicillium* (Zimmerman) has been based on few strains. The aim of this study was to prospect isolates of entomopathogenic fungi, specifically of the genus *Lecanicillium*, perform phenotypic and genotypic characterization, and search for possible associations between traits. Forty five isolates including 44 *Lecanicillium* spp., most of them infecting nymphs of *T. vaporariorum*, were collected in greenhouses in the southern Uruguay. A work collection of nine isolates was selected which was characterized genotypically by RFLP techniques of the ribosomal DNA, identifying at least five haplotypes. The phenotypic characterization established that proteolytic enzyme activity differed among isolates, but this feature could not be associated with virulence on whitefly nymphs. Finally, the isolate ILB9 (*Lecanicillium longisporum*) was identified as the most virulent, and ILB36 (*Lecanicillium lecanii*) as the least virulent. These isolates may be used to compare new strains that enter the collection. The ILB9 isolate presented the most promising characteristics to be used as a microbiological control agent.

Key words: entomopathogenic, fungus, enzymatic activity, pathogenicity, genotypic

3.3. INTRODUCCIÓN

Las especies de mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y *Bemisia tabaci* (Genadius) son plagas primarias en los cultivos hortícolas del Uruguay, y su incidencia se ha incrementado en los últimos años (Rodríguez *et al.*, 2003). El uso indiscriminado de insecticidas ha resultado en el desarrollo de resistencia a muchos de ellos (Quesada-Moraga *et al.*, 2006), con el consecuente aumento de dosis e intensidad de uso de los insecticidas de síntesis química. El control biológico de moscas blancas mediante el empleo de enemigos naturales y entomopatógenos, constituye una alternativa de gran valor para el control de plagas en la agricultura, con sus consecuentes ventajas en cuanto a inocuidad para el hombre y el medio ambiente.

El género *Lecanicillium* (Zimmerman) (denominado *Verticillium lecanii* hasta 2002), presenta varias especies con capacidad entomopatógena. Si bien su rango de hospederos es amplio, son principalmente controladores naturales de algunos hemípteros, tales como áfidos y aleurídidos (Hall, 1981). En distintos países se han desarrollado insecticidas biológicos en base a *Lecanicillium* spp. con niveles exitosos de control. En el Uruguay, el control biológico de la mosca blanca mediante entomopatógenos no se utiliza comercialmente, y los trabajos de investigación se han basado en un número reducido de cepas (Paullier *et al.*, 2007; Rodríguez y del Pozo, 2003).

El proceso de desarrollo de insecticidas a base de hongos entomopatógenos consta de varias etapas. En primer lugar se debería disponer de un amplio pool genético, que permita seleccionar aquellos microorganismos que presenten alta eficacia en el control de plagas y buena adaptabilidad a las condiciones ambientales de uso. Para aumentar la probabilidad de éxito en el desarrollo de insecticidas microbiológicos, y garantizar su disponibilidad en el futuro, es necesario explorar la diversidad existente *in situ*, ampliando la base genética disponible *ex situ*. Una

caracterización precisa de las colecciones *ex situ* facilita la autenticación, conservación y documentación de dichas colecciones (FAO, 2009).

Los estudios de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción del ADN (RFLP) son herramientas que permiten caracterizar genotípicamente los seres vivos. En el caso de los hongos, las regiones del ADN ribosomal (ADNr) son porciones con alto grado de conservación dentro de una especie, aunque una parte de ellas, la no codificante de proteínas (regiones ITS e IGS), puede presentar diferencias entre aislados. Los RFLPs de estas regiones son frecuentemente utilizados para identificar aislados emparentados dentro de una especie o subespecies fúngicas (Bridge, 2002). Varios autores han utilizado las regiones ITS e IGS, para estudiar la filogenia de aislados del género *Lecanicillium* (Kouvelis *et al.*, 2008; Sugimoto *et al.*, 2003; Sugimoto *et al.*, 2001; Zare *et al.*, 1999).

Diversos autores han utilizado caracteres morfo-fisiológicos y ecológicos para la caracterización fenotípica *in vitro* de aislados. El crecimiento según distintos regímenes térmicos, la producción y el tamaño de estructuras reproductivas fueron consideradas por López-Lorca y Carbonell (1999), Cortez-Madrigal *et al.* (2003), Quesada-Moraga *et al.* (2006) y Aiuchi *et al.* (2008). Por otra parte, la producción de enzimas extracelulares es uno de los mecanismos por los cuales los entomopatógenos degradan los componentes de la cutícula (Charnley, 1997). Algunos autores han encontrado asociación entre la productividad de proteasas y la virulencia sobre distintos insectos (Castellanos-Moguel *et al.*, 2008; Goettel *et al.*, 1989), sugiriendo que la estimación de las primeras logra predecir la segunda (Bidochka *et al.*, 1999). En tal caso, caracterizar la actividad de proteasas puede resultar útil tanto para caracterizar un aislado, como para predecir su comportamiento frente a la plaga.

La capacidad de un hongo entomopatógeno para colonizar y matar un insecto plaga es una cualidad imprescindible al seleccionar aislados potenciales como agentes de control biológico. Por tal motivo, una correcta caracterización de aislados

deberá también abarcar este aspecto. La forma más certera de estimar la virulencia de un entomopatógeno es mediante la realización de bioensayos (Butt y Goettel, 2000).

El presente trabajo tiene como objetivo ampliar la colección *ex situ* de aislados de hongos entomopatógenos de *T. vaporariorum* disponibles en el país y caracterizar genotípicamente y fenotípicamente los aislados prospectados. En función de ello se seleccionaron aislados con potencial de uso en el control microbiológico de plagas y otros que sirvan de referencia para futuros trabajos.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. Prospección

La búsqueda se realizó desde abril del 2007 hasta julio del 2009, abarcando todas las estaciones del año. Se colectaron insectos con síntomas de infección por hongos entomopatógenos en cultivos hortícolas de distintas regiones productivas del Uruguay. La mayor parte de las muestras se tomaron de cultivos hortícolas bajo invernáculo en el Departamento de Canelones. También se recorrieron cultivos en los departamentos de Salto, Artigas y Rocha. La mayoría de los cultivos prospectados correspondió a tomate, seguido de cucurbitáceas, pimiento, lechuga y frutilla. De los insectos colectados, *T. vaporariorum* fue la especie predominante, seguida de *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae), *Schizaphis graminum* (Hemiptera: Aphididae), *B. tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) (en Salto y Artigas), *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Crysomelidae) y *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae).

Los insectos se colectaron colocando el folíolo que los contenía dentro de una placa de Petri. En la mayoría de los casos las muestras se llevaron al laboratorio el mismo día; de lo contrario, las muestras se conservaron en refrigerador a 5°C. En el

laboratorio, cada insecto (en su mayoría ninfas) se colocó en una celda de placas de Petri multiceldarias, dispensadas con agar agua manteniéndose a 23 °C. A los dos días, en aquellos insectos en que se observaba micelio desarrollado sobre el agar, con una aguja esterilizada se cortaba una punta de hifa y se inoculaba en una placa con Agar Papa Dextrosa (PDA). Las placas con PDA se conservaron a 23°C, hasta observar el crecimiento de micelio denso que permitiese, a partir de las características morfológicas, tener un indicio de género o grupo taxonómico. En los casos en que crecieron microorganismos contaminantes, fue necesario reaislar el entomopatógeno en una nueva placa de PDA. Todos aquellos insectos que no desarrollaron micelio aparente de entomopatógenos se descartaron.

Una vez en placas de PDA, en base a características morfológicas de la colonia y la observación de estructuras reproductivas bajo microscopio, se identificó el género de cada aislado. Se conformó una lista detallada incluyendo número de aislado, género correspondiente, fecha, localidad, predio comercial, cultivo, y huésped en que fue colectado.

3.4.2. Identificación de la colección de trabajo

Una vez disponibles todos los aislados, se conformó la colección integrando los ocho aislados que presentaban mayor diversidad en cuanto a fecha o estación del año y lugar de colecta, insecto huésped y antecedentes de manejo en cultivo originario. En base a las diferencias en el origen, se estableció como hipótesis que esta colección debería concentrar la mayor diversidad genética, en un número reducido de aislados. Los aislados de la colección de trabajo fueron identificados a nivel de especie en el laboratorio de INIA Las Brujas (Rivas F., com. pers.⁵). Se incluyó en la colección de trabajo la cepa de *Lecanicillium lecanii* ILB3, aislada y caracterizada por Rodríguez y Del Pozo (2003).

⁵ Lic. M.Sc. Federico Rivas. Investigador Adjunto INIA Las Brujas. Diciembre 2008.

3.4.3. Caracterización genotípica

Todos los aislados de la colección de trabajo se cultivaron en placas dispensadas con Agar Malta durante 21 días en incubadora a 22°C en condiciones de oscuridad. Transcurrido este período, gran parte de la superficie de la placa estaba cubierta por micelio. Con una espátula se desprendió el micelio del medio de cultivo, y mediante el agregado de Nitrógeno líquido se molió hasta alcanzar un fino polvo. Posteriormente se transfirió a un micro tubo de 2mL y se continuó de acuerdo al protocolo de extracción de ADN fúngico establecido en el Kit DNeasy Plant Quiagen.

Las regiones ITS del ADN ribosomal (ADNr) se amplificaron utilizando los primers diseñados por White *et al.* (1990): ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'). Para la amplificación de la región IGS del ADNr, se utilizaron los primers CNL12 (5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAG-3') y CNS1 (5'-GAGACAAGCATATGACTACTG-3'), diseñados por Appel y Gordon citados por Sugimoto *et al.* (2001). Las amplificaciones de ambas regiones del ADNr se realizaron según la metodología descrita por Sugimoto *et al.* (2001).

Las regiones ITS e IGS amplificadas fueron digeridas por las enzimas de restricción *Bfu*CI, *Msp* I, *Bsu*RI y *Rsa* I, respetando las instrucciones de los fabricantes (New England Bio Lab, 2012 y Fermentas, 2006). Los productos de la digestión se separaron por electroforesis en un gel de agarosa (4%), identificándose distintos patrones para cada enzima. Los haplotipos se conformaron unificando los resultados de las 4 enzimas en las 2 regiones del ADN amplificado. Aquellos aislados que comparten los 8 patrones de electroforesis fueron asignados al mismo haplotipo.

3.4.4. Actividad enzimática

Se estimó la actividad de las enzimas proteolíticas cuantificando la degradación de un medio de cultivo rico en caseína. Para preparar el medio de cultivo, 10 g de leche descremada en polvo se mezclaron con 15 g de agar, y se disolvieron paulatinamente en 1 L de agua destilada. En el centro de una placa de Petri dispensada con este medio de cultivo, se colocó un disco de 1 cm de diámetro de PDA con micelio en activo crecimiento de cada aislado y se incubaron a 24 °C en condiciones de oscuridad. A los ocho días se midió el diámetro de cada colonia (promedio de dos diámetros perpendiculares) y el diámetro del halo producido en el medio de cultivo a causa de la hidrolización de la caseína (promedio de dos diámetros perpendiculares). Posteriormente se calculó el coeficiente de actividad, dividiendo diámetro de la colonia sobre el diámetro del halo (López-Lorca y Carbonell, 1999). Se utilizó un diseño experimental de parcelas al azar con seis repeticiones.

Paralelamente, se instaló un experimento similar para estudiar la actividad de enzimas lipolíticas. El medio de cultivo consistió en peptona 5 g, extracto de levadura 30 g, agar 15 g, 1 L de agua destilada, y luego de diluidos se agregó una emulsión de Tributirina 10 mL y Tween 20 200 µL.

3.4.5. Virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum*

La caracterización fenotípica en cuanto a la virulencia sobre *T. vaporariorum* se dividió en dos etapas. La primera etapa tuvo como objetivo lograr un tamizado de la virulencia de la colección de trabajo y seleccionar algunos aislados con virulencia contrastante para caracterizarlos más detalladamente en una segunda etapa.

Se aplicó una suspensión de conidios a ninfas de *T. vaporariorum* de segundo y tercer estadio. El material vegetal utilizado para sustentar a los insectos consistió en plantines de tomate (variedad Loica) de tres hojas verdaderas completamente

desarrolladas, implantados uno por maceta con turba como sustrato. Las colonias de los aislados de la colección de trabajo se incubaron durante 14 días a 22 °C en condiciones de oscuridad, en recipientes Erlenmeyer de 250 cc dispensados con PDA. Posteriormente, se extrajeron los conidios con agua destilada estéril y se estandarizó su concentración en 1×10^7 conidios por mL de agua. Luego de la pulverización, los plantines se conservaron dos días a 100% de humedad relativa (HR) y luego durante cinco días a HR de $75 \pm 5\%$. La temperatura promedio durante los siete días del experimento fue de $20 \pm 3^\circ\text{C}$. Finalmente se contabilizó la proporción de insectos muertos sobre insectos totales. El diseño experimental utilizado fue de bloques completos al azar con tres repeticiones. El criterio para la asignación de bloques fue la cantidad de ninfas por planta, siendo promedialmente de 135 ninfas por planta (unidad experimental). Para los análisis estadísticos, los valores de proporción fueron transformados a arcoseno de raíz de $p(x)$ para normalizar la distribución y realizar los análisis de varianza correspondientes. Las diferencias entre medias fueron comparadas con el test Tukey ($p=0,05$) y el paquete estadístico utilizado fue el InfoStat (2009).

En una segunda etapa, se seleccionaron tres aislados que mostraron virulencia contrastante en la primera etapa más el aislado ILB3, y fueron nuevamente evaluados en su virulencia, utilizando la metodología ajustada por Núñez (sin publicar). Estos ensayos se repitieron en dos momentos. En el primer ensayo, luego de la aplicación de la suspensión de conidios las plantas se conservaron durante siete días en una cámara acondicionada a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y en el segundo momento, luego de la aplicación, las plantas se conservaron durante siete días en una sala acondicionada a $20 \pm 2^\circ\text{C}$. En ambos casos se utilizó un diseño en arreglo factorial con cuatro aislados, tres regímenes de HR y cuatro repeticiones. Los regímenes de HR post aplicación fueron: a) cero días a 100% de HR y siete días a 70% de HR; b) dos días a 100% de HR y cinco días a 70% de HR; y c) cuatro días a 100% de HR y tres días a 70% de HR. La proporción de insectos muertos sobre el total de insectos asperjados, se transformó a arcoseno de raíz de $p(x)$ para normalizar la distribución. Los valores transformados se analizaron con el modelo: $Y_{ijk} = \mu + \text{Aislado}_i + \text{Régimen de HR}_j +$

Bloque_k + Aislado_i* Régimen de HR_j + \sum_{ijk} . Las diferencias entre medias fueron comparadas por el test Tukey (5 %) y el paquete estadístico utilizado fue el InfoStat (2009). Adicionalmente, en cada régimen de HR se incluyó un tratamiento con agua destilada, a fin de descartar efectos ajenos a los entomopatógenos sobre la mortandad de los insectos; estos tratamientos no fueron incluidos en el modelo estadístico.

3.5. RESULTADOS

3.5.1. Prospección

Se colectaron 45 aislados de hongos entomopatógenos, conformándose nueve grupos en función de la época de colecta, del cultivo agrícola y de las características morfológicas observadas en PDA (cuadro 1). Los 45 aislados se nombraron con las letras ILB (INIA Las Brujas) seguidas del número correspondiente, 1 a 45.

Cuadro 1. Resumen de aislados de hongos entomopatógenos colectados

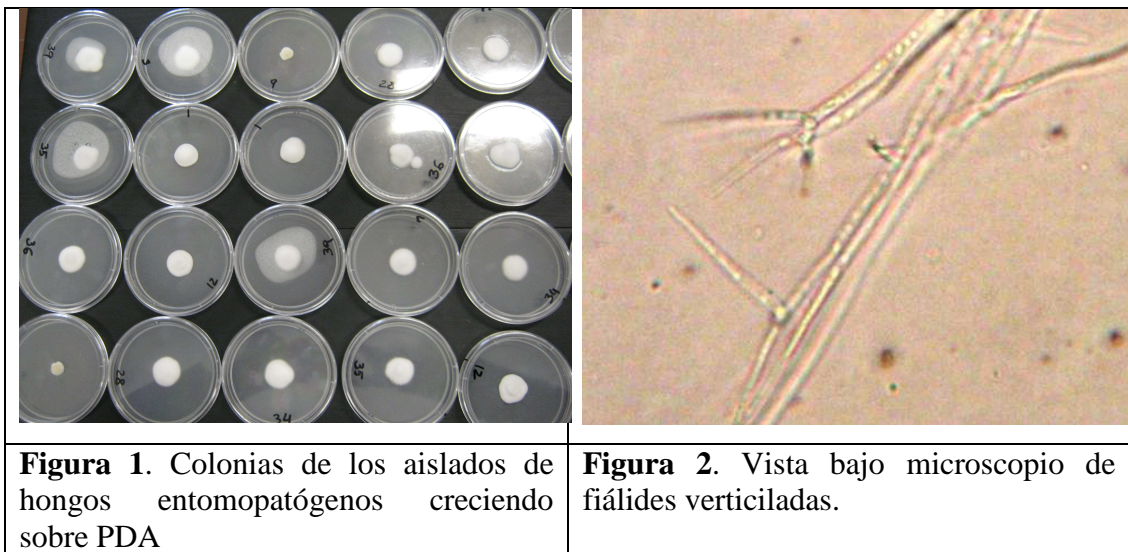
| Cantidad de aislados | Fecha de colecta | Insecto Huésped | Región geográfica (Localidad- Departamento) | Cultivo | Grupo |
|----------------------|------------------|----------------------------------|---|------------------|-------|
| 4 | Abril 07 | <i>Trialeurodes vaporariorum</i> | San Bautista-Canelones | Tomate | A |
| 10 | Mayo 07 | <i>Trialeurodes vaporariorum</i> | San Bautista-Canelones | Tomate | B* |
| 1 | Mayo 07 | <i>Trialeurodes vaporariorum</i> | San Bautista-Canelones | Tomate | C* |
| 2 | Mayo 07 | <i>Trialeurodes vaporariorum</i> | Carrasco-Montevideo | <i>Luffa sp.</i> | D |
| 1 | Junio 07 | <i>Diabrotica speciosa</i> | Santa Rosa-Canelones | Tomate | E |
| 1 | Otoño 07 | <i>Schizaphis graminum</i> | La Estanzuela-Colonia | Alfalfa | F |
| 2 | Noviembre 07 | <i>Trialeurodes vaporariorum</i> | San Bautista-Canelones | Tomate | G |
| 18 | Marzo 08 | <i>Trialeurodes vaporariorum</i> | San Bautista-Canelones | Tomate | H |
| 6 | Agosto 09 | <i>Trialeurodes vaporariorum</i> | Chuy-Rocha | Tomate | I |

* grupos diferenciados por presentar aislados con distintas características morfológicas

Los 45 aislados colectados provienen de sistemas productivos con escasa intervención de fungicidas de síntesis química. Treinta y seis de ellos provienen de cultivos hortícolas que producen bajo las normas de producción orgánica (grupos A, B, C, E, G y H). El aislado ILB9 (grupo F) proviene de un sistema donde no se utilizan plaguicidas, mientras que los del grupo D e I, provienen de invernáculos con producción para autoconsumo.

En lo que respecta a insectos hospederos, 43 de los 45 aislados se encontraron infectando a *T. vaporariorum*, (dos lo hacían sobre adultos, el resto sobre ninfas). Uno de los aislados se encontró creciendo sobre el cuerpo de un San Antonio Verde, *D. speciosa*. El aislado ILB9 de *L. longisporum*, perteneciente al grupo F, se aisló del cuerpo de un pulgón de los cereales, *S. graminum*. En cuanto a las plantas hospederas, la gran mayoría de los aislados (42/45) se aislaron en cultivos de tomate. El aislado del grupo F proviene de un cultivo de alfalfa, y los dos pertenecientes al grupo D, fueron aislados de *T. vaporariorum* infestando una planta de esponja vegetal (*Luffa sp.*)

Con la excepción, del aislado ILB19 perteneciente al grupo C, todos fueron identificados dentro del género *Lecanicillium*. Las colonias cultivadas en PDA presentaron un micelio blanco algodonoso (Figura 1), y el reverso de las mismas era de coloraciones blanco crema, en ocasiones con tonalidades amarillas. En el aislado ILB9, la colonia presentó un aspecto estriado. Los conidios, de aspecto ovoide, se ubicaron en los extremos de las fiálides. Las fiálides se presentaron con una distribución verticilada sobre las hifas (Figura 2), coincidente con la correspondiente al género *Lecanicillium* según Humber (1997). Las características morfológicas de las estructuras reproductivas del aislado ILB19 no coincidieron con las anteriormente descritas; este aislado corresponde al género *Beauveria*.



3.5.2. Identificación de la colección de trabajo (n=9)

La colección de trabajo se conformó por ocho aislados de *Lecanicillium* spp. más la cepa ILB3, aislada por Rodríguez y Del Pozo (2003). Los aislados de los grupos H e I no se consideraron en el estudio, ya que se colectaron después de conformada la colección de trabajo. El aislado ILB28, colectado el 30 de mayo de 2008 provino de un invernáculo en el que 25 días antes se había realizado una aplicación de un preformulado artesanal a base de la cepa ILB3. Si bien entre el 7 y el 30 de mayo se colectaron 10 aislados (grupo B), sólo ILB28 pasó a formar parte la colección de trabajo, dada la posibilidad de que se tratase de un re-aislamiento de la cepa ILB3. El aislado ILB9 se incluyó ya que provenía de otra región geográfica e infectaba a otra especie de insecto. ILB35 e ILB36 pertenecen al mismo grupo y se incluyeron los dos, ya que provienen de distinto lugar geográfico y distinta planta hospedera que la mayoría. Finalmente, el aislado ILB34 se incluyó por infectar una plaga distinta a las demás y el ILB39, por haber sido colectado en una época del año contrastante con el resto.

Cuadro 2. Principales características de los aislados que conformaron la colección de trabajo.

| Grupo | Especie * | Aislado |
|--------------|----------------------------------|----------------|
| - | <i>Lecanicillium lecanii</i> | ILB3 |
| A | <i>Lecanicillium attenuatum</i> | ILB1 |
| F | <i>Lecanicillium longisporum</i> | ILB9 |
| A | <i>Lecanicillium attenuatum</i> | ILB12 |
| B | <i>Lecanicillium lecanii</i> | ILB28 |
| E | <i>Lecanicillium lecanii</i> | ILB34 |
| D | <i>Lecanicillium lecanii</i> | ILB35 |
| D | <i>Lecanicillium lecanii</i> | ILB36 |
| G | <i>Lecanicillium lecanii</i> | ILB39 |

* Identificación a nivel de especie Rivas F. (com. pers.)

3.5.3. Caracterización genotípica

Luego de separar por electroforesis los fragmentos obtenidos de la digestión del ADN amplificado con las enzimas *Sau3A I*, *Msp I*, *Hae III* y *Rsa I*, se obtuvieron distintos patrones de bandas. Al unificar los 8 patrones (4 enzimas x 2 regiones el ADN_r) se obtuvieron al menos cinco haplotipos diferentes (cuadro 3). A los aislados ILB1, ILB9 e ILB28 no se les asignó haplotipo, dado que algunos de sus patrones de electroforesis no fueron claramente identificados.

Cuadro 3. Patrones de bandas de electroforesis de las regiones ITS e IGS digeridas con cuatro enzimas de restricción, y asignación de haplotipos de los aislados de la colección de trabajo.

| Aislado | Grupo | IGS | | | | ITS | | | | Haplotipos |
|---------|----------|--------------------------------|--------------|-------------------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|------------|
| | | <i>Sau3A I</i> <i>BfuCI</i> | <i>Msp I</i> | <i>Hae III</i> BsurI | <i>Rsa I</i> | <i>Sau3A I</i> | <i>Msp I</i> | <i>Hae III</i> | <i>Rsa I</i> | |
| ILB1 | A | n/d | n/d | n/d | n/d | b | b | b | b | n/d |
| ILB3 | - | n/d | b | n/d | n/d | b | b | b | b | I |
| ILB9 | F | n/d | n/d | n/d | n/d | n/d | n/d | n/d | n/d | n/d |
| ILB12 | A | b | c | b | b | b | b | b | b | II |
| ILB28 | B | n/d | n/d | n/d | n/d | b | b | b | b | n/d |
| ILB34 | E | c | d | b | b | b | b | b | b | III |
| ILB35 | D | c | d | b | b | b | b | b | b | III |
| ILB36 | D | c | d | c | b | b | b | b | b | IV |
| ILB39 | G | c | d | b | b | b | b | c | b | V |

n/d No determinado

3.5.4. Actividad enzimática

Todos los aislados evaluados mostraron actividad proteolítica. En la Figura 3 se puede apreciar el crecimiento de una colonia fúngica, rodeada del halo ocasionado por enzimas proteolíticas extracelulares. La relación del diámetro de la colonia / diámetro del halo indican la magnitud de la actividad enzimática. Valores próximos a 1 indican actividad enzimática reducida o nula. En el cuadro 4 se presentan los resultados del coeficiente. Los aislados ILB9 e ILB35 se diferenciaron estadísticamente del aislado ILB12.

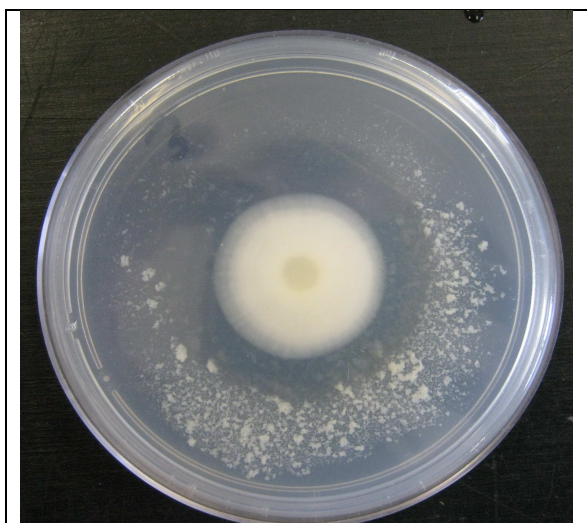


Figura 3. Halo producido por enzimas proteasas del aislado ILB3 de *Lecanicillium lecanii* sobre medio de cultivo a base de leche descremada

Cuadro 4. Actividad proteolítica estimada por la degradación de medio de cultivo a base de leche descremada y virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum* de aislados de *Lecanicillium* spp.

| Aislado | Diámetro colonia / diámetro halo | Virulencia (% mortalidad)* |
|---------|-------------------------------------|-------------------------------|
| ILB9** | 0,609 a | 73,81 b |
| ILB35 | 0,617 a | 40,65 a |
| ILB36** | 0,624 ab | 40,45 a |
| ILB3*** | 0,642 ab | 53,4 ab |
| ILB28 | 0,647 ab | 70,90 b |
| ILB39 | 0,650 ab | 53,2 ab |
| ILB34 | 0,656 ab | 59,10 ab |
| ILB1 | 0,684 ab | 46,55 ab |
| ILB12** | 0,733 b | 63,52 b |

Valores seguidos de una misma letra no difieren significativamente (Tukey p=0,05)

*Valores corregidos por la fórmula de Abbot (1925).

**aislados seleccionados como indicadores de virulencia contrastante para conformar los ensayos de virulencia según 3 regímenes de HR post aplicación

*** aislado de referencia.

En el caso de las lipasas, la metodología utilizada para su estimación no fue la adecuada y no se logró observar la ocurrencia de halo hasta 14 días después de instalado el experimento.

3.5.5. Virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum*

En el primer experimento se cuantificó la virulencia de todos los aislados de la colección de trabajo mediante un bioensayo. En el Cuadro 4 se presentan los porcentajes de mortalidad de insectos siete días después de la aplicación de las suspensiones de conidios de los nueve aislados evaluados.

Existieron diferencias en la mortalidad de insectos según los distintos aislados aplicados. La mortalidad causada por los aislados ILB12 (*L. attenuatum*), ILB28 (*L. lecanii*) e ILB9 (*L. longisporum*) fue significativamente superior a la causada por los aislados ILB36 e ILB35 (*L. lecanii*). La virulencia del resto de los aislados fue intermedia y no se diferenció significativamente de ninguno de los dos extremos. La mortalidad de insectos en el tratamiento testigo fue de 3,05 %.

A partir de estos resultados, se seleccionaron cuatro aislados indicadores, con niveles de virulencia contrastante, para continuar con la caracterización *in vivo*. Los aislados indicadores fueron: ILB9 (*L. longisporum*), ILB12 (*L. attenuatum*), ILB3 e ILB36 (*L. lecanii*). Además del valor de mortalidad obtenido en el bioensayo, los cuatro aislados fueron colectados en cultivos, épocas o huéspedes distintos (Cuadro 2).

En el Cuadro 5 se presentan los datos del análisis de varianza del primer bioensayo de virulencia de los aislados indicadores. El efecto interacción entre los aislados y las horas de cámara húmeda post aplicación fue significativo ($p = 0,046$), por lo tanto los factores no pueden analizarse aisladamente. En casi todos los casos, para un mismo régimen de HR, los aislados no se diferenciaron entre sí, salvo el aislado ILB9 con 96 horas de cámara húmeda que se diferenció del ILB36 (Cuadro

6). Al comparar los distintos regímenes de HR para un mismo aislado, la virulencia se incrementó al aumentar las horas de HR saturada postaplicación. Las diferencias mayores se registraron en función de la utilización o no de la cámara húmeda. No obstante, ninguno de los aislados mostró diferencias estadísticamente significativas según se utilizaran 48 o 96 horas de HR saturada.

Cuadro 5. Análisis de varianza del primer bioensayo de virulencia de los aislados de *Lecanicillium* spp. indicadores sobre *Trialeurodes vaporariorum*.

| Fuente de Variación | SC | Gl | CM | F | p-valor |
|----------------------|------|----|------|-------|---------|
| Modelo | 1,94 | 11 | 0,18 | 14,15 | <0,001 |
| Aislado | 0,08 | 3 | 0,03 | 2,02 | 0,1391 |
| Hs de Cámara Húmeda | 1,68 | 2 | 0,84 | 67,21 | <0,0001 |
| Aislado *Hs de CH | 0,19 | 6 | 0,03 | 2,59 | 0,0460 |
| Error | 0,29 | 23 | 0,01 | | |
| Total | 2,23 | 34 | | | |

Cuadro 6. Virulencia de los aislados indicadores de *Lecanicillium* spp. sobre *Trialeurodes vaporariorum* en tres regímenes de HR post aplicación (primer bioensayo).

| | Sin cámara húmeda | 48 hs de cámara húmeda | 96 hs de cámara húmeda |
|----------------|----------------------|---------------------------|---------------------------|
| ILB3 | 7,7 a | 40,4 bcd | 54,9 de |
| ILB9 | 7,0 a | 44,2 de | 74,6 e |
| ILB12 | 13,7 abc | 35,9 bcd | 50,0 de |
| ILB36 | 13,8 ab | 28,2 abcd | 42,7 cd |
| Testigo | 2,7 | 3,3 | 2,1 |

- Valores reales, diferencias significativas calculadas en base al arcoceno de raíz cuadrada de p. Test de Tukey p=0,05
- Coeficiente de variación = 18,54
- Testigo no incluido en diseño experimental

En el cuadro 7 se presenta el análisis de varianza del segundo bioensayo. En este caso no se constató interacción entre factores. Si bien para cada condición de HR

no existieron diferencias significativas entre aislados, al considerar los 3 regímenes de HR, ILB9 fue superior a ILB12 y a ILB36, mientras que ILB3 sólo fue superior a ILB36 (información no presentada en cuadros). Por otra parte, mientras que los aislados ILB12 e ILB36 no se diferenciaron entre sí en ninguna de las 3 condiciones de humedad evaluadas, los aislados ILB3 e ILB9 presentaron mayor virulencia cuando permanecieron durante 96 o 48 horas en cámara húmeda, respecto a cuando no se ubicaron en cámara húmeda (Cuadro 8).

Cuadro 7. Análisis de varianza del segundo bioensayo de virulencia de los aislados de *Lecanicillium* spp. indicadores sobre *Trialeurodes vaporariorum*.

| Fuente de Variación | SC | GI | CM | F | p-valor |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 1,24 | 11 | 0,11 | 8,80 | <0,001 |
| Aislado | 0,32 | 3 | 0,11 | 8,36 | 0,0006 |
| Hs de Cámara Húmeda | 0,86 | 2 | 0,43 | 33,62 | <0,0001 |
| Aislado *Hs de CH | 0,06 | 6 | 0,01 | 0,74 | 0,6200 |
| Error | 0,31 | 24 | 0,01 | | |
| Total | 1,54 | 35 | | | |

Cuadro 8. Virulencia de los aislados indicadores de *Lecanicillium* spp. sobre *Trialeurodes vaporariorum* en tres regímenes de HR post aplicación (segundo bioensayo)

| | Sin cámara húmeda | 48 hs de cámara húmeda | 96 hs de cámara húmeda |
|----------------|------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| ILB3 | 21,0 a | 60,1 bc | 61,6 bc |
| ILB9 | 31,5 ab | 65,6 c | 69,2 c |
| ILB12 | 22,6 a | 40,4 abc | 44,6 abc |
| ILB36 | 16,6 a | 43,2 abc | 39,7 abc |
| Testigo | 3,6 | 5,5 | 0,8 |

- Valores reales, diferencias significativas calculadas en base al arcoceno de raíz cuadrada de p. Test de Tukey p=0,05
- Coeficiente de variación = 15,95
- Testigo no incluido en diseño experimental

3.6. DISCUSIÓN

A excepción de dos aislados del grupo G (colectados en primavera) y los seis del grupo I colectados en invierno, la mayoría de los aislados se colectaron en otoño. Generalmente las condiciones climáticas en esta época del año se caracterizan por temperaturas moderadas y períodos prolongados de humedad relativa alta, las cuales favorecen el desarrollo de epizootias de *Lecanicillium* spp. en moscas blancas (Lourenção *et al.*, 2001). Por otra parte, suele ser la época del año con mayor población de la plaga, ya que en invierno disminuye notoriamente (Bentancourt y Scatoni, 2010).

Los aislados de la colección de trabajo presentaron diferencias genotípicas. Esto confirma el supuesto realizado al momento de seleccionar dicha colección, respecto a que diferencias en época, región geográfica de colección, y/o huéspedes determinasen diferencias genotípicas. De los seis aislados a los que se les pudo asignar un haplotipo, se identificaron cinco haplotipos diferentes. Sugimoto *et al.* (2001), utilizando idéntica metodología, identificaron 17 haplotipos a partir de 30 aislados. En un trabajo más reciente en el que se incluyeron aislados de regiones

geográficas más contrastantes, Sugimoto *et al.*, (2003) describieron 30 haplotipos sobre 46 aislados. La proporción de haplotipos/aislados en el presente estudio es mayor a la proporción descrita en los trabajos encabezados por Sugimoto (5/6 vs 17/30 y 30/46). Esto podría estar indicando que la diversidad en la colección de trabajo sea mayor que la presente en los aislados utilizados por Sugimoto *et al.* (2001 y 2003). Incluso, se debería considerar que en los trabajos realizados por Sugimoto *et al.* (2003 y 2001) se caracterizaron aislados provenientes de varios insectos huésped, mientras que en el presente trabajo, la mayoría proviene de *T. vaporariorum*. La diversidad genotípica hallada en la colección de trabajo puede tomarse como un indicador de la diversidad presente en los agro-ecosistemas que abarcó el presente estudio.

Al comparar los patrones de bandas de restricción de la colección de trabajo resultante de ambas regiones del ADNr, se aprecia que fue mayor la diversidad detectada en la región IGS respecto a la región ITS. Para la región ITS, un solo aislado de la colección de trabajo, el ILB39, se diferenció del resto de la colección. Por su parte, Zare *et al.* (1999) también encontró poca diversidad al estudiar la región ITS de 36 aislados de *Lecanicillium* spp.

En cuanto a la caracterización fenotípica, el aislado ILB9 presentó el mayor índice de producción de proteasas. A su vez, fue uno de los aislados con índices de virulencia más altos, tanto en la etapa de tamizado de virulencia, como en la evaluación de virulencia de los aislados indicadores. Para este aislado existió asociación entre ambas variables, lo cual ha sido sugerido por diversos autores para varios hongos entomopatógenos (Bidochka *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 1994; Charnley y St Leguer, 1991). Sin embargo, los aislados ILB36 e ILB35 presentaron altos niveles de actividad proteolítica, pero en general mostraron bajos niveles de virulencia. A su vez, el aislado con menor actividad proteolítica (ILB12) presentó niveles de virulencia intermedios. La ausencia de asociación entre las variables también fue citada por López-Llorca y Carbonell (1999). Existen referencias de que la producción de proteasas es simplemente un pre-requisito para ser patogénico

(Samsinakova *et al.*, Smith *et al.*, Dean y Domnas, y Charnley, citados por Gupta *et al.*, 1994). La penetración de la cutícula es un proceso complejo en el que actúa la presión mecánica junto con enzimas que degradan la cutícula (Boucias y Pendland, 1998; Goettel *et al.*, 1989). Por otra parte, un complejo de enzimas actúan de forma sinérgica (St Leger *et al.*, 1995; Charnley y St Leguer, 1991). De acuerdo a estos resultados, no existe evidencia suficiente para afirmar una asociación entre actividad proteolítica y virulencia.

La falta de asociación entre virulencia y actividad de enzimas proteolíticas puede deberse a que *in vitro* no se represente adecuadamente la situación *in vivo*. Las proteasas son las primeras enzimas en producirse (López-Lorca y Carbonell, 1999; Charnley y St Leguer, 1991) y en algunos casos existe un estímulo de la cutícula de los insectos a la producción de enzimas proteasas (Dias *et al.*, 2008; Charnley y St Leguer, 1991). A su vez, pueden existir defensas por parte del insecto como la producción de fenoles, que se expresan *in vivo* y no se consideran en los ensayos *in vitro* (Charnley y St Leguer, 1991). Por último, Charnley y St Leguer (1991) mencionan que la producción de enzimas puede ocurrir cuando son necesarias para que el hongo establezca una relación nutricional con el huésped. No obstante, la actividad de enzimas proteolíticas mostró asociación con el lugar de origen de los aislados. Los aislados ILB36 e ILB35 por un lado, y los aislados ILB1 e ILB12 por otro, provenientes de un mismo cultivo y fecha presentaron niveles muy similares de actividad enzimática. Por otra parte, los aislados ILB1 e ILB12, son los únicos de la colección de trabajo pertenecientes a la especie *L. attenuatum*.

La ausencia de detección de actividad lipolítica puede deberse a escasa o nula producción de dichas enzimas, o a una elección incorrecta del medio de cultivo. El proceso de penetración a la cutícula del insecto es complejo y la producción de las distintas enzimas involucradas suele ser secuenciada. Las lipasas son las últimas en producirse, y pueden retrasarse varios días. En micelio joven, la producción de lipasas puede no ser extracelular. Incluso la actividad de lipasas sobre lípidos de cadena larga (C₁₄) puede retrasarse entre 7 y 14 días (Charnley y St Leguer, 1991).

En el presente estudio las evaluaciones se realizaron hasta el día 14. No deberían descartarse algunos de los argumentos mencionados sobre la actividad proteolítica, respecto a las diferencias en la expresión *in vivo* versus *in vitro*. Respecto a la elección del medio de cultivo, pese a que algunos autores lograron detectar actividad de lipasas producidas por hongos utilizando medios en base a tributirina (Colen *et al.*, 2006), St Leguer citado por Charnley y St Leguer (1991) debieron utilizar sustrato a base de aceite de oliva para detectar la presencia de lipasas extracelulares.

Respecto al nivel de virulencia, el aislado ILB9 correspondiente a *L. longisporum* presentó la mayor virulencia sobre *T. vaporariorum* (entre 69,2 y 74,6 % de virulencia con 96 horas de HR saturada post-aplicación, y entre 44,2 y 73,8% con 48 horas de HR saturada post-aplicación). Esto es un indicador de que dicho aislado tiene potencial para ser incluido en el desarrollo de un insecticida microbiológico. El presente trabajo puede aportar puntos de comparación con futuras prospecciones, para lo cual el aislado ILB9 podrá ser utilizado como indicador de alta virulencia sobre *T. vaporariorum* de la colección disponible en INIA Las Brujas. En el otro extremo, el aislado ILB36 presentó los niveles más bajos de virulencia, por lo que puede utilizarse como indicador de virulencia baja dentro de la colección. Los dos aislados restantes mostraron resultados variables, por lo que no sería aconsejable su uso para comparaciones con futuras prospecciones.

3.7. BIBLIOGRAFÍA

Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.

Aiuchi D, Baba Y, Inami K, Shinya R, Tani M, Koike M. 2008. Variation in growth at different temperatures and production and size of conidia in hybrid strains of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Applied Entomology Zoology*, 43(3): 427-436.

- Bentancourt CM, Scatoni IB.** 2010. *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). En: Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay. Tercera Edición. Montevideo, Uruguay, Hemisferio Sur. 172-173.
- Bidochka MJ, St Leger RJ, Stuart A, Gowanlock K.** 1999. Nuclear rDNA phylogeny in the fungal genus *Verticillium* and its relationship to insect and plant virulence, extracellular proteases and carbohydrases. *Microbiology*, 145 (4): 955-963.
- Boucias DG, Pendland JC.** 1998. General properties of fungal pathogens. En: Boucias y Pendland (Eds). Principles of insect pathology. Massachusetts, EEUU. Chapman & Hall Ltd. 260-286.
- Bridge P.** 2002. The history and application of molecular mycology. *Mycologist*, 16(3): 90-99.
- Butt T.M, Goettel MS.** 2000. Bioassays of Entomogenous Fungi. En: Navon, A. y Ascher (Eds). Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. Nueva York, EEUU. CABI Publishing. 141-196.
- Castellanos–Moguel J, Cruz–Camarillo R, Aranda E, Mier T, Toriello C.** 2008. Relationship between protease and chitinase activity and the virulence of *Paecilomyces fumosoroseus* in *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Mexicana de Micología*; 28: 71-80.
- Charnley AK.** 1997. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. En: Esser K., Wicklow D.T., Soderstrom B. (Eds) The Mycota IV. Environmental and Microbial Relationships. Heidelberg, Alemania.. Springer. 185-201.
- Charnley AK, St Leguer RJ.** 1991. The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis of insects. En: Cole G.T., Hoch H.C.(Eds). The fungal spore and

disease initiation in plants and animals. Nueva York, EEUU. Plenum Publishing Co. 267-286.

Colen G, Gonçalves Junqueira R, Moraes-Santos T. 2006. Isolation and Screening of Alkaline Lipase-producing Fungi from Brazilian Savanna Soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(8): 881-885.

Cortez-Madriral H, Alatorre-Rosas R, Mora-Aguilera G, Bravo-Mojica H, Ortiz-García CF, Aceves-Navarro LA. 2003. Characterization of multispore and monospore isolates of *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* for the management of *Toxoptera aurantii* in cocoa. *Biological Control*, 48: 321–334.

Dias BA, Neves PMOJ, Furlaneto-Maria L, Fulaneto MC. 2008. Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 301-306.

DNeasy Plant Quiagen. 2006. DNeasy® Plant Handbook. [En línea] enero de 2012.en: <http://www.qiagen.com/HB/DNeasyPlant?r=96>

FAO. 2009. Estudio de delimitación del alcance sobre los microorganismos de interés para la alimentación y la agricultura. En: 12.ª reunión ordinaria de la comisión de recursos genéticos para la alimentación y la agricultura. [En línea] Enero 2012 <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/017/k5960s.pdf>

Fermentas 2006. Protocols and Product manuals [En línea]. Enero 2012 <http://www.thermoscientificbio.com/restriction-and-modifying-enzymes/restriction-enzymes/reaction-conditions-for-fastdigest-enzymes-chart/>

Goettel MS, St Leger RJ, Rizzo NW, Staples RC, Roberts DW. 1989. Ultrastructural Localization of a Cuticle-degrading Protease Produced by the

Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* during Penetration of Host (*Mmduca sexta*) Cuticle. *Journal of General Microbiology*, 135, 2233-2239.

Gupta SC, Leathers TD, El-Sayed GN, Ignoffo CM. 1994. Relationships among Enzyme Activities and Virulence Parameters in *Beauveria bassiana* Infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 64: 13-17.

Hall RA. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a Microbial Insecticida against Aphids and Scales. En: Burgues (Ed). *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. Londres. Inglaterra. H. D. *Glasshouse Crops Research*: 483-498.

Humber AR. 1997. Fungi: identification. En: Lacey (Ed). *Manual of Techniques in Insect Pathology*. San Diego. EEUU. Academic Press: 135-185.

Infostat/libre. 2009. [En Linea] Enero 2012. www.infostat.com.ar

Kouvelis VN, Sialakouma A, Typas MA. 2008. Mitochondrial gene sequences alone or combined with ITS region sequences provide firm molecular criteria for the classification of *Lecanicillium* species. *Mycology Research II*, 2: 829-844.

López-Llorca LV, Carbonell T. 1999. Characterization of Spanish strains of *Verticillium lecanii*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 16: 136-142.

Lourenção AL, Miranda MAC, Alves SB. 2001 Ocorrência Epizoótica de *Verticillium lecanii* em *Bemisia tabaci* Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) no Estado do Maranhão. *Neotropical Entomology*, 30(1): 183-185.

New England Bio Lab. 2012. BfuCI. [En Línea] Enero 2012.
<http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0636.asp>

Núñez, P. 2014. Método para evaluar la virulencia de *Lecanicillium* spp. (Zimmerman) sobre *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). En: Prospección y caracterización de hongos entomopatógenos en cultivos hortícolas protegidos. Montevideo: Facultad de Agronomía. 4-26.

Paullier J, Leoni C, Folch C, Lage P, Núñez P. 2007. Desarrollo de bioinsecticidas para el control de plagas agrícolas. *Revista INIA, Montevideo. Uruguay, INIA*, 11: 45-47.

Quesada-Moraga E, Maranhão E, Valverde-García P, Santiago-Alvarez 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 DSA, del Pozo NE. 2003. Aislamiento de hongos entomopatógenos en Uruguay y su virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum* West. *Agrociencia*, 8(2):71-78.

Rodríguez M, Paullier J, Buenahora J, Maeso D. 2003. Mosca blanca: importante plaga de los cultivos hortícolas. Unidad de Agronegocios y Difusión del INIA (Eds) Montevideo, Uruguay. Prontográfica S.A. 1-19.

St Leger RJ. 1995. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Canadian Journal of Botany*, 73: 1119-1125.

Sugimoto M, Koike M, Hiyama N, Nagao H. 2003. Genetic, morphological, and virulence characterization of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 82: 176-187.

- Sugimoto M, Koike M, Nagao H.** 2001. Ribotyping of entomopathogenic *Verticillium lecanii* in Japan. *Phytoparasitica*, 29: 413-420.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (Eds). PCR Protocols A Guide to Methods and Applications. New York, E.E.U.U. Academic Press: 315-322.
- Wright SP, Carruthers RI, Jaronski ST, Bradley CA, Garza CJ, Galaini-Wraight S.** 2000. Evaluation of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for Microbial Control of the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biological Control*, 17: 203–217.
- Zare R, Kouvelis VN, Typas MA, Bridge PD.** 1999. Presence of a 20 bp insertion/deletion in the ITS1 region of *Verticillium lecanii*. *Letters Applied Microbiology*, 28: 258-262.

4. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

Entre abril de 2007 y agosto de 2009 se colectaron 45 aislados de hongos entomopatógenos, que pasaron a formar parte de la colección de entomopatógenos de la Estación Experimental de INIA Las Brujas. En su mayoría, se encontraron infectando ninfas de *Trialeurodes vaporariorum* en cultivos de tomate bajo invernáculo de la zona sur del Uruguay. Salvo un aislado, todos pertenecen al género *Lecanicillium*; en los casos que se identificaron a nivel de especie, correspondieron a las especies *L. attenuatum*, *L. longisporum* y *L. lecanii*.

Se identificó una colección de trabajo integrada por ocho de los aislados colectados, más un aislado de referencia (ILB3, Rodríguez y del Pozo, 2003; Paullier *et al.*, 2007), la cual fue caracterizada genotípicamente y fenotípicamente. El criterio utilizado para identificar la colección de trabajo fue el de integrar en el menor número de aislados la mayor representatividad de lugares, épocas, huéspedes y cultivos de prospección.

Mediante técnicas de poliformismo de los fragmentos de restricción (RFLP) de las regiones ITS e IGS del ADN ribosomal y la posterior separación de los fragmentos por electroforesis, se realizó la caracterización genotípica de la colección de trabajo. Se establecieron al menos cinco haplotipos diferentes, confirmando la hipótesis planteada inicialmente respecto a la existencia de diversidad genotípica en los agro-ecosistemas que abarcó el presente estudio.

La colección de trabajo también fue caracterizada fenotípicamente, evaluándose actividad de enzimas proteolíticas y enzimas lipolíticas. Todos los aislados evaluados mostraron actividad proteolítica, y se registraron diferencias significativas entre aislados. En cuanto a la actividad lipolítica, hasta 14 días después de instalado el experimento, no fue expresada por ningún aislado; se plantea que la metodología utilizada para su estimación no fue la adecuada.

Paralelamente, se trabajó en el desarrollo de una metodología que permitiese evaluar la virulencia de aislados de *Lecanicillium* spp. sobre moscas blancas infestando plantines de tomate. Se estableció que la mayor mortalidad de insectos se logra cuando se aplica la suspensión de conidios a ninfas de entre segundo y tercer estadio. Las ninfas llegaron a dicho estadio luego de infestar plantines de tomate producidos en invernáculo hasta el momento de la oviposición, para luego ser conservados en cámara de crecimiento acondicionada con luz artificial y fotoperíodo de 12:12 horas durante 14 días a 22°C. El detergente Triton X-100 al 0,01% v/v puede ocasionar la muerte a más de un 20% de las ninfas de segundo y tercer estadio. El adherente Tween® 20, al 0,05% v/v y el detergente Nu-Film – 17 al 0,04% v/v no afectaron significativamente la mortalidad de las ninfas. La humedad relativa durante el período post aplicación del entomopatógeno puede afectar en forma diferencial a los distintos aislados, por lo tanto una caracterización completa debería de incluir al menos dos regímenes de humedad relativa (cero horas y 48 horas de humedad relativa de 100%).

Luego de ajustada la metodología se realizó un tamizado de aislados de la colección de trabajo, a fin de seleccionar tres aislados indicadores con virulencia contrastante. Se seleccionó el aislado ILB9 como aislado con virulencia alta, el aislado ILB12 con virulencia intermedia y el aislado ILB36 de bajo nivel de virulencia.

Una vez seleccionados los tres aislados indicadores (ILB9, ILB12 e ILB36), se realizaron dos bioensayos siguiendo la metodología ajustada previamente. Se incluyó además el aislado de referencia ILB3 (Paullier *et al.*, 2007; Rodríguez y del Pozo, 2003). En ambos bioensayos se corroboró el *ranking* de valores de virulencia definido anteriormente (ILB9 como el aislado de mayor virulencia e ILB36 como el aislado de menor virulencia). El aislado ILB12 presentó niveles de virulencia intermedia y los resultados en los distintos ensayos fueron más inconsistentes. Por otra parte, se confirmó la interacción entre aislados y regímenes de humedad relativa saturada post aplicación, mencionada en la etapa de ajuste de la metodología.

Los resultados obtenidos en los perfiles de PCR, en las actividades enzimáticas y en los bioensayos de virulencia, no permitieron asociar las variables estudiadas. No obstante, dadas las diferencias significativas registradas entre aislados, se indica que cualquiera de los tres estudios pueden ser utilizados para caracterizar y describir aislados de *Lecanicillium spp.*

El aislado ILB9 correspondiente a *L. longisporum* fue el que presentó mayor potencial para desarrollar un insecticida microbiológico. Su virulencia, estimada como porcentaje de mortalidad sobre *T. vaporariorum* fue de entre 69,2 y 74,6 % con 96 horas de HR saturada post-aplicación, y entre 44,2 y 73,8 % con 48 horas de HR saturada post-aplicación.

Considerando que se logró ampliar sustancialmente la colección de hongos entomopatógenos de la Estación Experimental INIA Las Brujas, y que se dispone de una metodología que permite medir la virulencia de los aislados del género *Lecanicillium*, los futuros trabajos podrán abordar la caracterización de los aislados que no formaron parte de la colección de trabajo. Por otra parte, la metodología de bioensayos propuesta podrá ser utilizada para evaluar otros factores que afecten la eficacia de los bioinsecticidas en condiciones de campo. Particularmente, aspectos relacionados a la formulación de los insecticidas biológicos. Otro aspecto a considerar es que todos los estudios realizados en este trabajo se focalizaron en el control de *T. vaporariorum*. En el futuro se podrá estudiar el potencial de los aislados colectados para el control de otras plagas. Finalmente, el aislado ILB9 podrá pasar a un siguiente nivel en el desarrollo de formulaciones de insecticidas microbiológicos para el control de la mosca blanca de los invernáculos.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott WS.** 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.
- Adatia A, Johnson D, Entz S.** 2010. Pathogenicity of Two New Isolates of *Metarhizium anisopliae* from Canadian Soil to *Melanoplus bivittatus* (Orthoptera: Acrididae) and *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *The Canadian Entomologist*, 142(2):128-134.
- Aiuchi D, Baba Y, Inami K, Shinya R, Tani M, Koike M.** 2008. Variation in growth at different temperatures and production and size of conidia in hybrid strains of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Applied Entomology Zool*, 43(3): 427-436.
- Basso C.** 2002. Ejemplos de la utilización del control biológico de insectos en el Uruguay. En: Ribeiro A. y Basso C (Eds). *Enemigos naturales como reguladores de poblaciones de insectos: biodiversidad, conservación y manejo*. Montevideo, Uruguay, Facultad de Agronomía Universidad de la República. 179-181.
- Bentancourt CM, Scatoni IB.** 2010. *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). En: *Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay*. Tercera Edición. Montevideo, Uruguay, Hemisferio Sur. 172-173.
- Bidochka MJ, St Leger RJ, Stuart A, Gowanlock K.** 1999. Nuclear rDNA phylogeny in the fungal genus *Verticillium* and its relationship to insect and plant virulence, extracellular proteases and carbohydrases. *Microbiology*, 145 (4): 955-963.

Boucias DG, Pendland JC. 1998. General properties of fungal pathogens. En: Boucias y Pendland (Eds). Principles of insect pathology. Massachusetts, EEUU. Chapman & Hall Ltd. 260-286.

Boulard T, Mermier M, Fargues J, Smits N, Rougier M, Roy JC. 2002. Tomato leaf boundary layer climate: implications for microbiological whitefly control in greenhouses. *Agricultural and Forest Meteorology*, 110(3): 159–176.

Bridge P. 2002. The history and application of molecular mycology. *Mycologist*, 16(3): 90-99.

Burges DH. 2007. Techniques for testing microbials for control of arthropod pests in greenhouses. En: Lacey L.A. y Kaya H.K. (Eds). Field manual techniques in Invertebrated Pathology. Second edition. California, EEUU. University of California Davis. 463-479.

Butt TM, Goettel MS. 2000. Bioassays of Entomogenous Fungi. En: Navon, A. y Ascher (Eds). Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. Nueva York, EEUU. CABI Publishing. 141-196.

Cabanillas HE, Jones WA. 2009. Pathogenicity of *Isaria sp.* (Hypocreales: Clavicipitaceae) against the sweet potato whitefly B biotype, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Crop Protection*, 28: 333-337.

Castellanos–Moguel J, Cruz–Camarillo R, Aranda E, Mier T, Toriello C. 2008. Relationship between protease and chitinase activity and the virulence of *Paecilomyces fumosoroseus* in *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Mexicana de Micología*; 28: 71-80.

Charnley A.K. 1997. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. En: Esser K., Wicklow D.T., Soderstrom B. (Eds) The Mycota IV. Environmental and Microbial Relationships. Heidelberg, Alemania.. Springer. 185-201.

- Charnley AK, St Leguer RJ.** 1991. The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis of insects. En: Cole G.T., Hoch H.C.(Eds). The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Nueva York, EEUU. Plenum Publishing Co. 267-286.
- Colen G, Gonçalves Junqueira R, Moraes-Santos T.** 2006. Isolation and Screening of Alkaline Lipase-producing Fungi from Brazilian Savanna Soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(8): 881-885.
- Cortez-Madriral H, Alatorre-Rosas R, Mora-Aguilera G, Bravo-Mojica H, Ortiz-García CF, Aceves-Navarro LA.** 2003. Characterization of multisporic and monosporic isolates of *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* for the management of *Toxoptera aurantii* in cocoa. *Biological Control*, 48: 321–334.
- Cuthbertson AGS, Walters KFA, Northing P.** 2005. The susceptibility of immature stages of *Bemisia tabaci* to the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* on tomato and verbena foliage. *Mycopathologia*, 159: 23–29.
- Dias BA, Neves PMOJ, Furlaneto-Maria L, Fulaneto MC.** 2008. Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 301-306.
- DNeasy Plant Quiagen.** 2006. DNeasy® Plant Handbook. [En línea] enero de 2012.en: <http://www.qiagen.com/HB/DNeasyPlant?r=96>
- Drummond J, Heale JB, Gillepsie AT.** 1987. Germination and effect of reduced humidity on expression of pathogenicity in *Verticillium lecanii* against the

glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *Annual Applied Biology*, 111: 193–201.

El-Hawary FM, El-Salam AME. 2009. Laboratory bioassay of some entomopathogenic fungi on *Spodoptera littoralis* (Boisd.) and *Agrotis ipsilon* (Hufn.) larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Egyptian Academic Journal of biology Science*, 2(2): 1- 4.

Espinel C, Torres L, Cotes AM. 2009. Efecto de hongos entomopatógenos sobre estados de desarrollo de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 35 (1): 18-21

FAO. 2009. Estudio de delimitación del alcance sobre los microorganismos de interés para la alimentación y la agricultura. En: 12.^a reunión ordinaria de la comisión de recursos genéticos para la alimentación y la agricultura. [En línea] Enero 2012 <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/017/k5960s.pdf>

Fargues J, Vidal C, Smits N, Rougier M, Boulard T, Mermier M, Nicot P, Reich P, Jeannequin B, Ridray G, Lagier J. 2003. Climatic factors on entomopathogenic hyphomycetes infection of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) in Mediterranean glasshouse tomato. *Biological Control*, 28: 320–331.

Fermentas 2006. Protocols and Product manuals [En línea]. Enero 2012 <http://www.thermoscientificbio.com/restriction-and-modifying-enzymes/restriction-enzymes/reaction-conditions-for-fastdigest-enzymes-chart/>

Gindin G, Geschtovt NU, Raccah B, Barash I. 2000. Pathogenicity of *Verticillium lecanii* to Different Developmental Stages of the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Phytoparasitica*, (28)3: 1-11.

- Goettel MS, Inglis, GD.** 1997. Fungi: Hyphomycetes. En: L.A. Lacey (Ed) Manual of Techniques in Insect Pathology. San Diego, USA. Academic Press, 213-249.
- Goettel MS, St Leguer RJ, Rizzo NW, Staples RC, Roberts DW.** 1989. Ultrastructural Localization of a Cuticle-degrading Protease Produced by the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* during Penetration of Host (*Manduca sexta*) Cuticle. *Journal of General Microbiology*, 135.: 2233-2239.
- Gokce A, Er MK.** 2004. Pathogenicity of *Paecilomyces* spp. to the Glasshouse Whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, with Some Observations on the Fungal Infection Process. *Turkey Journal Agricultural Forum*, 29: 331-339.
- Gupta SC, Leathers TD, El-Sayed GN, Ignoffo CM.** 1994. Relationships among Enzyme Activities and Virulence Parameters in *Beauveria bassiana* Infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 64: 13-17.
- Hall RA.** 1984. Epizootic potential for aphids of different isolates of fungus *Verticillium lecanii*. *Entomophaga*, 29: 311-321.
- Hall RA.** 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a Microbial Insecticida against Aphids and Scales. En: Burgues (Ed). Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Londres. Inglaterra. H. D. Glasshouse Crops Research: 483-498.
- Hatting JL, Wright SP.** 2007. Optimising bioassay precision, with special reference to the Aphididae and Aleyrodidae. En: Ekesi S., Maniania N.K. (Eds). Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management. New Delly, India. Research Singspot. 197-237.

- Herrera F, Carballo M, Shannon P.** 1999. Eficacia de cepas nativas de hongos entomopatógenos sobre *Bemisia tabaci*, en el laboratorio. *Manejo Integrado de Plagas* (Costa Rica), 54: 37-43.
- Humber AR.** 1997. Fungi: identification. En: Lacey (Ed). *Manual of Techniques in Insect Pathology*. San Diego. EEUU. Academic Press: 135-185.
- Infostat/libre.** 2009. [En Línea] Enero 2012. www.infostat.com.ar
- Kim JJ, Goettel MS, Gillespie DR.** 2008. Evaluation of *Lecanicillium longisporum*, Vertalec[®] for simultaneous suppression of cotton aphid, *Aphis gossypii*, and cucumber powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea*, on potted cucumbers. *Biological Control*, 45(3): 404–409.
- Kouvelis VN, Sialakouma A, Typas MA.** 2008. Mitochondrial gene sequences alone or combined with ITS region sequences provide firm molecular criteria for the classification of *Lecanicillium* species. *Mycology Research II*, 2: 829-844.
- Landa Z, Osborne L, López F, Eyal J.** 1994. A bioassay for determining pathogenicity of entomogenous fungi on whiteflies. *Biological Control*, 4: 341–50.
- López-Llorca LV, Carbonell T.** 1999. Characterization of Spanish strains of *Verticillium lecanii*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 16: 136-142.
- Lourenção AL, Miranda MAC, Alves SB.** 2001 Ocorrência Epizoótica de *Verticillium lecanii* em *Bemisia tabaci* Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) no Estado do Maranhão. *Neotropical Entomology*, 30(1): 183-185.

- Milner RJ, Lutton GG.** 1986. Dependence of *Verticillium lecanii* (Fungi: Hyphomycetes) on high humidities for infection and sporulation using *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) as host. *Environmental Entomology*, 15: 380–382.
- New England Bio Lab.** 2012. BfuCI. [En Línea] Enero 2012. <http://www.neb.com/nebecomm/products/productR0636.asp>
- Núñez, P.** 2014. Método para evaluar la virulencia de *Lecanicillium* spp. (Zimmerman) sobre *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). En: Prospección y caracterización de hongos entomopatógenos en cultivos hortícolas protegidos. Montevideo: Facultad de Agronomía. 4-26.
- Pascal C, Basso C, Grille G, Franco J.** 2003. Evaluación del tabaco, *Nicotiana tabacum* L., falsa mandioca, *Manihot grammy* H., Ruda, *Ruta graveolens* L., Etrella federal, *Euphorbia pulcherrima* W., y berenjena, *Solanum melongena* L., como plantas hospedadoras para la cría de *Trialeurodes vaporariorum* (westwood) (Homoptera: aleyrodidae). *Revista Chilena de Entomología*, 29: 81-88.
- Paullier J, Leoni C, Folch C, Lage P, Núñez P.** 2007. Desarrollo de bioinsecticidas para el control de plagas agrícolas. Revista INIA, Montevideo. Uruguay, INIA, 11: 45-47.
- Perrachon JP, Basso C, Reyes C.** 2005. Control biológico de la mosca blanca de los invernáculos, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae), por medio del parasitoide *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera: Aphelinidae), en cultivos comerciales de tomate. En: Sociedad Uruguaya de Hortifruticultura (Eds). X Congreso Nacional de la Sociedad Uruguaya de Hortifruticultura Resúmenes. Montevideo, Uruguay. Sociedad Uruguaya de Hortifruticultura.

- Posada F, Vega F.** 2005. A new method to evaluate the biocontrol potencial of single spore isolates of fungal entomopathogens. *Journal of Insect Science*, 5:37.
- Quesada-Moraga E, Maranhão E, Valverde-García P, Santiago-Alvarez 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 DSA, del Pozo NE.** 2003. Aislamiento de hongos entomopatógenos en Uruguay y su virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum* West. *Agrociencia*, 8(2):71-78.
- Rodríguez M, Paullier J, Buenahora J, Maeso D.** 2003. Mosca blanca: importante plaga de los cultivos hortícolas. Unidad de Agronegocios y Difusión del INIA (Eds) Montevideo, Uruguay. Prontográfica S.A. 1-19.
- St Leger RJ.** 1995. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Canadian Journal of Botany*, 73: 1119-1125.
- Sugimoto M, Koike M, Hiyama N, Nagao H.** 2003. Genetic, morphological, and virulence characterization of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 82: 176-187.
- Sugimoto M, Koike M, Nagao H.** 2001. Ribotyping of entomopathogenic *Verticillium lecanii* in Japan. *Phytoparasitica*, 29: 413-420.
- Vicentini S, Faria M, de Olivera MRV.** 2001. Screening of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates against nymphs of *Bemisia tabaci*

(Genn.) biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) with description of a New Bioassay Method. *Neotropical Entomology*, 30(1): 97-103.

Vidal C, Osborne LS, Lacey LA, Fargues J. 1998. Effect of Host Plant on the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for controlling the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) in Greenhouses. *Biological Control*, 12: 191-199.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (Eds). *PCR Protocols A Guide to Methods and Applications*. New York, E.E.U.U. Academic Press: 315-322.

Wright SP, Carruthers RI, Jaronski ST, Bradley CA, Garza CJ, Galaini-Wraight S. 2000. Evaluation of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for Microbial Control of the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biological Control*, 17: 203–217.

Zare R, Kouvelis VN, Typas MA, Bridge PD. 1999. Presence of a 20 bp insertion/deletion in the ITS1 region of *Verticillium lecanii*. *Letters Applied Microbiology*, 28: 258-262.