

# DESARROLLO *in vitro* DE CUATRO CEPAS NATIVAS DE *Paecilomyces fumosoroseus* Y SU PATOGENICIDAD EN ESTADOS INMADUROS DE MOSQUITA BLANCA

## *In vitro* DEVELOPMENT OF FOUR *Paecilomyces fumosoroseus* ISOLATES AND THEIR PATHOGENICITY ON IMMATURE WHITEFLY

Wilberth Chan-Cupul<sup>1</sup>, Esaú Ruiz-Sánchez<sup>1\*</sup>, Jairo Cristóbal-Alejo<sup>1</sup>,  
Alfonso Pérez-Gutiérrez<sup>1</sup>, Ricardo Munguía-Rosales<sup>2</sup>, Joel Lara-Reyna<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico de Conkal. División de Estudios de Posgrado e Investigación. Km 16.3 Antigua Carretera Mérida-Motul, Conkal, Yucatán. C.P. 97345 (esau\_ruiz@hotmail.com).

<sup>2</sup>Comite Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Yucatán. Calle 19 # 443 Colonia Ciudad Industrial. C.P. 97288 Mérida, Yucatán. <sup>3</sup>Colegio de Posgraduados. Campus Campeche. Calle Nicaragua # 91 tercer piso. Col. Santa Ana. C.P. 24150. Campeche, Campeche.

### RESUMEN

El uso de insecticidas químicos en el manejo de la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) (Gennadius) causa serios daños al ambiente y ha generado poblaciones resistentes a los productos convencionales. Una alternativa promisorio es el control biológico mediante hongos entomopatógenos. En el presente estudio se evaluó el desarrollo *in vitro* y la patogenicidad de cuatro cepas nativas (Pf-Tim, Pf-Tiz, Pf-Hal, Pf-Rg) y una comercial (Pae-sin) de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith en huevos y ninfas del primer instar de *Bemisia tabaci* (Gennadius). Las variables para evaluar el desarrollo *in vitro* fueron: tasa de crecimiento diario de la colonia (TCD), esporulación y tasa de germinación de esporas (TGE). La patogenicidad de las cepas se determinó por inmersión de hojas de *Capsicum chinense*, que contenían los inmaduros de *B. tabaci*, en una suspensión conidial  $1 \times 10^7$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ . La TCD de la cepa Pae-sin ( $1.63 \text{ mm d}^{-1}$ ) fue mayor ( $p \leq 0.05$ ) que la de Pf-Hal ( $1.40 \text{ mm d}^{-1}$ ) y Pf-Rg ( $1.35 \text{ mm d}^{-1}$ ). La esporulación no fue diferente ( $p > 0.05$ ) entre los aislamientos nativos y la cepa comercial. La TGE fue mayor ( $p \leq 0.05$ ) en Pf-Rg ( $22 \% \text{ h}^{-1}$ ) que la observada en las otras cepas nativas y en Pae-sin ( $11.91$  a  $12.50 \%$ ). Todos los hongos fueron más patogénicos en ninfas que en huevos; la mortalidad en huevos y ninfas varió de  $29.8$  a  $45.5\%$  y de  $51.4$  a  $74.5\%$ . Con los datos del ensayo de mortalidad en ninfas se calculó el tiempo letal medio ( $\text{TL}_{50}$ ) y el área bajo la curva de la mortalidad acumulada (ABCMA). Los valores menores de  $\text{TL}_{50}$  y mayores de ABCMA se observaron en la cepa Pae-sin con  $3.2 \text{ d}$  y  $311.93$  unidades, y en Pf-Hal con  $3.7 \text{ d}$  y  $301.93$  unidades. El análisis de los resultados indica que no hubo una relación clara entre

### ABSTRACT

The use of chemical insecticides in the management of whitefly (*Bemisia tabaci*) (Gennadius) causes serious damage to the environment and has generated populations resistant to conventional products. A promising alternative is biological control by using entomopathogenic fungi. In the present study the *in vitro* development and pathogenicity of four native strains (Pf-Tim-Tiz Pf, Pf-Hal, Pf-Rg), as well as a commercial (Pae-sin) of *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith were evaluated in eggs and first instar nymphs of *Bemisia tabaci* (Gennadius). The variables to assess the *in vitro* development were: daily growth rate of the colony (TCD), sporulation and spore germination rate (TGE). The pathogenicity of the strains was determined by dipping the leaves of *Capsicum chinense*, which contained the immature stages of *B. tabaci* in a conidial suspension  $1 \times 10^7$  spores  $\text{mL}^{-1}$ . The TCD of the strain Pae-sin ( $1.63 \text{ mm d}^{-1}$ ) was higher ( $p \leq 0.05$ ) than that of Pf-Hal ( $1.40 \text{ mm d}^{-1}$ ) and Pf-Rg ( $1.35 \text{ mm d}^{-1}$ ). Sporulation was not different ( $p > 0.05$ ) between native isolates and the commercial strain. The TGE was higher ( $p \leq 0.05$ ) in Pf-Rg ( $22 \% \text{ h}^{-1}$ ) than that observed in other native strains and Pae-sin ( $11.91$  to  $12.50 \%$ ). All fungi were more pathogenic in nymphs than in eggs; the mortality of eggs and nymphs ranged from  $29.8$  to  $45.5 \%$  and from  $51.4$  to  $74.5 \%$ . With the data of mortality in nymphs, mean lethal time ( $\text{LT}_{50}$ ) and the area under the curve of cumulative mortality (ABCMA) were calculated. The lowest values of  $\text{LT}_{50}$  and the highest of ABCMA were observed in the strain Pae-sin with  $3.2 \text{ d}$  and  $311.93$  units and in Pf-Hal with  $3.7 \text{ d}$  and  $301.93$  units. The analysis of the results indicates that there was no clear relationship between the *in vitro* development capacity of the isolates and their virulence on *B. tabaci* immature stages.

\* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Marzo, 2009. Aprobado: Junio, 2010.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 44: 587-597. 2010.

**la capacidad de desarrollo *in vitro* de los aislamientos y su virulencia sobre los estados inmaduros de *B. tabaci*.**

**Palabras clave:** *Bemisia tabaco*, control biológico, entomopatógenos.

## INTRODUCCIÓN

La mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) es una plaga primaria de especies de plantas de importancia económica, principalmente hortalizas, cultivos básicos y ornamentales (Gutiérrez *et al.*, 2007). *B. tabaci* destaca por causar daños en forma directa mediante la succión de savia, e indirecta, al transmitir begomovirus y manchar el producto con la excreción de sustancias azucaradas sobre las cuales se desarrollan hongos formadores de fumaginas (Ortega, 2002).

Las altas poblaciones de *B. tabaci* en los cultivos conducen a realizar repetidos tratamientos de insecticidas químicos con resultados no satisfactorios. Esta práctica causa riesgos para la salud humana, altos niveles de contaminación ambiental, generación de poblaciones resistentes y efectos negativos en la fauna benéfica (Basso *et al.*, 2001). Por ello, el uso de microorganismos entomopatógenos es una alternativa promisorio al problema de plagas como la mosquita blanca y al uso excesivo de insecticidas químicos. Más de 20 especies de hongos infectan mosquitas blancas, entre las que destacan las que pertenecen a los géneros *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Aschersonia*, *Beauveria* y *Metarhizium* (Pozo y Rodríguez, 2003).

El hongo *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown y Smith (Deuteromycotina: Hyphomycetes) es un patógeno de amplio intervalo de hospederos y gran distribución geográfica, que ha sido aislado del suelo y de insectos de diversos órdenes como homópteros, coleópteros y colémbolos. La patogenicidad de este hongo en *B. tabaci* y su uso potencial como biocontrolador está documentado (Osborne y Landa, 1992; Pozo y Rodríguez, 2003), y se ha desarrollado con éxito algunos productos comerciales derivados del mismo: PreFeRal® en Bélgica, Bemesis® en Venezuela y Pae-sin® en México.

La evaluación de nuevos aislamientos para detectar aquéllos con mejores características es una labor preponderante. Las cepas nativas podrían tener mayor potencial patogénico para el manejo regional de

**Keywords:** *Bemisia tabaci*, biological control, entomopathogenic microorganisms.

## INTRODUCTION

The whitefly (*Bemisia tabaci*) (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) is a primary pest species of economically important plants, mainly vegetables, staple crops and ornamental plants (Gutiérrez *et al.*, 2007). *B. tabaci* is known for causing damage directly by sucking sap and indirectly by transmitting begomovirus and staining the product with the excretion of sugar substances on top of which fungi emerge leading to the formation of sooty mold (Ortega, 2002).

The high populations of *B. tabaci* in crops lead to make repeated treatments of chemical insecticides with unsatisfactory results. This practice entails risks to human health, high levels of environmental pollution, generation of resistant populations and negative impact on beneficial fauna (Basso *et al.*, 2001). Therefore, the use of entomopathogenic microorganisms is a promising alternative to the problem of pests such as whitefly and the excessive use of chemical insecticides. More than 20 species of fungi infect whiteflies, among them those belonging to the genders *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Aschersonia*, *Beauveria* and *Metarhizium* (Pozo and Rodríguez, 2003).

The fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith (Deuteromycotina: Hyphomycetes) is a pathogen of wide host range and wide geographical distribution, which has been isolated from the soil and insects of different orders such as Homoptera, Coleoptera and Collembola. The pathogenicity of this fungus on *B. tabaci* and its potential use as a biological control agent have been reported (Osborne and Landa, 1992, Pozo and Rodríguez, 2003), and some commercial products derived from it have been successfully developed: PreFeRal® in Belgium, Bemesis® in Venezuela and Pae-sin® in México.

The evaluation of new isolates to detect those with the best features is highly necessary. The native strains might have a more pathogenic potential for the regional management of *B. tabaci* since they are adapted to the specific environmental conditions of these areas. Therefore, the aim of this study was to characterize the *in vitro* development of four native

*B. tabaci* por estar adaptadas a las condiciones ambientales específicas de esas áreas. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar el desarrollo *in vitro* de cuatro aislamientos nativos y uno comercial de *P. fumosoroseus* y comparar su patogenicidad en estados inmaduros de *B. tabaci*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Establecimiento de la colonia de *B. tabaci*

La colonia de *B. tabaci* se estableció en el invernadero de adaptación del Instituto Tecnológico de Conkal (ITC), Conkal, estado de Yucatán, México, en jaulas entomológicas de 1.2 × 1.2 × 1.0 m construidas con aluminio y malla antiáfidos de 16/16 hilos cm<sup>2</sup>. Los adultos de *B. tabaci* fueron recolectados de cultivos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) del área de producción hortícola del ITC. La identidad de los insectos se corroboró con base en las características morfológicas de las ninfas (Ortega, 2002). Los insectos fueron confinados con plántulas de *C. chinense* de 30 d de edad, establecidas en macetas de plástico con sustrato cosmopeat (Cosmocol®, Canadá). Los adultos ovipositaron por 48 h en las plantas de *C. chinense* y fueron retirados para iniciar la colonia con los huevos que estaban en las hojas. Debido al daño que la alta población de adultos producía a las plantas, éstas se sustituyeron cada 15 a 20 d para proveer de hospederos nuevos a *B. tabaci*.

### Multiplicación de los aislamientos

Las cepas nativas de *P. fumosoroseus* se aislaron de mosquitas blancas y fueron proporcionadas por el Laboratorio de Reproducción de Hongos Entomopatógenos del Comité Estatal de Sanidad Vegetal del estado de Yucatán. La identidad de los hongos fue confirmada mediante características morfológicas y coloración del conidio, conidióforo y colonia, de acuerdo a Humber (1998) y Barnett y Hunter (2003).

Los aislamientos Pf-Tim, Pf-Tiz y Pf-Hal son originarios de Yucatán y Pf-Rg de Zacapa, Guatemala. Se incluyó una cepa de referencia comercialmente disponible conocida como Pae-sin (Agrobionsa, México). Los hongos fueron reactivados en medio artificial Sabouraud-Dextrosa-Agar (SDA) (Merck, Alemania) más 0.5 mg L<sup>-1</sup> de cloranfenicol (Lab. Sophia S. A. de C. V. México) y desarrollados en laboratorio a 27 ± 3 °C y 14 h de fotoperíodo.

### Desarrollo *in vitro* de los aislamientos

El desarrollo *in vitro* se evaluó mediante la tasa de crecimiento diario de la colonia (TCD), esporulación y tasa de germinación

isolates and one commercial of *P. fumosoroseus* and compare their pathogenicity in immature stages of *B. tabaci*.

## MATERIALS AND METHODS

### Establishment of the *B. tabaci* colony

The colony of *B. tabaci* was established in the adaptation greenhouse of the Instituto Tecnológico de Conkal (Conkal Technological Institute) (ITC), in the state of Yucatán, Mexico, in entomological cages of 1.2 × 1.2 × 1.0 m constructed of aluminum and 16/16 cm<sup>2</sup> anti-aphid mesh. The *B. tabaci* adults were collected from crops of habanero chili (*Capsicum chinense* Jacq.) from the horticultural production area of the ITC. The identity of insects was confirmed upon the basis of the morphological characteristics of the nymphs (Ortega, 2002). Insects were confined with seedlings of *C. chinense* 30 d of age, established in plastic pots with cosmopeat (Cosmocol®, Canada) substrate. Adults oviposited for 48 h in plants of *C. chinense* and were withdrawn to start the colony with eggs that were on the leaves. Due to the damage that the high population of adults produced to plants, these were replaced every 15 to 20 d to provide new hosts to *B. tabaci*.

### Multiplication of isolates

The native strains of *P. fumosoroseus* were isolated from whiteflies and provided by the Laboratorio de Reproducción de Hongos Entomopatógenos del Comité Estatal de Sanidad Vegetal (laboratory of entomopathogenic fungi reproduction of the state committee for plant protection) of the state of Yucatán. The identity of fungi was confirmed through the morphological characteristics and color of conidia, conidiophores and the colony, according to Humber (1998) and Barnett and Hunter (2003).

The isolates Pf-Tim, Pf-Tiz and Pf-Hal are from Yucatán and Pf-Rg from Zacapa, Guatemala. A reference strain commercially available known as Pae-sin (Agrobionsa, México) was included. Fungi were reactivated in medium Sabouraud-Dextrose-Agar (SDA) (Merck, Germany) containing 0.5 mg L<sup>-1</sup> chloramphenicol (Lab. Sophia S.A. de C.V. México) and grown in laboratory at 27 ± 3 °C and 14 h of photoperiod.

### Development *in vitro* of isolates

The development *in vitro* was assessed with the daily growth rate of the colony (TCD), sporulation and spore germination rate (TGE). The TCD was measured using the methodology by

de esporas (TGE). La TCD se midió usando la metodología de Skrobek (2001). Se colocó 1  $\mu\text{L}$  de una solución conidial de  $1 \times 10^7$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  en el centro de cada caja petri (60  $\times$  15 mm) que contenía 10 mL de medio de cultivo SDA; las cajas petri inoculadas se incubaron en las condiciones antes descritas. El diámetro de la colonia se midió diariamente (15 d) por el reverso de la caja petri para calcular su tasa de crecimiento ( $\text{mm d}^{-1}$ ).

La producción de esporas se determinó con la metodología descrita por Gindin *et al.* (2000). En las cajas petri con las colonias usadas para evaluar el crecimiento diametral se agregó 10 mL de agua destilada esterilizada más 5  $\mu\text{L}$  de Tween 80 (Merck, Alemania). Luego la colonia se raspó con una espátula esterilizada y el producto obtenido se filtró a través de una gasa esterilizada para separar los conidios de las impurezas y micelio. La concentración de esporas de la solución conidial se determinó usando una cámara de Neubauer doble rayado línea regular (Marienfeld, Alemania) y un microscopio estereoscópico (Modelo BME L13395H11, Leica Inc., USA).

La evaluación del TGE se efectuó con la metodología de Berlanga-Padilla y Hernández-Velázquez (2002). Se colocaron cinco gotas de 2  $\mu\text{L}$  de una suspensión conidial de  $1 \times 10^7$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  en cajas de petri (100  $\times$  15 cm) con medio SDA; sobre las gotas se colocaron cubreobjetos para la observación. Cada hora se contabilizaron 100 esporas al azar y se registró su tasa de germinación ( $\% \text{ h}^{-1}$ ), considerando como germinadas aquellas que presentaban un tubo germinativo con una longitud igual o mayor que la de la espóra.

#### **Obtención de estados inmaduros de *B. tabaci* para los bioensayos**

Plantas de *C. chinense* de 30 d de edad se usaron como hospedadoras de *B. tabaci*. Los estados inmaduros se obtuvieron con la metodología de Muñiz y Nombela (2001). Cinco adultos de la colonia de *B. tabaci* se tomaron con un aspirador bucal y se depositaron en una jaula pinza de 1 cm de diámetro. Las microjaulas se colocaron en hojas completamente extendidas de la parte superior de las plantas hospedadoras; los adultos y las jaulas pinza se retiraron a las 24 h y los huevos ovipositados se usaron inmediatamente. Para los bioensayos con ninfas los huevos se dejaron en las hojas por 5 a 7 d hasta obtener ninfas de primer instar.

#### **Patogenicidad de *P. fumosoroseus* en huevecillos y ninfas de *B. tabaci***

Las suspensiones conidiales se obtuvieron de las colonias cultivadas en medio SDA, como ya se describió (Gindin *et al.*, 2000). Los conidios de *P. fumosoroseus* se aplicaron a los inmaduros de *B. tabaci* según la metodología de Al-Deghairi (2008).

Skrobek (2001). One  $\mu\text{L}$  of a conidial suspension of  $1 \times 10^7$  spores  $\text{mL}^{-1}$  was placed in the center of each petri dish (60  $\times$  15 mm) containing 10 mL of SDA cultivation environment; the petri inoculated dishes were incubated under the conditions described above. The diameter of the colony was measured daily (15 d) on the back of the petri dish to calculate its growth rate ( $\text{mm d}^{-1}$ ).

The production of spores was determined by the method described by Gindin *et al.* (2000). Ten mL of sterile distilled water were added plus 5  $\mu\text{L}$  of Tween 80 (Merck, Germany) were added to the petri dishes with the colonies used to evaluate the diameter growth. Then the colony was scraped with a sterile spatula and the product was filtered through sterilized gauze to separate the conidia from impurities and mycelium. The concentration of spores of the conidial suspension was determined using a Neubauer double striped regular line chamber (Marienfeld, Germany) and a stereoscopic microscope (Model BME L13395H11, Leica Inc., USA).

The TGE assessment was carried out with the methodology by Berlanga-Padilla and Hernández-Velázquez (2002). Five drops of 2  $\mu\text{L}$  of a conidial suspension of  $1 \times 10^7$  spores  $\text{mL}^{-1}$  were placed in petri dishes (100  $\times$  15 cm) with SDA environment. Over the drops coverslips were placed for observation. Every hour 100 spores were randomly counted and their germination rate ( $\% \text{ h}^{-1}$ ) was recorded. Spores were considered to be germinated when the length of the germ tube was equal to or longer than that of the spore.

#### **Collection of immature *B. tabaci* for bioassays**

*C. chinense* plants aged 30 d were used as hosts for *B. tabaci*. The immature stages were obtained with the methodology by Muñiz and Nombela (2001). Five adults of the *B. tabaci* colony were taken using a mouth aspirator and placed in a clip cage 1 cm in diameter. The clip cages were placed in fully extended leaves from the top of the host plants; adults and clip cages were removed at 24 h and the oviposited eggs were used immediately. For bioassays with nymphs eggs were left on the leaves for 5-7 d until obtaining the first instar nymphs.

#### **Pathogenicity of *P. fumosoroseus* in eggs and nymphs of *B. tabaci***

Conidial suspensions were obtained from colonies cultured on SDA environment, as described previously (Gindin *et al.*, 2000). Conidia of *P. fumosoroseus* were applied to *B. tabaci* immatures based on the methodology by Al-Deghairi (2008). Conidial suspensions of  $1 \times 10^7$  spores  $\text{mL}^{-1}$  were applied by dipping the *C. chinense* leaves containing eggs or nymphs for 15 s.

Soluciones conidiales de  $1 \times 10^7$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  se aplicaron por inmersión de las hojas de *C. chinense* que contenían los huevos o ninfas por 15 s. El testigo fue tratado con agua destilada esterilizada más Tween 80 al 0.05 % v/v. Las plantas con las hojas tratadas se mantuvieron en el laboratorio a  $27 \pm 3$  °C y humedad relativa de  $75 \pm 8$  % para evaluaciones diarias de la mortalidad de huevos por 7 d y de ninfas por 12 d. Se usó un microscopio estereoscópico para observar los individuos muertos, contabilizando como huevos muertos los micosados, deformes y no eclosionados (Gindin *et al.*, 2000; Skrobek, 2001). En los bioensayos con ninfas se consideraron como muertas aquéllas con cambios de coloración, brillo, forma, aspecto del cuerpo y recimiento de micelio sobre éstas (Pozo y Rodríguez, 2003).

### Diseño experimental y análisis de datos

El diseño experimental fue completamente al azar con cinco repeticiones. Los experimentos de desarrollo *in vitro* se analizaron (ANDEVA y comparación de medias Tukey,  $p \leq 0.05$ ) usando GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., 2000). Para los experimentos de crecimiento de la colonia y esporulación, las unidades experimentales fueron las cajas petri con las colonias de los hongos; para la variable tasa de germinación de esporas, la unidad experimental fue un grupo de 100 esporas observadas al azar, y sembradas en cajas petri con medio SDA. Para los bioensayos con huevos y ninfas la unidad experimental fue un grupo de 25 a 30 huevos o ninfas establecidas en una hoja. Los datos de los bioensayos se analizaron con SAS ver. 8e para Windows (SAS Institute Inc., 2000), con el cual se calculó el  $TL_{50}$  mediante análisis probit. El área bajo la curva de la mortalidad acumulada (ABCMA) se calculó con la siguiente ecuación (Campbell and Madden, 1990):

$$ABCMA = \sum_1^{n-1} (y_i + y_{i+1}) / 2x(t_{i+1} - t_i)$$

donde,  $n$  es el número de evaluaciones;  $y$  es el porcentaje acumulado de mortalidad;  $t$  es el número de días entre cada evaluación. La primera evaluación se realizó con  $t=1$  y  $y=0$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Desarrollo *in vitro* del hongo

La tasa diaria de crecimiento diametral fue significativamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) entre los aislamientos

The control was treated with sterile distilled water plus 0.05 % Tween 80 v/v. The plants containing treated leaves were kept in the laboratory at  $27 \pm 3$  °C and relative humidity of  $75 \pm 8\%$  for daily assessments of egg mortality for 7 d and nymphs for 12 d. A stereoscopic microscope was used to observe the dead individuals, counting as dead eggs the fungi infested, deformed and non-hatched (Gindin *et al.*, 2000; Skrobek, 2001). In the bioassays the nymphs considered dead were those exhibiting changes in color, brightness, shape, body appearance and growth of mycelium above cuticle (Pozo and Rodríguez, 2003).

### Experimental design and data analysis

The experimental design was completely randomized with five replications. The *in vitro* development experiments were analyzed (ANOVA and Tukey mean comparison,  $p \leq 0.05$ ) using GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., 2000). For the experiments of colony growth and sporulation, the experimental units were petri dishes containing colonies of fungi, while for the variable rate of spore germination, the experimental unit consisted of a group of 100 spores observed at random that were inoculated in petri dishes containing SDA medium. For bioassays with eggs and nymphs the experimental unit consisted of a group of 25 to 30 eggs or nymphs set on a leaf. Data from the bioassays were analyzed with SAS ver. 8e for Windows (SAS Institute Inc., 2000), with which  $TL_{50}$  was also calculated by using probit analysis. The area under the curve of cumulative mortality (ABCMA) was calculated using the following equation (Campbell and Madden, 1990):

$$ABCMA = \sum_1^{n-1} (y_i + y_{i+1}) / 2x(t_{i+1} - t_i)$$

where,  $n$  is the number of evaluations;  $y$  the cumulative percentage of mortality;  $t$  is the number of days between each assessment. The first evaluation was done with  $t=1$  and  $y=0$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

### *In vitro* development of the fungus

The daily rate of diameter growth was significantly different ( $p \leq 0.05$ ) among the isolates (Table 1); the reference strain Pae-sin and the native Pf-Tiz exhibited higher diameter growth than that of Pf-Rg. The diameter growth rates of Pf-Hal, Pf-Tim and Pf-Rg were not different ( $p > 0.05$ ).



**Cuadro 1. Tasa de crecimiento diametral (TDC), esporulación y tasa de germinación (medias  $\pm$  error estándar) *in vitro* de cinco aislamientos de *P. fumosoroseus*.****Table 1. Diameter growth rate (TDC), sporulation and *in vitro* germination rate (mean  $\pm$  standard error) of five *P. fumosoroseus* isolates.**

Aislamiento	TCD (mm d <sup>-1</sup> )	Esporulación (10 <sup>6</sup> esporas mL <sup>-1</sup> )	Tasa de germinación (% h <sup>-1</sup> )
Pae-sin	1.63 $\pm$ 0.09 a	2.06 $\pm$ 0.22 a	12.2 $\pm$ 0.31 b
Pf-Tiz	1.58 $\pm$ 0.08 ab	2.49 $\pm$ 0.26 a	12.5 $\pm$ 0.00 b
Pf-Tim	1.52 $\pm$ 0.06 abc	2.21 $\pm$ 0.20 a	12.3 $\pm$ 0.18 b
Pf-Hal	1.40 $\pm$ 0.06 bc	2.19 $\pm$ 0.30 a	11.9 $\pm$ 0.12 b
Pf-Rg	1.35 $\pm$ 0.02 c	2.13 $\pm$ 0.18 a	22.9 $\pm$ 0.62 a

Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) ♦ Means with different letter in a column are statistically different ( $p \leq 0.05$ ).

(Cuadro 1); la cepa de referencia Pae-sin y la nativa Pf-Tiz mostraron mayor crecimiento diametral que Pf-Rg. Las tasas de crecimiento diametral de Pf-Hal, Pf-Tim y Pf-Rg no fueron diferentes ( $p > 0.05$ ).

La producción de esporas no fue diferente ( $p > 0.05$ ) entre los aislamientos nativos y el de referencia (Cuadro 1); la cantidad de esporas producidas varió de 2.06 a 2.49 $\times$ 10<sup>6</sup> esporas mL<sup>-1</sup>. La tasa de germinación de las esporas de Pf-Rg (22.9 % h<sup>-1</sup>) fue más alta ( $p \leq 0.05$ ) que la de la cepa Pae-sin (Cuadro 1). Cabe mencionar que en todos los aislamientos se alcanzó 100 % de germinación de esporas, 10 h después de su siembra en medio SDA

Skrobek (2001) reporta crecimientos de 3.6 mm d<sup>-1</sup> en dos aislamientos de *P. fumosoroseus* sembrados en medio SDA. La tasa alta de crecimiento diametral de la colonia en ese experimento pudo deberse a que la incubación se efectuó en oscuridad total, mientras que en el presente experimento las colonias se expusieron a luz y oscuridad. En algunos hongos la luz puede inducir degradación o inhibir la síntesis de compuestos esenciales para el crecimiento, como la riboflavina y el ergosterol (Yusef y Allam, 1967; Seviour y Codner, 1973; Trigos y Ortega-Regules, 2002). Respecto a la esporulación, es difícil comparar los resultados obtenidos aquí con los observados por otros autores debido a la influencia de la metodología de extracción de las esporas en la concentración conidial de las suspensiones. En la presente investigación se requirieron 10 h para lograr la germinación de todas las esporas, en tanto que en otros estudios se necesitó 24 h para obtener el mismo resultado (Vidal *et al.*, 1997).

Spore production was not different ( $p > 0.05$ ) between native and the reference isolates (Table 1); the number of spores produced ranged from 2.06 to 2.49 $\times$ 10<sup>6</sup> spores mL<sup>-1</sup>. The germination rate of Pf-Rg spores (22.9 % h<sup>-1</sup>) was higher ( $p \leq 0.05$ ) than that of the strain Pae-sin (Table 1). It is noteworthy that in all isolates a 100% germination of spores was reached 10 h after planting in SDA medium.

Skrobek (2001) reports growth of 3.6 mm d<sup>-1</sup> in two isolates of *P. fumosoroseus* planted in a SDA medium. The high rate of diameter growth of the colony in that experiment might have occurred because incubation was performed in total darkness, while in our experiment the colonies were exposed to light and dark. In some fungi light can induce degradation or inhibit the synthesis of compounds essential for growth, such as riboflavin and ergosterol (Yusef and Allam, 1967; Seviour and Codner, 1973; Trigos and Ortega-Regules, 2002). Regarding sporulation, it is difficult to compare the results obtained here with those observed by other authors due to the influence that the methodology for the extraction of spores has on the conidial concentration of suspensions. In our research, 100 % germination of spores was observed 10 h after inoculation, while in other studies 24 h were needed to observe the same result (Vidal *et al.*, 1997).

### Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* in immature *B. tabaci*

#### Pathogenicity in eggs

*P. fumosoroseus* caused 29.8 to 45.5 % mortality in eggs of *B. tabaci* 7 d after application (daa). There

### Patogenicidad de *Paecilomyces fumosoroseus* en inmaduros de *B. tabaci*

#### Patogenicidad en huevos

*P. fumosoroseus* causó 29.8 a 45.5 % de mortalidad en huevos de *B. tabaci* 7 d después de la aplicación (dda). No hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la mortalidad de huevos por efecto de las cepas nativas y de referencia (Cuadro 2), mientras que el testigo mostró 9.8 % de mortalidad. En general, en este experimento los valores de mortalidad en huevos fueron dos veces más altos que los reportados por Lacey *et al.* (1999) para *P. fumosoroseus*. Es conveniente mencionar que otras especies de hongos entomopatógenos como *Verticillium lecanii* (a concentraciones de  $1 \times 10^7$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ) han ocasionado sólo 14 a 26 % de mortalidad sobre huevos de *B. tabaci* (Gindin *et al.*, 2000), valor bajo con respecto a lo observado en el presente estudio. En contraste, Skrobek (2001) reportó que *Metarhizium anisopliae* causó 33 a 45 % de mortalidad 6 dda en *B. tabaci*. Según estos antecedentes, todos los aislamientos nativos evaluados en el presente trabajo, excepto Pf-Rg, presentan buen potencial ovicida sobre *B. tabaci*.

#### Patogenicidad en ninfas

Los porcentajes de mortalidad en ninfas por efecto de la aplicación *P. fumosoroseus* fueron mayores que los observados en huevos, registrándose más del 50 % de mortalidad en todos los aislamientos probados, sin diferencias significativas entre las cepas nativas y la de referencia (Cuadro 2). Sin embargo, hubo diferencias ( $p \leq 0.05$ ) respecto al testigo con 10.9 % de mortalidad. Estos resultados concuerdan con los reportados por Osborne *et al.* (1990) quienes encontraron 70 a 90 % de mortalidad en ninfas usando *P. fumosoroseus* ( $1.0 \times 10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ).

*P. fumosoroseus* también ha mostrado efectividad en estudios *in vitro* con otras especies de mosquitas blancas, como *Trialetrodes vaporariorum*. Al respecto, la aplicación de nueve aislamientos de *P. fumosoroseus* ( $1 \times 10^7$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ) ocasionó más de 70 % de mortalidad acumulada (Ayhan y Kubilay, 2005). La mortalidad de ninfas es 80 % al usar  $1.2 \times 10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  (Avery *et al.*, 2004), pero es mayor a 90 % al utilizar  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  (Sterk *et al.*, 1996; Veire *et al.*, 1996). Coincidentemente, la virulencia de

**Cuadro 2. Porcentaje de mortalidad acumulada (medias  $\pm$  error estándar) en estados inmaduros de *B. tabaci* por efecto de *P. fumosoroseus* ( $1 \times 10^7$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ).**

**Table 2. Percentage of cumulative mortality (mean  $\pm$  standard error) in immature stages of *B. tabaci* caused by *P. fumosoroseus* ( $1 \times 10^7$  spores  $\text{mL}^{-1}$ ).**

Aislamiento	Mortalidad en huevos (7 dda <sup>†</sup> )	Mortalidad en ninfas (12 dda)
Pae-sin	45.5 $\pm$ 4.1 a	74.5 $\pm$ 5.7 a
Pf-Tiz	44.3 $\pm$ 5.4 a	51.4 $\pm$ 4.4 a
Pf-Tim	43.1 $\pm$ 9.3 a	64.9 $\pm$ 8.5 a
Pf-Hal	34.8 $\pm$ 4.3 a	71.4 $\pm$ 1.3 a
Pf-Rg	29.8 $\pm$ 3.9 ab	57.2 $\pm$ 6.5 a
Testigo	9.8 $\pm$ 4.9 b	10.9 $\pm$ 4.5 b

Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )  $\diamond$  Means with different letter in a column are statistically different ( $p \leq 0.05$ ).

<sup>†</sup> dda=días después de la aplicación  $\diamond$  days after the application.

were no significant differences ( $p > 0.05$ ) in egg mortality by the effect of native and the reference strains (Table 2), while the control recorded 9.8% mortality. In general, the egg mortality values here were two times higher than those reported by Lacey *et al.* (1999) for *P. fumosoroseus*. It is worth mentioning that other species of entomopathogenic fungi such as *Verticillium lecanii* (at concentrations of  $1 \times 10^7$  spores  $\text{mL}^{-1}$ ) have led only to 14 to 26 % mortality of eggs of *B. tabaci* (Gindin *et al.*, 2000), which is low compared to that observed in this study. In contrast, Skrobek (2001) reported that *Metarhizium anisopliae* caused 33–45 % mortality 6 dda in *B. tabaci*. Based on this background, all native isolates assessed in this work, except Pf-Rg, have good ovicidal potential on *B. tabaci*.

#### Pathogenicity in nymphs

Mortality rates in nymphs due to the application of *P. fumosoroseus* were higher than those found in eggs, with over 50 % mortality in all isolates tested, with no significant differences between the native strains and the reference (Table 2). However, there were differences ( $p \leq 0.05$ ) regarding the control with 10.9 % mortality. These results are consistent with those reported by Osborne *et al.* (1990) who found 70–90 % mortality in nymphs using *P. fumosoroseus* ( $1.0 \times 10^6$  spores  $\text{mL}^{-1}$ ).

los aislamientos nativos de *P. fumosoroseus* evaluados en el presente estudio son considerados similares a los reportados anteriormente en ninfas de mosquitas blancas.

Se considera que la capacidad patogénica está directamente asociada con la velocidad de crecimiento y germinación de los hongos entomopatógenos (Heale *et al.*, 1989; Estrada-Valencia *et al.*, 1997), por lo que se esperaba que tanto la cepa de referencia Pae-sin como la nativa Pf-Rg fueran las más virulentas en inmaduros de *B. tabaci*, lo cual no ocurrió. Lo anterior indica que existen otros factores críticos que determinan en gran medida la virulencia de los hongos, como la producción de enzimas que degradan la cutícula y permiten la penetración rápida del hongo al cuerpo de los insectos (Jiang *et al.*, 2003), o la producción de metabolitos secundarios que suprimen la reacción del sistema inmune (Vey *et al.*, 1982).

La menor actividad de los hongos en huevos respecto a la observada en ninfas pudo deberse a la poca cantidad de conidios que entra en contacto con los huevos debido a su forma y tamaño. Además, los huevos presentan partículas cerosas provenientes de los adultos que limitan el contacto directo entre los conidios y el corion del huevo. También es posible que estos lípidos inhiban la germinación de las esporas de los hongos entomopatógenos debido a la reducción de la cantidad de humedad sobre la superficie del corion, como lo reportan James *et al.* (2003).

#### Área bajo la curva de la mortalidad acumulada (ABCMA) y tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>)

Para obtener otras variables que permitieran conocer la capacidad patogénica de los hongos evaluados, se determinó para ninfas el área bajo la curva de la mortalidad acumulada (ABCMA) a los 7 dda de los hongos y el tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>). Al respecto, no hubo diferencias significativas (Cuadro 3) en el ABCMA entre los aislamientos nativos y el de referencia. El TL<sub>50</sub> varió de 3 a 7.5 d (Cuadro 3) y hubo diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) con base en el traslape de los intervalos de confianza. El valor calculado para Pf-Hal no fue significativamente diferente del de la cepa de referencia Pae-sin, pero sí respecto al de Pf-Tiz y Pf-Rg. Según Balogun y Fagade (2004), los valores de TL<sub>50</sub> están directamente relacionados con la capacidad patogénica de los hongos. En el presente estudio el aislamiento nativo más patogénico en

*P. fumosoroseus* has also shown effectiveness in *in vitro* studies of other species of whiteflies, like *Trialeurodes vaporariorum*. In this regard, the implementation of nine isolates of *P. fumosoroseus* ( $1 \times 10^7$  conidia mL<sup>-1</sup>) caused more than 70 % cumulative mortality (Ayhan and Kubilay, 2005). The mortality of nymphs is 80% when using  $1.2 \times 10^6$  spores mL<sup>-1</sup> (Avery *et al.*, 2004), but is greater than 90% when using  $1 \times 10^6$  conidia mL<sup>-1</sup> (Sterk *et al.*, 1996; Veire *et al.*, 1996). Coincidentally, the virulence of native isolates of *P. fumosoroseus* assessed in our study is considered similar to those reported earlier on whitefly nymphs.

It is considered that pathogenicity is directly associated with the growth and germination speed of entomopathogenic fungi (Heale *et al.*, 1989, Estrada-Valencia *et al.*, 1997); thus it was expected that both the reference strain Pae -sin and the native Pf-Rg were the most virulent on immature *B. tabaci*, which did not happen. This indicates that there are other critical factors that largely determine the virulence of fungi, such as the production of enzymes that degrade the cuticle and allow the rapid penetration of the fungi mentioned into the body of insects (Jiang *et al.*, 2003), or the production of secondary metabolites that suppress the immune system response (Vey *et al.*, 1982).

The lower activity of fungi in eggs with regard to that observed in nymphs could be due to the low number of conidia in contact with the eggs because of their shape and size. In addition, eggs have waxy particles coming from adults that limit direct contact between the conidia and the egg chorion. It is also possible that these lipids inhibit the germination of entomopathogenic fungi spores due to the reduction of the amount of moisture on the surface of the chorion, as reported by James *et al.* (2003).

#### Area under the curve of cumulative mortality (ABCMA) and mean lethal time (LT<sub>50</sub>)

To obtain other variables providing insight into the pathogenicity of the fungi tested, for nymphs it was determined the area under the curve of cumulative mortality (ABCMA) 7 daa of fungi and mean lethal time (LT<sub>50</sub>). In this regard, there were no significant differences (Table 3) in the ABCMA between native isolates and the reference. The LT<sub>50</sub> ranged between 3 and 7.5 d (Table 3) and significant



**Cuadro 3. Área bajo la curva de la mortalidad acumulada (ABCMA) y tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) en ninfas de primer instar de *B. tabaci*.****Table 3. Area under the curve of cumulative mortality (ABCMA) and mean lethal time (LT<sub>50</sub>) in first instar nymphs of *B. tabaci*.**

Aislamiento	N <sup>†</sup>	ABCMA ± EEM <sup>‡</sup>	TL <sub>50</sub> ± (IC; días) <sup>§</sup>	Pendiente	Pr>F <sup>Ⓟ</sup>
Pae-sin	5	311.93±34.76 a	3.2 (2.9-3.4) c	2.7	< 0.001
Pf-Hal	5	301.43±10.30 a	3.7 (3.2-4.2) c	1.9	< 0.001
Pf-Tim	5	271.34±0.000 a	5.0 (4.5-5.8) ab	1.9	< 0.001
Pf-Tiz	5	210.34±13.67 a	6.3 (5.5-7.6) a	1.7	< 0.001
Pf-Rg	5	196.13±21.29 a	7.4 (6.1-9.8) a	1.5	< 0.001

Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) ♦ Means with different letter in a column are statistically different ( $p \leq 0.05$ ).

<sup>†</sup>N: número de repeticiones; <sup>‡</sup>EEM: error estándar de la media; <sup>§</sup>TL<sub>50</sub> ± (IC): tiempo letal medio ± el intervalo de confianza; <sup>Ⓟ</sup>Pr>F: ajuste del modelo de análisis probit para el cálculo de TL<sub>50</sub> ♦ <sup>†</sup>N: number of repetitions; <sup>‡</sup>EEM: standard error of the mean; <sup>§</sup>TL<sub>50</sub> ± (IC): mean lethal time ± the confidence interval; <sup>Ⓟ</sup>Pr> F: adjustment of the probit analysis model for calculating TL<sub>50</sub>

ninfas, según la evaluación del porcentaje de mortalidad a los 12 dda, fue Pf-Hal que también sobresalió en el ABCMA y se destacó por su menor TL<sub>50</sub>. Respecto a la relación tiempo-mortalidad, Gindin *et al.* (2000) indican valores de TL<sub>50</sub> de 3 a 3.8 d para algunas cepas de *P. fumosoroseus* en ninfas de *B. tabaci*, muy similares a los obtenidos con el aislamiento nativo Pf-Hal. En otras especies de mosquitas blancas, *P. fumosoroseus* presenta un valor promedio de TL<sub>50</sub> de 3 d cuando se aplica a concentraciones de esporas similares a las probadas en el presente estudio (Pozo y Rodríguez, 2003). Esto indica que la cepa nativa Pf-Hal podría considerarse por sus características patogénicas, un componente importante en programas de control microbiológico de *B. tabaci*.

## CONCLUSIONES

La tasa de crecimiento diario fue mayor en el aislamiento comercial Pae-sin con respecto a los nativos Pf-Hal y Pf-Rg. La esporulación fue similar en los aislamientos nativos y Pae-sin, en tanto que la germinación de esporas fue significativamente mayor en el aislamiento Pf-Rg. *P. fumosoroseus* fue más patogénico en ninfas que en huevos de *B. tabaci*. En ninfas, el efecto del aislamiento Pf-Hal sobresalió del resto de los nativos, con base en el tiempo letal medio. No se observó una relación clara entre la capacidad de desarrollo *in vitro* de los aislamientos y su patogenicidad en estados inmaduros de *B. tabaci*. Con base en los valores de TL<sub>50</sub>, el aislamiento nativo Pf-Hal es promisorio para el control biológico de estados inmaduros de *B. tabaci*.

differences ( $p \leq 0.05$ ) were recorded based on the overlap of confidence intervals. The calculated value for Pf-Hal was not significantly different from that of the reference strain Pae-sin, but was so in relation to Pf-Tiz and Pf-Rg. According to Balogun and Fagade (2004), LT<sub>50</sub> values are directly related to the pathogenicity of fungi. We observed that the most pathogenic native isolate in nymphs, according to the assessment of mortality rate at 12 daa, was Pf-Hal which also showed high value of ABCMA and was also notable for its lower LT<sub>50</sub>. Regarding the time-mortality relationship, Gindin *et al.* (2000) indicate LT<sub>50</sub> values of 3 to 3.8 d for some strains of *P. fumosoroseus* in *B. tabaci* nymphs, very similar to those obtained with the native isolate Pf-Hal. In other whitefly species, *P. fumosoroseus* exhibits an average value of LT<sub>50</sub> of 3 d when applied to spore concentrations similar to those tested in our study (Pozo and Rodriguez, 2003). This indicates that the native strain Pf-Hal may be considered for its pathogenic capacity an important component of microbiological control programs of *B. tabaci*.

## CONCLUSIONS

The daily growth rate was higher in the commercial isolate Pae-sin relative to that of the native strains Pf-Hal and Pf-Rg. Sporulation was similar for native isolates and Pae-sin, while the germination of spores was significantly higher in the Pf-Rg isolate. *P. fumosoroseus* was more pathogenic in nymphs than in eggs of *B. tabaci*. In nymphs, the effect of the isolate Pf-Hal was higher than that of the rest of the native

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración del Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Yucatán por el aislamiento de las cepas nativas de *P. fumosoroseus*. También se otorga especial agradecimiento a la Dra. Gabriela Heredia del Instituto de Ecología por la identificación de los hongos, así como a Basilio Uch, Francisco Couoh y Agatha Rosado, alumnos del Instituto Tecnológico de Conkal, por su apoyo en el desarrollo de los experimentos.

## LITERATURA CITADA

- Al-Deghairi, M. A. 2008. Bioassay evaluation of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* Vuillemin against eggs and nymphs of *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae). Pakistan J. Biol. Sci. 11 (12): 1551-1560.
- Avery, P. B., J. Faull, and M. S. Simmonds. 2004. Effect of different photoperiods on the growth, infectivity and colonization of Trinidadian strains of *Paecilomyces fumosoroseus* on the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, using a glass slide bioassay. J. Insect Sci. 4 (38): 1-10.
- Ayhan, G., and M. R. Kubilay. 2005. Pathogenicity of *Paecilomyces* spp. to the glasshouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, with some observations on the fungal infection process. Turk J. Agric. Forest. 29 (5): 331-339.
- Balogun, S. A., and O. E. Fagade. 2004. Entomopathogenic fungi in population of *Zonocerus variegates* (L) in Ibadan, Southwest, Nigeria. Afr. J. Biotechnol. 3 (8): 382-386.
- Barnett, H. L., and B. B. Hunter. 2003. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth ed. The American Phytopathological Society. USA. 218 p.
- Basso, C., F. Franco, G. Grille, y C. Pascal. 2001. Distribución espacial de *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) en plantas de tomate. Boletín de Sanidad Vegetal: Plagas. España 27 (4): 475-487.
- Berlanga-Padilla, A. M., y V. M. Hernández-Velázquez. 2002. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la virulencia de *Metarhizium anisopliae*, *M. anisopliae* var *acidum* y *Beauveria bassiana* en *Shistocerca gregaria* piceifrons. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 63 (1): 51-55.
- Campbell, C. L., and L. V. Madden. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley & Sons. New York. 560 p.
- Estrada-Valencia, M. N., P. E. Vélez-Arango, y E. C. Montoya-Restrepo. 1997. Caracterización de cultivos monoespóricos del hongo *Beauveria bassiana*. Cenicafe 48 (4): 217-224.
- Gindin, G., N. U. Geschtovt., B. Racciah, and I. Barash. 2000. Pathogenicity of *Verticillium lecanii* to different developmental stages of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. Phytoparasitica 28 (3): 1-11.
- GraphPad InStat. 2000. GraphPad Software. La Joya, California, USA. Software en CD.
- Gutiérrez O., M., C. Rodríguez M., C. Llanderal C., A. Terán V., A. Lagunes T. y O. Díaz G. 2007. Estabilidad de la resistencia a neonicotinoides en *Bemisia tabaci* (Gennadius), biotipo B de San Luis Potosí, México. Agrociencia 41 (8): 913-920.
- Heale, J. B., J. E. Isaac, and D. Chandler. 1989. Prospect for strain improvement in entomopathogenic fungi. Pestic. Sci. 26 (1): 79-92.
- Humber, R. 1998. Entomopathogenic fungal identification. American Phytopathological Society – Entomological Society of America Workshop, Joint Annual Meeting 1998. Las Vegas, Nevada, USA. pp: 26.
- James, R. R., J. S. Buckner, and T. P. Freeman. 2003. Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. J. Invertebr. Pathol. 84 (1): 67-74
- Jiang, S., R. F. James, and H. Gregg. 2003. Effects of virulence, sporulation, temperature on *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* laboratory transmission in *Coptotermes formosanus*. J. Invertebr. Pathol. 84 (1): 38-46.
- Lacey, L. A., A. A. Kirk, L. Millar, G. Mercadier, and C. Vidal. 1999. Ovicidal and larvicidal activity of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (*Deuteromycotina: Hyphomycetes*) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay system allowing prolonged survival of control insects. Biocontrol Sci. Technol. 9 (1): 9-18.
- Muñiz, M., and G. Nombela. 2001. Differential variation in development of the B- and Q- biotypes of *Bemisia tabaci* on sweet pepper *Capsicum annum* L. at constant temperatures. Environ. Entomol. 30 (4): 720-727.
- Ortega A., L. D. 2002. Moscas blancas en ornamentales. In: Bautista-Martínez, N., J. Alvarado-López, J. C. Chavarrín-Palacios, y H. Sánchez-Arroyo (eds). Manejo Fitosanitario de Ornamentales. Colegio de Postgraduados. México. pp: 41-54.
- Osborne, L. S., and Z. Landa. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. Florida Entomol. 75 (4): 456-471.
- Osborne, L. S., G. K. Storey, C. W. McCoy, and J. F. Walter. 1990. Potential for controlling the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, with the fungus, *Paecilomyces fumosoroseus*. In: Proc. and abstracts of the V Int. Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control. Adelaide, Australia. pp: 386-390.
- Pozo N., M., y A. Rodríguez D. 2003. Alternativa para el manejo de *Trialeurodes vaporariorum* Westwood en tomate orgánico en Uruguay. Boletín de Sanidad Vegetal: Plagas. España 29 (2): 211- 218.
- SAS Institute. 2000. The SAS System for Windows 8e. Cary, NC. USA. Software en CD.

—End of the English version—

---\*---

- Seviour, R. J., and R. C. Codner. 1973. Effect of light on carotenoid and riboflavin production by the fungus *Cephalosporium diospyri*. *J. Gen. Microbiol.* 77: 403-415.
- Skrobek, A. 2001. Investigations on the effect of entomopathogenic fungi on whiteflies. Dissertation, Institut für Pflanzenkrankheiten der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Doktorwürde der Agrarwissenschaften. 114 pp. <<[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online/landw\\_fak/2001/skrobek\\_anke/text.pdf](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online/landw_fak/2001/skrobek_anke/text.pdf)>>. (consultado noviembre 2008).
- Sterk, G., K. Bolckmans, and J. Eval. 1996. A new microbial insecticide *Paecilomyces fumosoroseus* strain Apopka 97, for the control of the greenhouse whitefly. Brighton Crop Protection Conference: Pest and Disease. Brighton, UK 2: 461-466.
- Trigos, A., and A. Ortega-Regules A. Selective destruction of microscopic fungi through photo-oxidation of ergosterol. *Mycologia* 94 (4): 563-568.
- Veire, M., D. Van, D. Degheele, and C. Lenteren. 1996. Toxicity of the fungal *Paecilomyces fumosoroseus* strain Apopka 97 to the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* and the parasitoid *Encarsia formosa*, and first results of a control experiments in glasshouse tomatoes. *Bull. Int. Organization Biol. Integrated Control—West Palaearctic Regional Section* 19 (1): 191-194.
- Vey, A., J. Fargues, and P. Robert. 1982. Histological and ultrastructural studies of factors determining the specificity of pathotypes of the fungus *Metarhizium anisopliae* for the scabeid larvae. *Entomophaga* 27 (4):387-397.
- Vidal, C., J. Fargues, and L. A. Lacey. 1997. Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: effect of temperature on vegetative growth. *J. Invert. Pathol.* 70 (1):18-26.
- Yusef, H. M., and M. E. Allam. 1967. The effect of light on growth and sporulation of certain fungi. *Mycopathologia* 33 (2): 81-89.