

MORTALIDAD DE NINFAS DE TRIALEURODES VAPORARIORUM (WESTWOOD) (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE) CON BEAUVERIA BASSIANA (BALSAMO) VUILLEMIN, BAJO CONDICIONES IN VITRO E IN VIVO

MORTALITY OF NYMPHS OF TRIALEURODES VAPORARIORUM (WESTWOOD) (HEMIPTERA: ALEYRODIDAE) WITH BEAUVERIA BASSIANA (BALSAMO) VUILLEMIN, UNDER IN VITRO CONDITIONS AND IN VIVO

Rojas, M. N.¹, Bonillo, M.¹, Alvarez, S.¹

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar la patogenicidad de dos cepas nativas de *Beauveria bassiana* (Bb007 y Bb008) sobre ninfas de cuarto estadio (NIV) de *Trialeurodes vaporariorum* en hojas desprendidas y plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). La cría del insecto se realizó sobre plantas de tomate dentro de jaulas en invernáculo. En laboratorio se determinó el tiempo letal medio (TL_{50%}), el tiempo medio de sobrevivencia (TMS) utilizando hojas infestadas expuestas sesenta segundos a suspensiones de 10⁸conidios/ml, y se evaluó la mortalidad hasta el día siete. En invernadero las plantas infestadas con NIV se pulverizaron hasta goteo con suspensiones de 10⁸conidios/ml⁻¹ de ambas cepas, utilizando agua para el testigo; tres tratamientos, con tres repeticiones de cinco plantas cada una. A los diez días se registró la mortalidad de las ninfas. Los resultados se analizaron con el programa InfoStat (Tukey $\alpha=0,05$). El TL_{50%} y el TMS para las ninfas tratadas con Bb007 y Bb008 fue de 3,4 días y 3,7 días respectivamente. En los ensayo *in vivo*, previo al ANOVA se realizó una transformación de los datos binomiales ($\text{Arcoseno}\sqrt{m}$) y el porcentaje de mortalidad medio fue 98% para Bb007 y 95% para Bb008. Se concluye que ambas cepas resultaron efectivas en el control de *T. vaporariorum* bajo las condiciones analizadas.

Palabras claves: Control Biológico, Hongos entomopatógenos, Hortalizas.

SUMMARY

The objective was to evaluate the pathogenicity of two native strains of *Beauveria bassiana* (Bb007 and Bb008) fourth instar nymphs (NIV) of *Trialeurodes vaporariorum* in detached leaves and tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). Insect rearing was conducted on tomato plants in cages in the greenhouse. It was determined in the laboratory the median lethal time (LT_{50%}), the mean survival time (MST) using infested leaves exposed to suspensions of sixty seconds 10⁸spores/ml, evaluating mortality until day seven. In greenhouse plants infested with NIV were sprayed with suspensions 10⁸spores/ml⁻¹ of both strains, using water for the control; three treatments with three replications of

1. CEDAF (Centro de Estudio para el Desarrollo de la Agricultura Familiar). Facultad de Ciencias Agrarias, UNJu. Alberdi Nº 47 CP 4600 San Salvador de Jujuy.

five plants each. Registering on the tenth day mortality of nymphs. Results were analyzed with InfoStat (Tukey $\alpha = 0.05$). The $TL_{50\%}$ and TMS for Bb008 Bb007 was 3.4 days and 3.7 days respectively. In the in vivo testing, prior to transformation of ANOVA binomial data ($\text{Arcoseno}\sqrt{m}$) and the mean percent mortality was 98% Bb007 and 95% Bb008. We conclude that both strains were effective in the control of *T. vaporariorum* under the conditions analyzed.

Keywords: Biological Control, Entomopathogenic Fungi, Hortalizas.

INTRODUCCIÓN

Existen cerca de 1200 especies de moscas blancas (Hemiptera: Aleyrodidae) descritas al presente, pero son pocas las que tienen importancia desde el punto de vista de la producción agrícola (Hilje, 1992). Las especies más comunes e importantes en términos económicos son *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y el complejo *Bemisia tabaci* (Gennadius) ambas presentes en la Argentina (Viscarret et al., 2000). Se trata de insectos polívoros, con alta tasa reproductiva y gran capacidad dispersiva (López Ávila, 2008).

T. vaporariorum llamada mosca de los invernaderos, es una de las más importantes a nivel mundial con amplia distribución geográfica en zonas tropicales, subtropicales y templadas del mundo, asociada a una gran variedad de hospederos cultivados y silvestres (Polack, 2005). Tanto los adultos como las ninfas se alimentan de la planta provocando un daño directo que reduce los rendimientos del cultivo. La producción de secreciones azucaradas afecta indirectamente la producción ya que al favorecer el desarrollo de hongos saprófitos se interfiere en los procesos de fotosíntesis y evapotranspiración, por otra parte suelen ser vectores de importantes virosis (Polak, 2005).

La producción hortícola de Jujuy se ve afectada por la acción de ambas especies, principalmente en los valles templados y Yungas. Desde 1997 existen registros de aparición e incremento poblacional con el significativo impacto económico en distintos cultivos hortícolas (Leaño et al., 2005).

El uso indiscriminado de agroquímicos lejos de controlar la plaga se asocia a proble-

mas de incrementos de costos de producción, contaminación ambiental, eliminación de enemigos naturales, aparición de plagas secundarias e intoxicaciones de trabajadores rurales (Cardona et al., 2005; Bonillo, 2008).

El uso de enemigos naturales locales puede considerarse una estrategia alternativa de manejo en el marco de un control integrado. Los hongos entomopatógenos constituyen una de las principales opciones para la regulación de insectos plagas en el agroecosistema sin riesgos ambientales, nula toxicidad para animales o humanos y no dejan residuos en los alimentos (Pérez Consuegra, 2003; Abdo et al., 2008; García et al., 2008; Tapias & Dussán, 2000).

A nivel mundial los hongos entomopatógenos más estudiados y fáciles de multiplicar son especies de *Beauveria* y *Metarhizium anisopliae* (García et al., 2008; Alatorre Rosas, 2007). En la Argentina se han realizado aplicaciones de *B. bassiana* sobre *T. vaporariorum* en el contexto del manejo integrado como una de las prácticas de control de este aleiródido (Polak, 2005).

El objetivo del trabajo fue evaluar la mortalidad de ninfas del cuarto estadio de *T. vaporariorum* por las cepas locales Bb007 y Bb008 en plantas y hojas desprendidas de tomate bajo condiciones ambientales de invernáculo. Ambas cepas están conservadas en el laboratorio Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias (Universidad Nacional de Jujuy), con probada capacidad patogénica frente a otros insectos (Abdo et al., 2008; Tapia et al., 2005; Tapia & Álvarez, 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron adultos de *T. vaporariorum*

de un cultivo de tomate manejado convencionalmente en Aguas Calientes (El Carmen, Jujuy, los que fueron liberados en jaulas de cría (describir brevemente) con voile, conteniendo en su interior plantas de tomate de 30 días de postemergencia. Luego del periodo de postura de huevos, las plantas infestadas fueron transferidas a jaulas nuevas para iniciar la cría a partir de una población homogénea. Las jaulas se mantuvieron en el invernáculo de la Facultad de Ciencias Agrarias, a una temperatura máxima de 23,5 °C, 8,13 °C media de mínima de y fotoperiodo natural.

Se utilizaron dos cepas locales de *B. bassiana*: *Bb 007* aislada de larvas de una especie de lepidóptero recolectada en Yuto (Ledesma, Jujuy) y *Bb 008* aislada de mosca blanca de Palma Sola (Santa Bárbara, Jujuy). Las cepas se multiplicaron en arroz para incrementar la cantidad de inóculo para los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

En el laboratorio de Fitopatología se realizaron los ensayos *in vitro* para la determinación del $TL_{50\%}$, TMS de N IV sobre hojas de tomate.

Determinación de $TL_{50\%}$ y TMS

Para la determinación del $TL_{50\%}$ y TMS, se tomaron hojas de tomate infestadas con ninfas IV provenientes de la cría de *T. vaporariorum*. En el interior de la cámara de flujo laminar, las hojas fueron sumergidas durante sesenta segundos en una suspensión de 10^8 conidios/ml, este procedimiento se realizó con las cepas *Bb007* y *Bb008*, utilizándose agua destilada para el testigo. Luego las hojas se colocaron sobre papel secante, para eliminar el exceso de agua, y se transfirieron a cajas de Petri con Agar agua 2% e incubadas a 24 °C y una fotofase de doce horas durante siete días.

La mortalidad fue observada diariamente para determinar el tiempo en el que muere el 50% de la población de ninfas N IV ($TL_{50\%}$), por la acción de los tratamientos. Los datos se registraron en una tabla de frecuencias, donde se expresó la mortandad acumulada durante 7 días. Para la determinación del $TL_{50\%}$ se utilizó una interpolación lineal de la mortalidad diaria

acumulada.

Se determinó el tiempo medio de sobrevivencia (TMS) para la población expuesta a cada cepa, aplicándose la siguiente fórmula (Lomer & Lomer, 2002):

Donde n_t es el número de individuos que muere en un día t , del total de la población N de insectos tratados, entre el día **uno** y el último día del ensayo.

Se realizó el análisis de curvas de Kaplan-Meier, el cual permite estudiar la sobrevivencia de entidades en función de una variable independiente dicotómica (viva o muerta), mediante el programa Infostat.

Bioensayos sobre plantas de tomate en invernadero.

Esta etapa se desarrolló en el invernadero de la Facultad de Ciencias Agrarias. Se utilizaron tres jaulas de cría, estableciendo una jaula por tratamiento. Se siguió un diseño completamente aleatorizado de cinco repeticiones/plantas y 30 unidades de observación/ninfas IV por repetición.

Las plantas infestadas con ninfas IV, fueron pulverizadas hasta goteo con una suspensión de 1×10^8 conidios/ml de cada cepa, utilizándose solo agua destilada para el testigo. En esta fase se usó un pulverizador de previa presión de 1.5 litros, modelo H-1,5.

Las plantas permanecieron en el interior de las jaulas en el invernadero a una media de temperatura máxima de 23,5 °C y media de mínima de 8,13 °C y un fotoperiodo natural.

La evaluación se realizó a los 10 días en función a la mortandad confirmada de ninfas en cada tratamiento (manifestación del signo de la enfermedad). Los datos se analizaron estadísticamente con el programa InfoStat (Versión 2008). Para el análisis de la varianza se aplicó a los datos binomiales la transformación $\text{Arcoseno}\sqrt{m}$, siendo m la proporción de las ninfas muertas.

RESULTADOS

Determinación de $TL_{50\%}$ y TMS

En las tablas 1 y 2 se observan los registros de mortalidad diaria acumulada de ninfas IV de *T. vaporariorum* expuestas a *Bb007* y *Bb008*

respectivamente, desde el tercer día al séptimo día posterior a la aplicación. A los siete días del tratamiento, las ninfas IV expuestas a Bb007 presentaron una frecuencia relativa acumulada (FRA) del 96,7%, mientras que las expuestas a Bb008 presentaron una (FRA) de 98,9%. No se observó mortalidad en el testigo por *B. bassiana*.

En la figura 1 se han representado las frecuencias relativas acumuladas para ambas cepas y el $TL_{50\%}$. Las dos cepas presentaron un efecto similar sobre las ninfas IV.

Mediante la interpolación lineal de la mortalidad diaria acumulada, el $TL_{50\%}$ para N IV fue de 3,44 días para ambas cepas.

El TMS de las ninfas IV expuestas a Bb007 fue de 3,78 días (CV 13,2) y de 3,73 días para las ninfas IV expuestas a Bb008 (CV 28,5), no existiendo diferencias significativas entre los tratamientos, como se observa en las tablas 3 y 4.

Bioensayos in vivo, sobre plantas de tomate en invernadero.

En el ANOVA (Tabla 5) se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al 5% entre los tratamientos. Se rechazó la hipótesis nula que sostiene la igualdad en el efecto de los tratamientos aceptándose la hipótesis alternativa que establece diferencias entre los mismos. El test de Tukey (Tabla 6) reveló diferencias significativas entre las medias de la mortalidad entre el testigo y las dos cepas evaluadas, registrándose para Bb007 una media de mortandad del 98% y Bb008 del 95%, con un coeficiente de variación del 22,76%. En las figuras 2 y 3 se observan ninfas IV manifestando síntomas y signos de la enfermedad.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Las ninfas enfermas de *T. vaporariorum* sobre hojas desprendidas o sobre plantas en invernadero presentaron una coloración blanquecina algodonosa, con micelio; otras manifestaron diversas intensidades de rojo, similar a lo observado por Shannon (1996), características también registradas para las ninfas IV, de Bemisia

argentifoli, por Orozco Santos et al., (2000) y Quesada-Moraga et al. (2006) con porcentajes de mortalidad superiores al 70%. Ambas cepas resultaron patogénicas para las ninfas IV de *T. vaporariorum*, a la concentración de 10^8 conidios/ml⁻¹, en condiciones controladas de laboratorio e invernadero. El porcentaje de mortalidad del 99% revela la virulencia de las mismas, a la que se suma un $TL_{50\%}$ de 3,4 días y un TMS de 3,7 días. Santamaría et al. (1998) obtuvieron resultados similares de un 91,5% de mortalidad en condiciones in vivo, sobre otra especie de la familia de los Aleyrodidos (*Aleurothrixus floccosus*).

En función a los resultados obtenidos, las cepas de *B. bassiana* evaluadas representan una alternativa para el control de *T. vaporariorum* sobre plantas de tomate en invernadero, siendo esto un avance para el control del insecto en Jujuy ya que la producción de las cepas locales se obtienen en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Unju. El conocimiento generado necesita futuras investigaciones a campo para valorar el impacto en el agroecosistema y en las economías regionales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abdo, G.; Álvarez, S.; Bonillo, M.; Rolle, R. & Tapia, S. 2008. Producción Hortícola Sustentable. Buenos Aires, Argentina, Ediciones INTA 103 pp.
2. Alatorre-Rosas, R. 2007. Hongos entomopatógenos, pp. 127-143. En: L. A. Rodríguez del Bosque & H. C. Arredondo-Bernal (eds.), Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México, 303 pp.
3. Bonillo, M. 2008. Agrotóxicos y producción agrícola. El ojo de la tormenta. 46: 15-16.
4. García García, M. A.; Capello García, S.; Leshner Gordillo, J. M. & Molina Martínez, R. F. 2008. Hongos entomopatógenos como una alternativa en el control Biológico. Kuxulkab 27 (XV): 25-28. Disponible en: http://www.publicaciones.ujat.mx/publicaciones/kuxulkab/ediciones/27/04_Hongos%20Entomopat%C3%B3genos%20como%20una%20alternativa.pdf
5. Hilje, L. 1992. Plan de Acción Regional para el manejo de las moscas blancas en América

Central y el Caribe. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 27 p.

6. Leaño, M. C., Tapia, S. N., Agostini De Manero, E. B., & Alvarez, S. (2005). Relevamiento de moscas blancas (Hemiptera: Aleyrodidae) y sus biocontroladores en cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), pimiento (*Capsicum annum* L.) y berenjena (*Solanum melongera* L.) de Jujuy y Salta. In Congreso Argentino de Entomología 12-15 de Septiembre. San Miguel de Tucumán. AR.

7. Lomer, H. & Lomer, C. 2002. Pathologie d' insectes. Manual. Editorial Lubilosa, Francia: 244.

8. López Ávila, A. 2008. Biología y Control. Control Biológico de las Moscas Blancas. MIP. Corpoica. Disponible en:

<http://controlvivo.blogspot.com/2008/04/biologa-y-control-biologico-de-las.html>

9. Orozco-Santos, M.; Farias-Larios, J.; López-Pérez, J. & Ramírez-Vázquez, N. 2000. Uso de *Beauveria bassiana* para el control de *Bemisia argentifolli* en melón. CATIE. Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 56: 46-51.

10. Pérez Consuegra N. 2003. Agricultura Orgánica: bases para el manejo ecológico de plagas. CEDAR-ACTAF, Cuba. 50-62.

11. Polak, A. 2005. Manejo Integrado de Moscas Blancas. Boletín Hortícola. Protección Vegetal EEA San Pedro. INTA Año 10. N° 31.

12. Quesada-Moraga, E.; Maranhao, 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 virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. *Biological Control*. 36: 274-287.

13. Santamaría A.; Costa-Comeles, J.; Alonso, A.; Rodrigues, J. & Ferrer, J. 1998. Ensayo del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin para el control de la mosca blanca de los cítricos *Aleurothrixus floccosus* (Maskell) (Homoptera: Aleyrodidae) y su acción sobre el parásito *Cales noacki* (Howard) (Hymenoptera: Aphelinidae). *Boletín Sanidad. Vegetal, Plagas* 24: 695-706.

14. Shannon, P. 1996. Hongos Entomopa-

tógenos. Metodologías para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus 60-68. Ed. Luko Hilje. Catie. N°37. Turrialba. Costa Rica.

15. Tapia S.; Leaño, M; Agostini, E; & Álvarez, S.E. 2005. Relevamiento de moscas blancas (Hemiptera: Aleyrodidae) y sus biocontroladores en cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), pimiento (*Capsicum annum* L.) y berenjena (*Solanum melongera* L.) de Jujuy y Salta. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*. 64 (4): 450-451.

16. Tapia, S. & Alvarez, S. 2006. Patogenicidad de aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. y *Paecilomyces* spp. sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), en condiciones de laboratorio. Acta de Resúmenes de las XII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. FALTA Página.

17. Tapias, S. I. & Dussán, J. 2000. Evaluación del grado de seguridad del hongo *Beauveria bassiana* utilizando para el control biológico de insectos plaga. *Actualidades Biológicas* 22 (72): 17-27 p.

<http://web.catie.ac.cr/informacion/RMIP/rmip56/art5-b.htm#Resultados>

18. Viscarret, M. M., Botto, E. N., & Polaszek, A.N.D.R.E.W. (2000). Whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of economic importance and their natural enemies (Hymenoptera: Aphelinidae, Signiphoridae) in Argentina. *Revista Chilena de Entomología*, 26, 5-12.

TABLAS.

Tabla 1. Mortalidad diaria acumulada de ninfas IV de T. vaporariorum expuestas a Bb007.

Día	3	4	5	6	7
R1	9	17	20	22	27
R2	14	20	25	28	30
R3	11	15	24	25	29
R4	13	22	26	29	30
R5	14	19	21	23	28
R6	14	20	22	25	30
Media de FAA ¹	12,5	18,8	23	25,3	29
Media de FRA ²	41,7	62,8	76,7	84,4	96,7

¹ Frecuencia absoluta acumulada.

² Frecuencia relativa acumulada.

Tabla 2. Mortalidad diaria acumulada de ninfas IV de T. vaporariorum expuestas a Bb008.

Día	3	4	5	6	7
R1	15	17	27	29	30
R2	8	10	20	24	30
R3	18	22	25	27	30
R4	10	18	25	27	30
R5	16	21	23	26	30
R6	9	20	24	26	28
Media de FAA	12,7	18	24	26,5	29,6
Media de FRA	42,2	60	80	88,3	98,9

¹ Frecuencia absoluta acumulada.

² Frecuencia relativa acumulada.

Tabla 3: Análisis de Sobrevida de Kaplan-Meier para Bb 007 y Bb 00.

tratamiento Logrank Test - Chi Cuadrado=0,189 p=0,663814

tratamiento	Caso	Tiempo	Expuestos	Muertos	Sobrevida	Error	Estándar
Bb007	180	3	900	75	0,92	0,01	
Bb007	360	4	825	113	0,79	0,01	
Bb007	540	5	712	138	0,64	0,01	
Bb007	720	6	574	152	0,47	0,01	
Bb007	900	7	422	159	0,29	0,01	
Bb008	180	3	900	76	0,92	0,01	
Bb008	360	4	824	108	0,80	0,01	
Bb008	540	5	716	144	0,64	0,01	
Bb008	720	6	572	157	0,46	0,01	
Bb008	900	7	415	165	0,28	0,01	

Tabla 4: Estadística descriptiva del análisis de Sobrevida de Kaplan-Meier para Bb 007 y Bb 008.

tratamiento	dia	Variable	n	Media	D.E.	CV
Bb007	3	sobrevida	180	0,42	0,49	118,65
Bb007	4	sobrevida	180	0,63	0,48	77,22
Bb007	5	sobrevida	180	0,77	0,42	55,32
Bb007	6	sobrevida	180	0,84	0,36	43,04
Bb007	7	sobrevida	180	0,88	0,32	36,44
Bb008	3	sobrevida	180	0,42	0,50	117,31
Bb008	4	sobrevida	180	0,60	0,49	81,88
Bb008	5	sobrevida	180	0,80	0,40	50,14
Bb008	6	sobrevida	180	0,87	0,33	38,38
Bb008	7	sobrevida	180	0,92	0,28	30,24

Tabla 5. Análisis de la Varianza aplicando transformación de los datos binomiales ($\text{Arcoseno } \sqrt{m}$)**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,15	2	3,08	266,66	<0,0001
tratamiento	6,15	2	3,08	266,66	<0,0001
Error	0,14	12	0,01		
Total	6,29	14			

Tabla 6. Prueba de comparación de medias. Test de Tukey ($\alpha=0,05$).

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,18121

Error: 0,0115 gl: 12

tratamiento	Medias	n	E.E.	
testigo	0,00	5	0,05	A
Bb008	1,19	5	0,05	B
Bb007	1,48	5	0,05	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

FIGURAS.

Figura 1. Frecuencias Relativas acumuladas para Bb 007 y Bb 008 y TL_{50%}

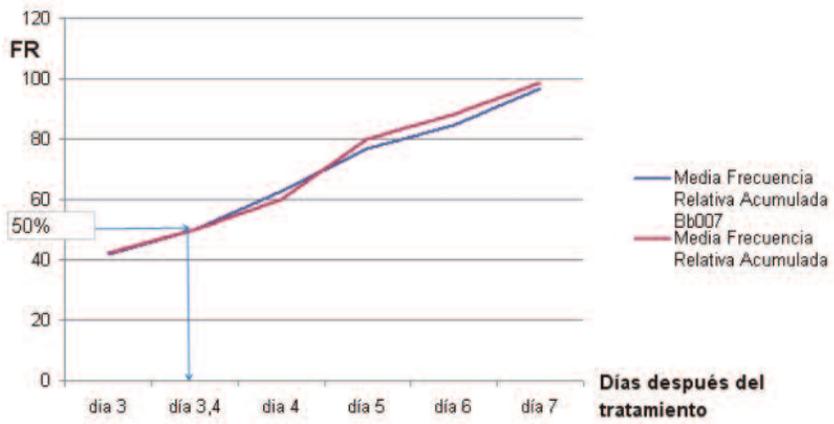


Figura 2. Dos ninfas IV de *T. vaporariorum* sobre hoja de tomate con síntomas de la enfermedad producida por *B. bassiana*. A la izquierda con síntomas avanzados y a la derecha con síntomas iniciales (aumento: 3X).



Figura 3. Tres ninfas IV de *T. vaporariorum* sobre hoja de tomate, con síntomas y signos de la enfermedad producida por *B. bassiana* (aumento: 3X).

