



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS

**EFECTO DEL INSECTICIDA HERALD  
(PIRETROIDE) SOBRE LA  
VIRULENCIA Y ACTIVIDAD  
ENZIMÁTICA DE *Verticillium lecanii* in  
vitro**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**M A E S T R A E N C I E N C I A S**

(BIOLOGÍA CELULAR)

P R E S E N T A :

**BIÓL. MARTHA BEATRIZ GARCÍA JUÁREZ**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. TERESA FRANCISCA MIER GONZÁLEZ



MÉXICO D.F.

NOVIEMBRE 2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Agradezco al CONACYT el apoyo recibido durante el periodo de septiembre de 1998 a agosto de 1999, a través de la beca num 130313.*

*También agradezco al Doctor Facundo Rivera Becerril por todas las observaciones hechas al presente trabajo*

*Dedico la presente tesis a:*

*Mis padres*

*José y Lupita*

*Por ser la fuente de amor inagotable  
en la que puedo restablecer toda mi  
entereza y porque ahora que soy madre  
comprendo lo titánico de su labor.*

*Mis hijos*

*Karl Mauricio y Sandra Karina*

*Porque son la razón de mi  
existencia*

*Concepción*

*Por su apoyo.*

*A la persona que más admiro  
por su profesionalismo, comprensión,  
inteligencia, dedicación y sobre todo  
por su gran generosidad.  
Gracias por todo Doctora Tere.*

## INDICE

|  |    |
|--|----|
| Resumen  | 1  |
| Abstract   | 3  |
| Introducción   | 5  |
| Plaguicidas químicos   | 5  |
| Toxicidad de los plaguicidas   | 6  |
| Insecticidas piretroides   | 6  |
| Modo de acción y metabolismo de los piretroides                      | 8  |
| Problemas planteados por el desarrollo de los plaguicidas químicos   | 8  |
| Movilidad y persistencia en el ambiente                              | 8  |
| Factores que influyen sobre la persistencia de los plaguicidas       | 8  |
| Desequilibrios ecológicos ocasionados por los plaguicidas            | 9  |
| Descomposición de los insecticidas químicos por microorganismos      | 10 |
| Efecto de los insecticidas en los humanos                            | 11 |
| Resistencia de los insectos a los plaguicidas químicos               | 11 |
| Control biológico  | 12 |
| Control microbiano   | 13 |
| Potencial de <i>Verticillium lecanii</i> para el control de plagas   | 14 |
| Patogenicidad y virulencia de <i>Verticillium lecanii</i>            | 15 |
| Plaguicidas químicos empleados junto con <i>Verticillium lecanii</i> | 17 |
| Sobretiros de los artículos científicos:                             | 18 |

García-Juárez, Martha, Conchita Toriello, Teresa Mier. 1999. Compatibilidad *in vitro* de *Verticillium lecanii* con un insecticida piretroide y su efecto sobre la patogenicidad del hongo en la mosquita blanca. *Revista Mexicana de Micología* **15**: 11-16.

García-Juárez, Martha, Conchita Toriello, Teresa Mier. 1999. Effect of the insecticide fenpropathrin on exoenzyme production in *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **41**: 215-216.

Discusión 27

Conclusiones 29

Anexo 30

Traducción de los objetivos, metodología y principales resultados del artículo:

García-Juárez, Martha, Conchita Toriello, Teresa Mier. 1999. Effect of the insecticide fenpropathrin on exoenzyme production in *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **41**: 215-216.

Bibliografía 32

## EFFECTO DEL INSECTICIDA HERALD (PIRETROIDE) SOBRE LA VIRULENCIA Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE *Verticillium lecanii* in vitro

### RESUMEN

Todos los cultivos agrícolas son atacados por plagas y las pérdidas resultantes van desde el 47% o 60% (Sankar, Dahiya y Singh, 2005) y hasta el 79% en campos experimentales (Alean *et al.*, 2004).

Los insecticidas químicos empleados para controlar las plagas han traído como consecuencia el surgimiento de problemas tales como la resistencia de plagas, así como la contaminación del ambiente y su acumulación en productos destinados para la alimentación humana (Faria y Wraight, 2001). Muchos de estos productos químicos son tóxicos para el hombre y los animales; desde el punto de vista ambiental, ocasionan disminución del potencial del control natural de la población de la plaga efectuado por depredadores, parasitoides y patógenos (Loureiro *et al.*, 2002).

Los aspectos más importantes del control químico de plagas incluyen el desarrollo de nuevos métodos que permitan evitar la resistencia de los insectos blanco, así como suprimir el surgimiento de plagas secundarias, resultado de la eliminación de especies benéficas afectadas por insecticidas de amplio espectro; reducir riesgos a los agricultores y consumidores debido al uso de compuestos químicos que son altamente tóxicos y/o de toxicidad crónica; evitar dañar especies no blanco como peces y otros organismos de vida silvestre en ambientes naturales y abatir la persistencia de estos compuestos químicos en el ambiente (Faria y Wraight, 2001; González-Zamora *et al.*, 2004; Jazzar y Hammad, 2004; Pimentel y Perkins, 1980; Stansly, Calvo y Urbaneja, 2004).

En México las plagas representan grandes pérdidas para los agricultores (Barranco-Flrido *et al.*, 2002) y la necesidad de reducir el uso de insecticidas químicos en su combate aumenta la posibilidad de usar el control biológico microbiano (Ahmadi, Askary y Ashouri, 2004). El éxito del hongo *Verticillium lecanii* como biorregulador de las poblaciones de plagas (Fave *et al.*, 2005; Yarkulov, 2002), se debe a que su cultivo permite obtener esporas que al germinar sobre el insecto plaga, ejercen una presión mecánica y ocasionan la infección dada por un proceso enzimático, degradan su cutícula y causan su muerte. *V. lecanii* tiene acción sobre pulgones, mosquitas blancas de invernaderos, áfidos y escamas (Barranco-Flrido *et al.*, 2002).

El control biológico de plagas con hongos entomopatógenos es una alternativa prometedora pero no para aplicarse como medida única, sino como parte de una estrategia de manejo integrado de plagas, introduciendo simultáneamente varios enemigos naturales de los insectos (Faria y Wraight, 2001). Por ello ha surgido un marcado interés por conocer el efecto perjudicial

de los plaguicidas químicos sobre los hongos entomopatógenos, principalmente aquellos con posibilidades de éxito en programas de manejo integrado de plagas (Ahmadzadeh y Hatami, 2003; Ghosh *et al.*, 2004; Javed y Matthews, 2002).

Dentro de este contexto, durante el desarrollo del presente trabajo se evaluó el efecto del insecticida Herald (piretroide) sobre la virulencia y actividad de algunas enzimas del hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii in vitro* con base en el ICDF (índice de crecimiento y desarrollo fúngico) y la prueba de API ZYM. Los resultados demostraron que al realizar una mezcla directa del insecticida y el hongo el número de unidades formadoras de colonias decreció en un 45.6% y la germinación disminuyó en un 43% en el ensayo simulando un tanque de aspersión; la virulencia presentó un retraso en el desarrollo y crecimiento del hongo sobre la ninfa en el bioensayo (menor ICDF que el testigo) y la actividad enzimática de quitinasas y proteasas de *V. lecanii* se vio reducida.



## EFFECT OF HERALD<sub>[IBM]</sub> (PYRETHROID) INSECTICIDE ON VIRULENCE AND ENZIMATIC ACTIVITY OF *Verticillium lecanii* *in vitro*.

### ABSTRACT

All crops are attacked by pests and losses amount to 47 and 60% (Sankar, Dahiya and Singh, 2005) reaching up to 79% in experimental crops (Alean *et al.*, 2004).

The chemical insecticides used to control the pests have brought about problems, such as resistance of the pests, as well as pollution to the environment and their accumulation in products meant for human consumption (Faria and Wraight, 2001). Many of these chemicals are toxic to humans and animals, and from an environmental point of view they diminish the potential of the natural control exerted by predators, parasites and pathogens (Loureiro *et al.*, 2002).

The most relevant aspects in pests control are summarized in the next points: it is necessary to develop new methods to compete against pests resistance to previous chemicals; to control secondary pests emerged as the result of beneficial species reduction due to the use of broad-spectrum insecticides; to reduce the risk to farmers and consumers caused by use of extremely toxic chemical compounds and/or chronic toxicity; to avoid damage to non-target species in natural environments, such as fishes and wild-life; and their persistence in the environment (Faria and Wraight, 2001; González-Zamora *et al.*, 2004; Jazzar and Hammad, 2004; Pimentel and Perkins, 1980; Stansly, Calvo and Urbaneja, 2004).

In Mexico, agricultural pests represent great losses for the farmers (Barranco-Florido *et al.*, 2002) and the need to reduce the use of insecticides in pests control has increased the possibility of using biological control (Ahmadi, Askary and Ashouri, 2004). The success of the fungus *Verticillium lecanii* as a bio regulator of pest populations (Fave *et al.*, 2005; Yarkulov, 2002), is based on the fact that its culture permits to obtain spores, which by germinating on the insect, produce infections and through a purely enzymatic process, degrade the insect's cuticle causing its death. *V. lecanii* acts on mites, whiteflies, aphids and scales (Barranco-Florido *et al.*, 2002).

The biological control of pests with entomopathogenic fungi is a promising alternative, not to be used as sole measure, but as part of an integrated pest management program, employing simultaneously several natural enemies (Faria and Wraight, 2001). Therefore, great interest has developed on knowing, the harmful effect of chemical pesticides on entomopathogenic fungi, mainly those with possibility of success in biological

control programs or integrated pest management (Ahmadzadeh and Hatami, 2003; Ghosh *et al.*, 2004; Javed and Matthews, 2002).

The aim of this research was to evaluate the effect of Herald (pyrethroid) on the virulence and production of enzymes of the entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii in vitro*. The present results demonstrate that the use of a direct mixture of the insecticide and the fungus affects the viability and virulence of *V. lecanii*.

## INTRODUCCIÓN

Después de los años 40, con la introducción al mercado de los plaguicidas sintéticos, decayó el interés por el uso de otros métodos de control. Con el paso del tiempo el uso desmedido de insecticidas químicos ha ocasionado graves problemas como son la acumulación de residuos tóxicos en mantos freáticos, la aparición de variedades resistentes de insectos y el desarrollo de plagas secundarias; repercusiones en la salud del hombre y la fauna silvestre y doméstica; desequilibrios en el funcionamiento de las redes tróficas, producción de generaciones de plaguicidas cada vez más agresivos y uso de dosis más elevadas dando con ello como resultado el abatimiento de la biodiversidad y el equilibrio de los agrosistemas (Mier *et al.*, 2004).

Los plaguicidas son sustancias perjudiciales que sólo deben ser usados cuando sea necesario, aplicándolos en las dosis adecuadas y como complemento junto con otras estrategias de control y no como medida única. A este respecto, en las últimas décadas ha surgido el interés por los hongos entomopatógenos como valiosos recursos naturales para ser usados como herramientas en el manejo integrado de plagas (Mier *et al.*, 2004). Dentro de esta temática se desarrolló el siguiente sustento teórico.

## PLAGUICIDAS QUÍMICOS

Plaguicida, en un sentido amplio, es cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destinan para controlar cualquier plaga, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal [Comisión Intersecretarial para el Control y Uso de Plaguicidas Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST), 1994].

Para un uso práctico de la definición determinaremos que los plaguicidas son sustancias que sirven para combatir a los parásitos de los cultivos, ganado, animales domésticos y del hombre (Yúfera y Carrasco, 1980).

Los plaguicidas se clasifican según la CICOPLAFEST (1994) con base en distintos criterios incluyendo:

- 1) Concentración del ingrediente activo y composición química que ejerce la acción plaguicida.
  - a) Plaguicida técnico: máxima concentración de fabricación para preparar de éste la fórmula a aplicar.
  - b) Plaguicida formulado: mezcla de uno o más plaguicidas técnicos con uno o más ingredientes como “inertes”, cuya finalidad es dar estabilidad al ingrediente activo, constituye la forma usual de aplicación de los plaguicidas.
- 2) Organismos que controlan: insecticidas, acaricidas, fungicidas, bactericidas, antibióticos, herbicidas, nematocidas, rodenticidas, molusquicidas, atrayentes y esterilizantes de insectos.
- 3) Modo de acción, el ingrediente activo puede ser:

- a) De contacto: actúan principalmente al ser absorbidos por los tejidos externos de la plaga, como la nicotina que penetra la cutícula.
  - b) De ingestión: actúan dentro del estómago del insecto, por ejemplo el arseniato de plomo que es tóxico cuando se ingiere.
  - c) Sistémico: al aplicarse en plantas o animales se absorbe y traslada por su sistema vascular a puntos remotos del lugar donde se aplica y en los cuales actúa.
  - d) Fumigante: se difunde en estado gaseoso o de vapor y penetra por todas las vías de absorción, como el ácido cianhídrico, que entra como gas a través de los espiráculos.
  - e) Repelente: impide que las plagas ataquen.
  - f) Defoliante: ataca la maleza de los cultivos.
- 4) Composición química:
- a) Compuestos inorgánicos: son compuestos que carecen de carbono, como los derivados de cobre, azufre, zinc y aluminio.
  - b) Compuestos orgánicos: son aquellos que contienen átomos de carbono en su estructura química. La mayoría son de origen sintético, fabricados a partir de compuestos químicos básicos; algunos son extraídos de plantas por lo que se conocen como botánicos.
  - c) Plaguicidas biológicos: se llama así a los virus, microorganismos o derivados de su metabolismo, formulados como insumos que pueden controlar una plaga en particular.
- 5) Persistencia: conforme al tiempo que transcurre entre su aplicación y la degradación ambiental del compuesto, los plaguicidas se clasifican en: ligeramente persistentes, menos de cuatro semanas, poco persistentes, de cuatro a 26 semanas, medianamente persistentes, de 27 a 52 semanas, altamente persistentes, más de un año y menos de 20 años, persistentes, más de 20 años.

## TOXICIDAD DE LOS PLAGUICIDAS

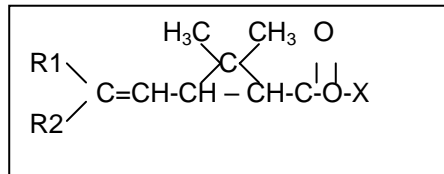
La toxicidad se establece mediante experimentación en modelos animales, donde los más utilizados son ratas y ratones. La expresión cuantitativa de la toxicidad es representada mediante la dosis letal media ( $DL_{50}$ ), que corresponde a la cantidad de plaguicida necesario para causar la muerte del 50% de los individuos que constituyen el lote del ensayo (Ortiz, 1999).

Las toxicidades  $DL_{50}$  pueden hacer referencia a la toxicidad oral aguda (administración del insecticida en la dieta), crónica (partes por millón del tóxico presente en la dieta alimenticia por varios días en que se observan los efectos) o dérmica (se establece mediante la absorción del tóxico por pincelación sobre la piel) (Ortiz, 1999).

## INSECTICIDAS PIRETROIDES

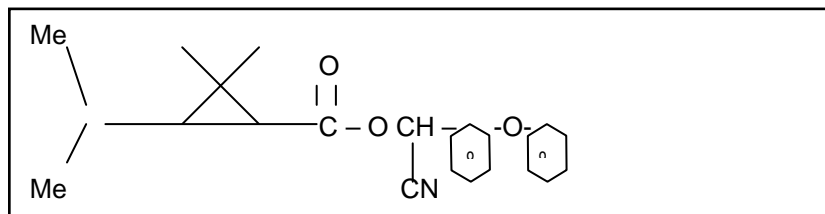
El pelitre ha sido uno de los derivados vegetales más empleados como insecticidas, especialmente en aplicaciones domésticas, pero su utilización en la agricultura ha sido más bien escasa por carecer de la estabilidad requerida (Barberá, 1989).

Las plantas productoras de pelitre pertenecen a la familia de las compuestas e incluyen la especie *Chrysanthemum (Pyrethrum) cinerascifolium*. El extracto de pelitre, se obtiene empleando como disolventes éter de petróleo, dicloroetileno y otros. El valor reside en su contenido de piretrinas, cuya fórmula general es:



R1 y R2 representan radicales orgánicos u otros; x corresponde a un grupo alcohol. Químicamente el ácido crisantémico es metil-propenil-dimetil-ciclopropanocarboxílico, y el pirétrico es carbometoxi-propenil-dimetil-ciclopropanocarboxílico (Barberá, 1989).

En los últimos 15 años las investigaciones realizadas con respecto a las piretrinas (estructura, relaciones entre estructura, actividad y fotólisis) han conducido al desarrollo de una serie de nuevos productos denominados piretroides y que han alcanzado un gran auge. Asimismo se logró estabilizar en parte a los piretroides y se han desarrollado dos nuevos productos (Barberá, 1989): aquellos que conservan el anillo de dimetil-ciclopropano presente en las piretrinas naturales y los que carecen de dicho anillo originando otras estructuras. En ambos el grupo X de las piretrinas ha quedado sustituido por el fenoxilbencílico (insecticida Herald) que es un piretroide con radical alcohol diferente y con ciclopropanocarboxílico, soluble en agua, cuya estructura es la siguiente:



El fenpropatrin tiene como ingrediente activo (RS)-alfa-ciano-3 fenoxibencilcicloprocarboxilato, equivalente a 375 g de ia l<sup>-1</sup>

De acuerdo con la CICOPAFEST (1994), el fenpropatrin es un plaguicida de uso pecuario, doméstico, jardinería y urbano. Formulado contra insectos tales como homópteros y áfidos, es un insecticida de contacto con un modo de acción sistémico, que al aplicarse en aerosol sobre el insecto llega al

sistema nervioso. Por su composición química es clasificado como orgánico y con una persistencia de menos de cuatro semanas, o sea ligeramente persistente. Por su efecto hacia el hombre se considera ligeramente tóxico. No se puede mezclar con productos de reacción alcalina fuerte.

## MODO DE ACCIÓN Y METABOLISMO DE LOS PIRETROIDES

Tanto las piretrinas como los piretroides sintéticos actúan de modo similar sobre el sistema nervioso central, produciendo hiperexcitación y parálisis con pérdida de coordinación, convulsiones, postración y muerte. El metabolismo de todos estos productos parece ser similar, eliminándose rápidamente después de ser ingerido por los animales, sin ser persistentes ni acumularse en el organismo. El camino general de su degradación es la escisión del grupo éster formándose el ácido y el alcohol correspondientes; la parte ácida puede transformarse en lactona o derivados hidroxilados o conjugados, en tanto que el alcohol puede pasar a aldehído, ácido y conjugados. La misma degradación es aplicable a los piretroides en el suelo, donde también sufren hidrólisis escindiéndose el éster en dos partes, ácida y alcohol donde participa la acción microbiana (Barberá, 1989).

## PROBLEMAS PLANTEADOS POR EL DESARROLLO DE LOS PLAGUICIDAS QUÍMICOS. MOVILIDAD Y PERSISTENCIA EN EL AMBIENTE

El uso de los plaguicidas en la producción agrícola y en especial en los tratamientos del suelo, tiene gran importancia por la interacción plaguicida-suelo-agua, y por el potencial de impacto adverso de estas sustancias en el ambiente ya que, especialmente en lo que concierne a la aplicación aérea, un porcentaje considerable del producto llega al suelo o a los cuerpos de agua. Lo mismo puede ocurrir con el lavado ocasionado por las lluvias, o bien como consecuencia del arrastre provocado por el viento, sobre todo en los tratamientos realizados en el follaje. La persistencia de un plaguicida en el ambiente se refiere a la duración de éste, sin cambio molecular, a partir del momento de su aplicación. Esta característica, aunada a su movilidad, aumenta el riesgo de los productos químicos contra el ambiente y la salud de los organismos (Ortega-Ceseña *et al.*, 1994).

## FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA PERSISTENCIA DE LOS PLAGUICIDAS

Diversos factores influyen en la persistencia de los plaguicidas, algunos ejemplos son el clima, tipo de suelo, contenido de materia orgánica y microorganismos presentes. Es importante destacar la necesidad de llevar a cabo investigaciones que profundicen acerca de la persistencia de los plaguicidas en el medio en que se aplican, con el objetivo de evaluar adecuadamente los riesgos que representan para el ambiente, los seres vivos y el bienestar del hombre (Ortiz, 1999).

El principal mecanismo de degradación ambiental de los plaguicidas es la fotodescomposición. La mayoría de ellos, especialmente los piretroides, se

descomponen modifican su estructura molecular por efecto de las radiaciones solares (CICOPLAFEST, 1994).

La descomposición química de los plaguicidas se efectúa por medio de una serie de reacciones tales como la oxidación, reducción e hidrólisis, las cuales tienen lugar en el suelo, el aire o el agua. Mediante estas reacciones se pueden descomponer o modificar algunos plaguicidas y activar otros, dando lugar a la formación de compuestos inactivos o de otros potencialmente más peligrosos para la vida que el producto original (Madigan *et al.*, 1998; Ortiz, 1999).

Los plaguicidas se adhieren a la superficie de los coloides del suelo por lo que en los suelos arcillosos se adsorben más fuertemente (CICOPLAFEST, 1994).

## DESEQUILIBRIOS ECOLÓGICOS OCASIONADOS POR LOS PLAGUICIDAS QUÍMICOS

La eliminación de una especie en un sistema ecológico da como resultado la multiplicación de las que competían contra ella. La aplicación de insecticidas ha provocado la eliminación de depredadores y, con ello, la multiplicación desorbitada de las poblaciones de otros tipos de insectos, en muchos casos dañinos, poco afectados por el insecticida. Por ejemplo, el uso del DDT (diclorodifeniltricloroetano) y HCH (hexaclorociclohexano) en frutales produjo aumentos espectaculares en las poblaciones de algunos ácaros. Otros desequilibrios ecológicos se producen a causa de la dispersión de los tratamientos, que, al afectar la fauna silvestre dan lugar a la disminución continua de la población de algunas especies (Yúfera y Carrasco, 1980).

También son afectados por los plaguicidas la flora y la fauna de las zonas en que se realizan las aplicaciones, e incluso aquellos de las regiones más alejadas. Se ha encontrado DDT en la grasa de pingüinos. Estos residuos han llegado hasta estas zonas arrastrados por el viento, por las corrientes marinas y a través de las redes tróficas. Los plaguicidas al ser ingeridos no son metabolizados y debido a su persistencia y a su solubilidad en las grasas se acumulan en el tejido adiposo. Dado que las cadenas biológicas de los depredadores comienzan con los organismos más pequeños y terminan en los animales mayores, en éstos últimos se encuentran cantidades elevadas de dichos productos químicos (Turusov, Rakitsky y Tomatis, 2002).

Así por ejemplo, después de tratamientos masivos con plaguicidas tóxicos se ha observado una mortalidad relevante en ciertas especies de aves, así como alteraciones en el cascarón de los huevos. Cuando las áreas tratadas están cerca de los ríos y lagos se observan desequilibrios en el plancton, así como la disminución de la población de crustáceos (Allan *et al.*, 2005).

Los pájaros de algunas regiones mueren en ocasiones por ingerir insectos o granos contaminados con plaguicidas. Se ha demostrado que dichas aves son especialmente sensibles a algunos plaguicidas organoclorados (Yúfera y Carrasco, 1980). Ciertas aves carnívoras (halcón, águila, pelícanos) han acumulado una gran cantidad de hidrocarburos clorados en sus tejidos,

productos que causan trastornos en la conducta y atraso de la crianza, fracaso de la cría y producción de huevos tan frágiles que se rompen durante la incubación (Ortega-Ceseña *et al.*, 1994).

Los compuestos organofosforados como el malatión, paratión, diazinón y carbamate son más venenosos pero menos persistentes, y por acción de los factores ambientales el veneno puede ser transformado en sustancias inofensivas (Ortega-Ceseña *et al.*, 1994).

Recientemente fue analizado el efecto de los piretroides deltametrin, alfacipermetrin y ciflutrin presentes en el estiércol de las vacas, sobre la fauna del estiércol. Los resultados mostraron que los niveles de contaminación por estos productos retrasan la crianza de los escarabajos (Vale *et al.*, 2004).

## DESCOMPOSICIÓN DE LOS INSECTICIDAS QUÍMICOS POR MICROORGANISMOS

Los plaguicidas que se han comercializado con la finalidad de controlar diferentes plagas contienen diversos productos químicos, como los ácidos clorogenialquilcarboxílicos, ureas sustituidas, nitrofenoles, triacinas, fenilcarbamatos, compuestos organoclorados y organofosforados. Algunas de estas sustancias son utilizadas como fuentes de carbono y son oxidadas a CO<sub>2</sub>; otros productos son empleados como donadores de electrones para algunos microorganismos del suelo. Si una sustancia puede ser mineralizada por un microorganismo, terminará desapareciendo del suelo, acción que es normalmente deseable porque evita que se acumulen cantidades tóxicas del compuesto. Sin embargo, incluso los compuestos químicos de moléculas muy parecidas pueden diferir grandemente en cuanto a su degradabilidad (desde 1, 4 u 8 semanas hasta 8 o 10 años).

La tasa de descomposición de los insecticidas está influenciada por una variedad de factores ambientales como la temperatura, pH, aireación y contenido de materia orgánica en el suelo. Algunos plaguicidas clorados son tan recalcitrantes que persisten en el ambiente edáfico hasta por más de diez años. La eliminación de un plaguicida de un ecosistema no significa necesariamente que haya sido degradado por los microorganismos, sino también a través de la volatilización, lixiviación o degradación química espontánea (Madigan *et al.*, 1998), que es lo que sucede con los piretroides (Barberá 1989).

La degradación de un plaguicida depende en gran medida de la naturaleza de la molécula, y en el caso de los compuestos aromáticos, al incrementarse el número y tipo de grupos de sustitución en los anillos de benceno, aumenta el grado de persistencia. Las sustituciones amino, metoxi, cloro y nitro confieren resistencia al ataque microbiano, mientras que las carboxi e hidroxilo lo hacen en menor grado; las sustituciones meta confieren mayor resistencia que las orto y para (Deacon, 1990).

Un hecho interesante es que los diversos compuestos artificiales no se utilizan como fuente única de carbono o energía, empero, son metabolizados



por microorganismos en presencia de una fuente de carbono fácil de obtener como la glucosa. Este fenómeno se denomina cometabolismo y parece ser el resultado de un modo de acción no específico de algunas de las enzimas que intervienen en el metabolismo normal, o de algunos pasos de oxidorreducción no enzimáticos en los que intervienen agentes reductores generados durante el metabolismo normal. De esto se puede derivar un aumento o una disminución en la persistencia del contaminante (Bull citado por Deacon, 1990). Este fenómeno se puede considerar como secundario en la nutrición de los hongos, pero pruebas recientes indican que la degradación fúngica de la lignina también implica el cometabolismo y esto es esencial para su nutrición (Deacon, 1990; Madigan *et al.*, 1998).

## EFFECTO DE LOS INSECTICIDAS EN LOS HUMANOS

La gente está expuesta a los plaguicidas en una variedad de contextos, por ejemplo a través de los alimentos y del agua, evidentemente a causa del aire contaminado y a través del contacto por exposición de la piel. Ello da como resultado que se encuentren comúnmente residuos de plaguicidas en los tejidos humanos, pero sus efectos epidemiológicos no han sido bien documentados. Hay una variedad de efectos que ocurren ya sea a corto, mediano o largo plazo (Ortega-Ceseña *et al.*, 1994). A este respecto, en Brasil se han detectado residuos de plaguicidas tales como endosulfán y HCH en la leche cruda (Ciscato, Gebara y Spinosa, 2002).

Los plaguicidas químicos pueden causar cambios en los encefalogramas, alteraciones neurológicas, pueden inducir el Parkinson y la epilepsia. La exposición a los insecticidas ha estado correlacionada con la hipertensión, el alto contenido de colesterol en la sangre y las altas concentraciones de vitamina A en el suero sanguíneo, así como con el incremento de enfermedades cardiovasculares. Muchos insecticidas pueden reducir la fertilidad y causar en ocasiones esterilidad, alergias y enfermedades en el hígado. En estudios en laboratorio se observó que varios insecticidas están implicados como teratógenos o mutagénicos en humanos, así como en la incidencia del cáncer y en el surgimiento de aberraciones cromosomales en los linfocitos (Oehme y Pickrell, 2003; Ortega-Ceseña *et al.*, 1994).

El piretroide Herald (Fenpropatrin) puede desarrollar en personas sensibles sensación de hormigueo en la región periorbital facial. En casos de intoxicación provoca irritación de mucosas buconasales, salivación y ataques convulsivos, según las indicaciones en el producto ( Valent<sub>[IBM]</sub> de México S. A. de C. V.).

## RESISTENCIA DE LOS INSECTOS A LOS PLAGUICIDAS QUÍMICOS

Tan pronto como se introdujeron los insecticidas para el control de plagas, las poblaciones de insectos comenzaron a tener grandes presiones por los químicos y desarrollaron mecanismos de resistencia. De esta forma, en 1914 en EUA se reportó la resistencia del pulgón de San José al DDT (Pimentel y Perkins, 1980).

Los insectos desarrollan mecanismos bioquímicos de defensa frente a los plaguicidas dando lugar a la aparición de poblaciones resistentes. Este fenómeno empezó a ser conocido hacia el año 1950 y a partir de ese momento se ha incrementado el número de comunicaciones científicas al respecto. Los casos más conocidos son los de la resistencia de la mosca doméstica y el escarabajo de la papa al DDT, en los que están implicados los sistemas enzimáticos del insecto. El problema no sólo involucra al DDT sino que posteriormente se ha descrito resistencia de las plagas a los insecticidas fosforados y a casi todos los demás tipos. Para soslayar el efecto de la resistencia se puede realizar una rotación de plaguicidas o emplear productos sinérgicos (Yúfera y Carrasco, 1980).

La resistencia a los químicos que incrementa las pérdidas económicas causadas por plagas porque el grado de control declina a lo largo del tiempo, porque los costos del control aumentan debido a los requerimientos de tratamientos suplementarios y porque son requeridos nuevos estudios para desarrollar compuestos que los reemplacen (Mier *et al.*, 2004).

## CONTROL BIOLÓGICO

Los ejemplos individuales del uso de enemigos naturales para el control de plagas han existido por cientos de años, pero el control biológico emerge como un método científico sólo después del siglo XIX. Esto fue debido a la emergencia de nuevos conceptos llevados en tales materias como las relaciones entre especies, su evolución, presiones de población, la lucha por la existencia y por otra parte, por la urgente necesidad de solucionar serios problemas presentados por las plagas exóticas en diferentes partes del mundo (Huffaker y Messenger, 1976).

La idea de usar enfermedades para controlar insectos nocivos fue sugerida por Luis Pasteur en 1870, en relación con el control de *Phylloxera*. El primer intento de aplicación práctica fue hecho por científicos franceses o por aquellos que trabajaban en Francia como Giard d'Herelle y Metshinikoff (Novozhilov, 1988).

El término control biológico fue propuesto primero por Smith en 1919 para definir el uso de enemigos naturales (ya sea introducidos o manipulados de otra manera), para el control de insectos plaga. El alcance de la aplicación del control biológico se ha expandido firmemente desde el uso de insectos entomófagos contra insectos plaga, hasta el uso de un amplio intervalo de organismos como pulgas, caracoles, ocasionalmente vertebrados y plantas tan diversas como hierbas, arbustos y árboles, así como hongos y algas (Huffaker y Messenger, 1976).

De esta forma el control biológico se define como la acción de organismos parásitos, depredadores y patógenos (enemigos naturales), que mantienen la densidad de población de otro organismo a nivel inferior de aquel que ocurriría en su ausencia (Jazzar y Hammad, 2004). Es un método seguro y

económicamente productivo (van Lenteren, 1992), además, reduce la dependencia a los químicos que son caros y contaminan el ambiente (Ghewande, 1990).

## CONTROL MICROBIANO

Una de las estrategias más atractivas que se emplean como parte del control biológico de insectos es el control microbiano, que se puede definir como la utilización de microorganismos, introducidos por el hombre, capaces de provocar enfermedades en los insectos plaga, con la ventaja de que la mayor parte de los microorganismos no dañan a otros animales o a las plantas (Jazzar y Hammad, 2004).

Entre los microorganismos susceptibles de ser usados como control biológico están los hongos parásitos, que son aquellos que invaden plantas o animales vivos; se alimentan y multiplican dentro y a expensas del hospedero causando anomalías fisiológicas o la destrucción del mismo, hecho que culmina con la enfermedad marcada por cambios detectables en la función o en la morfología (Madigan *et al.*, 1998).

Los primeros microorganismos descritos por ocasionar enfermedades en los insectos fueron los hongos, denominando micosis a estos síntomas o patologías (Valenzuela, 1987).

La especificidad del grupo al que atacan los hongos entomopatógenos es bastante variable, pues se trata de un grupo heterogéneo adaptado a medios más ricos en proteínas y viven sólo en insectos hospederos. Los entomopatógenos incluyen géneros como *Beauveria*, *Metarhizium*, *Sorosporella*, *Cephalosporium*, *Verticillium* y otros (St. Leger *et al.*, 1997).

Conocer con detalle el proceso por el que un hongo entomopatógeno ataca al insecto es de gran importancia para su empleo en biocontrol. Los hongos a diferencia de los virus y bacterias, no requieren ser ingeridos para ocasionar una enfermedad sino que penetran a través de los espiráculos y particularmente, a través de la superficie del integumento de los insectos. Después de un período de sobrevivencia en ausencia del huésped, deben tener la capacidad de responder de manera específica para adherirse y penetrar la cutícula rompiendo barreras por acción física y enzimática (St. Leger, 1995).

El proceso de patogénesis incluye la morfogénesis relacionada con la infección así como la producción de enzimas que ocurre cuando faltan nutrimentos extracelulares: de esta forma, el agotamiento de los reservorios hace necesario para el patógeno establecer una relación nutricional con el hospedero (St. Leger *et al.*, 1997).

Dentro de la infección se distinguen al menos nueve fases (Barranco-Florida *et al.*, 2002):

- 1) Adhesión de la unidad infectiva a la epicutícula del insecto.

- 2) Germinación de la unidad infectiva en la cutícula.
- 3) Penetración de la cutícula, ya sea por tubos germinales o por ganchos infectivos formados a partir de un apresorio.
- 4) Multiplicación del hongo en su fase levaduriforme (blastosporas) en el hemocele.
- 5) Producción de metabolitos tóxicos.
- 6) Muerte del huésped.
- 7) Crecimiento del hongo en su fase micelial, con invasión de prácticamente todos los órganos.
- 8) Emergencia de las hifas desde el interior, a través de la cutícula, hacia el exterior del insecto
- 9) Producción de las unidades infectivas sobre el insecto, en el exterior.

La epicutícula es delgada y contiene lípidos serosos (ácidos grasos y parafina); la procutícula es aún más delgada y está compuesta por quitina embebida de proteínas. La degradación de éstas involucra la participación de diversas enzimas y la presión mecánica ejercida por el crecimiento hifal (St. Leger *et al.*, 1997).

#### POTENCIAL DE *Verticillium lecanii* PARA EL CONTROL DE PLAGAS

*Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas es un hongo entomopatógeno bien documentado; se ha observado que desarrolla epizootias entre sus hospederos más comunes (áfidos y escamas) en regiones tropicales y subtropicales (Hall 1981; Lourencao, Miranda y Alves, 2001).

Este hongo, con base en su clasificación taxonómica pertenece a los Hifomicetes, la Clase de los Ascomicetos, que se caracterizan por producir sus conidios en conidióforos solitarios o agrupados en sinemas o en esporodoquios pero, característicamente nunca producen esporóforos más complejos (Herrera y Ulloa, 1990). Siguiendo con el sistema de clasificación, el género *Verticillium* está incluido en el Orden Moniliales y en la Familia Moniliceae, que presentan micelio y conidios hialinos o ligeramente pigmentados (Talbot, 1971).

El género *Verticillium* anteriormente se conocía como *Cephalosporium*, pero Gams en 1971, lo reexaminó y ubicó un grupo compuesto por un gran número de especies entomopatógenas en una nueva sección: *Verticillium* sec. *Prostrata*. Estos hongos tienen como característica principal la apariencia aterciopelada o algodonosa y micelios aéreos que ocasionalmente pueden contener fiálides de verticilios (Hall, 1981). El nombre del género se deriva del latín *verticillus*, que significa verticillo o rodaja y del sufijo diminutivo *ium* en alusión al arreglo verticiliado de las fiálides en el conidióforo que pueden estar dispuestas en verticilios primarios, secundarios y de mayor orden a lo largo del eje principal o ramas del conidióforo. Los conidios (fialosporas) son unicelulares, hialinos y están embebidos en mucílago, por lo que forman bolas gleoides en los ápices de las fiálides (Ulloa y Herrera, 1994).

Recientemente, Zare y Gams (2001) sugirieron que las especies clasificadas como *Verticillium* sec *Prostrata*, especialmente *V. lecanii* y *V. psalliotae*, fueran transferidas al género *Lecanicillium*, con base en el análisis

filogenético de las secuencias ITS (espaciadores transcritos internos). Pero Sugimoto *et al.* (2003), emplearon además de los ITS, secuencias IGS (espaciadores intergénicos), regiones de DNA ribosomal, pequeñas subunidades de rDNA mitocondrial, así como genes codificadores de una  $\beta$ -tubulina y una histona 4 para caracterizar morfológica y genéticamente a *V. lecanii* y concluyeron que se requieren más investigaciones para determinar las diferencias. Asimismo consideraron que *V. lecanii* debía seguir con la misma nomenclatura hasta que hubiera más elementos para justificar el cambio.

*Verticillium lecanii* cuando se cultiva sobre medio sólido forma colonias de 18 a 22 mm de diámetro después de 10 días, de color blanco o amarillo pálido, de apariencia algodonosa aterciopelada; con fiálides puntiagudas, de tamaño muy variable, sencillas o en pequeños grupos de verticilos en micelio aéreo. Los conidios se forman en las puntas terminales de las fiálides; son de forma cilíndrica a elipsoidales con terminaciones simétricas redondeadas (Hall, 1981).

Existen bioplaguicidas basados en conidios o blastosporas de diferentes cepas de *V. lecanii*, por ejemplo Mycotal, Vertalec-Koppert (Sugimoto, Koike y Nagao, 2001) y Microgermina (Osborne y Landa, 1992). Estos productos han estado sujetos a varias pruebas de toxicidad requeridas para su registro y aprobadas por varias autoridades alrededor del mundo. En México, Mier *et al.* (1994) realizaron investigaciones sobre la infectividad de *V. lecanii* en cobayos y ratones; los análisis micológicos e histopatológicos de tejido hepático, riñones, bazo y pulmón, pusieron de manifiesto la inocuidad de *V. lecanii* al ser inoculado por vía intraperitoneal en estos mamíferos.

En estudios realizados a trabajadores expuestos a bioinsecticidas como *V. lecanii* encontraron una sensibilización de las inmunoglobulinas IgE, pero IgE anti-*Verticillium lecanii* no muestra correlación y concluyen que la exposición a bioinsecticidas puede conferir un riesgo para los trabajadores mediante sensibilización IgE, que es necesario identificar los componentes alergénicos en las preparaciones, así como llevar a cabo estudios con testigos (no expuestos) y en estudios posteriores analizar la relación entre parámetros de salud y sensibilización (Doekes *et al.*, 2004).

En Alemania al analizar muestras del agua de mantos freáticos para consumo humano, se detectó la presencia de flora fúngica (*Aspergillus*, *Acremonium*, *Exophiala*, *Penicillium*, *Phialophora* y *V. lecanii*) en las muestras dentro de las tuberías de agua, a diferencia de las tomas domésticas, indicando que no todos los hongos que tienen acceso al sistema hidráulico son capaces de sobrevivir dentro del mismo por largos periodos (Gottlich *et al.*, 2002).

#### PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE *Verticillium lecanii*

*Verticillium lecanii* es un hongo interesante y peculiar, porque además de ser un parásito de insectos, también infecta otros hongos. De manera específica es muy común encontrarlo en las pústulas formadas por las royas y algunas cenicillas pulverulentas cuando ambos patógenos rompen la superficie de plantas superiores para esporular. Forma una maraña micelial en la

superficie de estas pústulas y penetran muchas esporas, pero no daña la planta. Las esporas de los hongos y los insectos comparten varias características como hospederos de *V. lecanii*: presencia de quitina en las paredes en la cutícula; síntesis de trehalosa y manitol como fuentes de carbono y acumulación de lípidos y glucógeno como principales reservas de energía (Ghewande, 1990).

En diferentes reportes se ha registrado la infectividad de *V. lecanii* contra escarabajos, áfidos, larvas de lepidópteros, homópteros, nemátodos y moscas blancas de invernadero en ensayos de laboratorio (Faria y Wraight, 2001; Hall, 1989; Houle *et al.*, 1987; Jazzar y Hammad, 2004; Kim, Kim y Roberts, 2005; Lezama y Mellin, 1991; Meyer y Meyer, 1996; Mier *et al.*, 1991; Puterka *et al.*, 1994; Shaw *et al.*, 2002; Vidal *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Yokomi y Gottwald, 1988), en los que se demuestra un porcentaje de mortalidad, desde el 78% hasta un 100% con dosis de  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  conidios  $\text{ml}^{-1}$ , obteniendo tiempos letales medios ( $\text{TL}_{50}$ ) de 5 a 9 días según la plaga. Por ello varios autores afirman que *V. lecanii* puede tener un papel destacado en la regulación de las plagas a través de su aplicación en programas de control biológico.

El proceso de infección de *V. lecanii* ha sido descrito por Askary, Benhamou y Brodeur (1997; 1999) a la luz de la microscopía electrónica empleando como marcador el complejo aglutinina de germen de trigo-ovomucoide. Los autores indican que el parasitismo en áfidos incluye los siguientes eventos: (i) adherencia del conidio a la cutícula del insecto a través de una delgada matriz mucilaginosa; (ii) germinación del conidio y producción de micelio que coloniza la superficie de la cutícula; (iii) penetración de los tubos germinativos dentro de la cutícula 24 h después de la aplicación; (iv) desarrollo lateral extensivo de las hifas acompañado de una pronunciada degradación de las capas de la cutícula a las 72 h; (v) producción de blastosporas e invasión masiva de los tejidos del insecto; (vi) asimilación de los nutrimentos y acumulación de lípidos en las células del hongo y (vii) producción de conidióforos y emergencia del hongo desde el cadáver del insecto.

La penetración y colonización de la cutícula por el hongo es el resultado de la acción enzimática y presión mecánica; la producción de enzimas que degradan la cutícula es una propiedad determinante para la patogenicidad de los hongos hacia los insectos. Existe una serie de genes que están involucrados con la patogenicidad de los hongos. Algunos están involucrados en la detección directa o indirecta de la presencia del huésped, otros en la inactivación de sus defensas y otros más en la producción de toxinas (Barranco-Flrido *et al.*, 2002; St. Leger, 1995). En *V. lecanii* se han identificado enzimas que trabajan secuencialmente: durante las primeras 24 horas son producidas las esterasas y enzimas proteolíticas como endoproteasas, aminopeptidasas y carboxi-peptidasas, seguidas por exoquitinasas (N-acetilglucosamidasa), endoquinasas y lipasas (Bidochka y Khachatourians, 1994; St. Leger, 1995).

Las lipasas, proteasas y quitinasas juegan un papel fundamental en la infección. Las proteasas tienen un papel decisivo por el hecho de que las

proteínas constituyen alrededor del 70% de la cutícula. Durante la penetración cuticular, el hongo pasa a través de diferentes ambientes a los cuales responde con procesos adaptativos bioquímicos y de diferenciación celular para formar una serie de estructuras morfológicas específicas. Por ejemplo, *M. anisopliae* desarrolla apresorios en la superficie de la cutícula, ganchos de infección en la epicutícula, hifas en la procutícula y blastosporas en el hemocele (St. Leger, 1995).

#### PLAGUICIDAS QUÍMICOS EMPLEADOS JUNTO CON *Verticillium lecanii*

Olmert y Kennet (1974) estudiaron *in vitro* la acción de 14 insecticidas químicos ( fluorosilicato de sodio, endosulfán, Omite<sup>TM</sup>, triclorfon, clorobenzilato, diazinon, ethion, azinfosmetil, cloropirifos, aceite parafinico, supracide, diclorvos, carbanil, Levanola<sup>TM</sup>) en hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii* y *Verticillium* sp. y observaron que esos productos inhibían el crecimiento de *Verticillium* sp. Sin embargo, Hassan *et al.* (1988) demostraron que los plaguicidas Dursban S., Ambush C., Basudine V., Perfektion, Phosdrine W10, Dimercrom 2, Milgo-E, Gesaprim 50, Fusilade y Roundapson son inocuos para *V. lecanii*.

El grupo de Carrión y colaboradores (1990) evaluaron *in vitro* el efecto del tridimefón y el oxiclورو de cobre sobre el crecimiento de *V. lecanii*, y observaron que éstos productos redujeron la densidad micelial y la producción de conidios. Los autores también describieron la formación de anillos de inhibición de *V. lecanii*.

En México, Mier *et al.* (1999), analizaron el efecto de tres insecticidas (lambda-cialotrina, permetrina y metamidofos) y un fungicida (benomilo) en diferentes cepas de *V. lecanii*. Los autores observaron cambios morfológicos atípicos en las colonias, tales como de coloración (de blanco a café claro) y de apariencia (de algodonosa tomó un aspecto similar al cuero), con anomalías en la conidiación y en la organización hifal, modificaciones que se reversionaron cuando se cultivaron en medio libre de plaguicidas. Por su parte Batista, Almeida y Lamas (2001) reportaron que el insecticida tiametoxam es compatible con *V. lecanii* cuando se aplica en dosis subletales.

Fournier y Brodeur (2000), realizaron una investigación con el fin de dar alternativas de control de áfidos empleando un insecticida sintético, azadiractin (Bio Neem), jabón y *V. lecanii*, determinando que los áfidos son susceptibles a los tres tratamientos.

Javed y Matthews (2002) aplicaron el insecticida diafenthiurón junto con los parasitoides *Encarsia formosa* y *Eretmocerus eremicus* y *V. lecanii* contra la mosquita blanca obteniendo un buen control de la plaga y recomendándolo para ser usado en programas de manejo integrado.





## SOBRETIROS DE LOS ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

García-Juárez, Martha, Conchita Toriello, Teresa Mier. 1999. Compatibilidad *in vitro* de *Verticillium lecanii* con un insecticida piretroide y su efecto sobre la patogenicidad del hongo en la mosquita blanca. *Revista Mexicana de Micología* **15**: 11-16.

García-Juárez, Martha, Conchita Toriello, Teresa Mier. 1999. Effect of the insecticide fenprothrin on exoenzyme production in *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **41**: 215-216.

## COMPATIBILIDAD *IN VITRO* DE *VERTICILLIUM LECANI* CON UN INSECTICIDA PIRETROIDE Y SU EFECTO SOBRE LA PATOGENICIDAD DEL HONGO EN LA MOSQUITA BLANCA

MARTHA GARCÍA-JUÁREZ<sup>1</sup>, CONCHITA FORIELLO<sup>2</sup> & TERESA MIER<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Depto. El Hombre y su Ambiente, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-X, México D.F. 04960, México

<sup>2</sup>Depto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, México D.F. 04510, México

### ABSTRACT

***IN VITRO* COMPATIBILITY OF *VERTICILLIUM LECANI* WITH A PIRETROID INSECTICIDE, AND ITS EFFECT ON FUNGAL PATHOGENICITY ON THE WHITEFLY** *Rev. Mex. Mic.* 15: 11-16 (1999). The joint use of a natural bioregulator, such as *Verticillium lecanii*, and a selective insecticide could be advantageous to control the whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) in integrated pest management programs. To study the *in vitro* compatibility of *V. lecanii* with the piretroid insecticide, fenpropathrin, two assays were made:

In insecticide-treated solid media, and incubating a fungal suspension of 10<sup>8</sup> conidia/ml with the piretroid during 16 h at 26 °C, simulating an aspersion tank. Compatibility was assessed by determining the viability [colony forming units (CFU) and germination], radial growth velocity, morphology, and sporulation, and the effect of fenpropathrin on the pathogenicity of the fungus on whiteflies by a nymph bioassay reported as a Fungal Growth and Development Index (FGDI). Results showed a 45.6% inhibition of viability with CFU and of 43.0% with germination (P<0.05) in the assay simulating an aspersion tank. No alterations by the piretroid were observed in radial growth, morphology, and sporulation. A delay in fungal growth and development on the nymph bioassay was found (lower FGDI than the control) after exposing it to the insecticide, suggesting a negative effect of fenpropathrin on *V. lecanii* pathogenicity. This is the first report in Mexico where the effect of a chemical insecticide on fungal pathogenicity is tested by this bioassay. Tank mixing of the fungus with the piretroid should be avoided, rather the fungus and the insecticide should be aspersed separately.

**Key words:** *Verticillium lecanii*, piretroid fenpropathrin, integrated pest management, biological control

### RESUMEN

La utilización conjunta de un biorregulador natural como *Verticillium lecanii* y un insecticida selectivo podría ser de utilidad en el control de la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae), en programas de manejo integrado de plagas. Con el objeto de conocer la compatibilidad *in vitro* de *V. lecanii* con el insecticida piretroide fenpropatrin, se hicieron ensayos en medios sólidos adicionados del insecticida, e incubando previamente una suspensión fúngica de 10<sup>8</sup> conidios/ml con el piretroide durante 16 h a 26°C, simulando un tanque de aspersion. La compatibilidad se evaluó mediante la determinación de la viabilidad [unidades formadoras de colonias (UFC) y germinación], velocidad de crecimiento radial, morfología y esporulación, y el efecto del fenpropatin en la patogenicidad del hongo hacia la mosquita blanca mediante un bioensayo en ninfas, reportado como Índice de Crecimiento y Desarrollo Fúngico (ICDF). Los resultados mostraron la inhibición de la viabilidad del hongo en un 45.6% con el método de UFC, y en un 43.0% con la germinación (p<0.05), en el ensayo simulando un tanque de aspersion. No se observó ninguna alteración en la velocidad de crecimiento radial, morfología y esporulación de *V. lecanii*. Se encontró un retraso en el desarrollo y crecimiento del hongo sobre la ninfa en el bioensayo (menor ICDF que el testigo), cuando fue expuesto previamente al insecticida, indicando la incidencia del fenpropatrin sobre la patogenicidad de *V. lecanii*. Este es el primer reporte en México donde se investiga el efecto de insecticidas químicos en la patogenicidad de hongos entomopatógenos por este bioensayo. Se recomienda evitar las mezclas directas del hongo con el piretroide en tanques de aspersion, asperjando por separado hongo e insecticida.

**Palabras clave:** *Verticillium lecanii*, piretroide fenpropatrin, compatibilidad, manejo integrado de plagas, control biológico

### Introducción

*Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas es un agente para el control biológico de insectos tales como la mosquita blanca, los pulgones y algunos hongos

fitopatógenos (Carrion, 1988; Ghewande, 1990; Landa *et al.*, 1994). Algunas cepas se producen comercialmente como micoinsecticidas, con el nombre de Vertalac para áfidos, Mycotal para mosquita blanca y Thriptal para trips, en invernaderos

de Europa (Goettel *et al.*, 1990). La utilización conjunta de biorreguladores naturales, como *V. lecanii*, e insecticidas químicos selectivos de toxicidad limitada pueden representar una alternativa de utilidad en programas de manejo integrado de plagas (MIP) (Alves *et al.*, 1993). En México, el insecticida piretroide fenpropatrin es usado para el control químico de la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae). Los piretroides son sensibles al calor y, por lo tanto, su vida residual disminuye conforme la temperatura aumenta (Barbera, 1989) lo cual podría favorecer su selección en programas de MIP que contemplan la protección ambiental, aunque en la etiqueta del fabricante este insecticida aparece como tóxico para el humano y otros animales, como peces y abejas.

La mayoría de los insecticidas químicos representan un riesgo para la salud y el equilibrio de los ecosistemas (Restrepo, 1988); en consecuencia, existe actualmente un marcado interés por conocer las repercusiones de los plaguicidas químicos selectivos sobre los hongos entomopatógenos (Hassan *et al.*, 1994; Ravensberg *et al.*, 1994; Saito & Yabuta, 1996) para su utilización conjunta en MIP. El presente trabajo tiene como objetivo determinar el efecto del piretroide fenpropatrin sobre la viabilidad, el crecimiento radial y la esporulación, morfología y patogenicidad de *V. lecanii*, *in vitro*, en un medio de cultivo adicionado con el insecticida, así como en condiciones que simulan un tanque de aspersión, incubando al entomopatógeno previamente con el químico.

## Materiales y Métodos

**Hongo.** Se utilizó la cepa C de *Verticillium lecanii* aislada a partir de la mosquita blanca, *Trialeurodes vaporariorum* West. de un cultivo de frijol del estado de Morelos, México (Mier *et al.*, 1991). El hongo es conservado en medio H (dextrosa 0.5%, sacarosa 1.0%, extracto de levadura 0.5%, peptona 0.05%, agar 1.5%) a 4°C, en agua destilada, y en gel de sílice, en el cepario del Laboratorio de Microbiología, Departamento El Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Su virulencia es reactivada periódicamente por la infección en ninfas de mosquita blanca. Para todos los ensayos se preparo una suspensión de  $10^8$  conidios/ml a partir de un cultivo del hongo en medio H, incubado 12 días a 26°C.

**Condiciones de cultivo con el fenpropatrin.** Se realizaron dos tipos de ensayos, el primero sembrando la suspensión conidial directamente en medio H adicionado del piretroide Herald (Fenpropatrin: (RS) alfa ciano 3 fenoxibencil 2, 2, 3, 3 tetrametil ciclopropanocarboxilato, equivalente a 375 g de a.i. Valent de México, S.A. de C.V.) a una concentración final del 0.2%, y el segundo manteniendo la suspensión conidial en contacto con el insecticida al 0.2% durante 16 h en una incubadora de agitación orbital, simulando un tanque de aspersión.

**Efecto del insecticida sobre la viabilidad del hongo.** Se determinó el porcentaje de inhibición de las unidades formadoras de colonias (UFC) y de conidios germinados. Para la determinación de las UFC se sembraron alicuotas a partir de diluciones de la suspensión conidial; para el primer ensayo directamente en el medio H adicionado del piretroide, y para el segundo se tomaron alicuotas del matraz con la suspensión conidial incubada previamente 16 h con el insecticida, y se sembraron en cajas con el medio H. Para cada ensayo se utilizaron testigos sin insecticida. Se calculó el porcentaje de inhibición (%) de las UFC aplicando la fórmula siguiente:

$$\%I = \frac{UFC_{\text{testigo}} - UFC_{\text{tratamiento}}}{UFC_{\text{testigo}}} \times 100$$

Para la determinación de la capacidad germinativa se tomaron alicuotas de 0.2 ml de las suspensiones conidiales de los dos mismos ensayos arriba mencionados y se sembraron por extensión en cajas de Petri conteniendo una capa fina del medio H. Cada 4 h se cortaron fragmentos cuadrados de 1.5 cm de lado, se observaron 100 conidios al microscopio óptico a un aumento de 400x, y se determinó la proporción de los conidios germinados a las 24 h en comparación con el testigo sin insecticida para cada ensayo. El cálculo del %I se realizó con la misma fórmula utilizada para las UFC.

**Efecto del insecticida sobre la velocidad de crecimiento radial, morfología y esporulación del hongo.** Para observar el efecto del fenpropatrin sobre la velocidad de crecimiento radial, se sembraron alicuotas de 50 µl de la suspensión conidial, de los ensayos mencionados anteriormente, en cavidades practicadas en el centro de cajas de Petri con medio H, y se incubaron durante 15 días a 26°C. Se llevaron a cabo mediciones cada tercer día; a los 15 días se comparó el diámetro de la colonia con y sin insecticida de cada uno de los ensayos. Se observó, además, la macro y micro morfología de las colonias

del hongo con y sin insecticida. La prueba de esporulación se realizó solamente a partir de la suspensión conidial del segundo ensayo donde el hongo se mantuvo previamente en contacto con el insecticida durante 16 h. A partir de esta suspensión se tomaron alícuotas de 50 µl, se sembraron en cajas con medio H y se incubaron 15 días a 26 °C. Los conidios producidos se cosecharon con Tween 80 al 0.05% y se cuantificaron en cámara de Neubauer. Se comparó la producción de conidios en medio H con el testigo sin previa incubación con el insecticida.

**Efecto del insecticida sobre la patogenicidad del hongo hacia la mosquita blanca.** Se llevó a cabo en un bioensayo con ninfas de *T. vaporariorum* por medio de la determinación del Índice de Crecimiento y Desarrollo Fúngico (ICDF) descrito por Landa *et al.* (1994). Para esta prueba se utilizó la suspensión conidial del hongo incubada previamente 16 h con fenpropatrin simulando un tanque de aspersión. Para el estudio se escogieron las ninfas que presentaron las características del estadio cuatro de ninfa (Ortega, 1992; Landa *et al.*, 1994), la observación se hizo en microscopio estereoscópico. Brevemente, el bioensayo se llevó a cabo depositando gotas con asa calibrada (0.003 ml/gota) de la suspensión conidial ( $1 \times 10^6$  conidios/ml) con y sin incubación con el fenpropatrin, en un portaobjetos estéril. Las ninfas previamente seleccionadas se depositaron en el centro de cada gota y las laminillas se incubaron en cámara húmeda a 26 °C con una luminosidad correspondiente al cielo día/noche. Cada suspensión conidial se ensayó con 300 ninfas. Estas fueron observadas en el microscopio compuesto a las 24, 48, 72 y 96 h; el desarrollo fúngico en el insecto fue evaluado con base en una escala de 0 a 3.0, y comparado con ninfas testigo cubiertas de una suspensión del hongo sin incubación con el insecticida. El ICDF corresponde a la siguiente escala: 0.0 = ninfa rodeada de conidios no germinados; 0.5 = germinación de conidios con uno o dos tubos germinativos en el área cercana a la ninfa; 1.0 = crecimiento de tubos germinativos y presencia de hifas; 1.5 = crecimiento inicial del hongo orientado al insecto y primer contacto de las hifas con la ninfa; 2.0 = crecimiento micelial dentro y en la superficie y área alrededor de la ninfa; 2.5 = inicio de la esporulación, conidios que cubren la superficie de la ninfa; 3.0 = esporulación completa, ninfa cubierta con micelio y conidios del hongo.

**Análisis estadístico.** Cada ensayo se realizó por triplicado, y todos los experimentos se repitieron tres veces por separado. Los resultados se sometieron a

un análisis de varianza a un nivel de significancia del 5%.

## Resultados y Discusión

La mayoría de los trabajos para determinar el efecto de los plaguicidas químicos en hongos entomopatógenos se ha llevado a cabo en placas de agar (Hassan *et al.*, 1994; Saito & Yabuta, 1996; Ravensberg, *et al.*, 1994). Sin embargo, Anderson y Roberts (1983) demostraron que la inhibición de hongos entomopatógenos por insecticidas químicos aumenta cuando estos se mezclan en un tanque de aspersión. Por lo tanto, este trabajo se realizó utilizando dos métodos: el de la adición del producto en placas de agar, y el del contacto del hongo con el producto por 16 h, simulando un tanque de aspersión, para observar las diferencias de inhibición entre ambos métodos.

El efecto del fenpropatrin sobre la viabilidad de *V. lecanii* calculado en porcentaje de inhibición de las UFC y germinación de conidios se muestra en la Tabla 1.

Se observó una mayor inhibición en ambas pruebas cuando los conidios fueron incubados con el piretroide durante 16 h simulando un tanque de aspersión, que cuando los conidios se pusieron en contacto con el medio impregnado con insecticida ( $p < 0.05$ ). Anderson y Roberts (1983) demostraron que en *Beauveria bassiana* la inhibición por piretroides, permetrina y fenvalerato también aumenta por el contacto con el insecticida en un tanque de mezcla. Por otro lado, el efecto del fenpropatrin observado sobre la viabilidad de *V. lecanii* podría ser un indicador de sus repercusiones en campo sobre diversos hongos entomopatógenos y la microbiota benéfica en general.

El efecto del piretroide sobre el crecimiento radial y la esporulación del hongo no mostró ninguna diferencia significativa entre los conidios expuestos o no al fenpropatrin. Alves *et al.* (1993) al probar la compatibilidad de fenpropatrin, entre otros insecticidas, con *V. lecanii* en placas de agar, encontraron que este producto fue de los más selectivos por provocar una inhibición menor en el crecimiento y la esporulación del hongo, lo que concuerda con los resultados de este trabajo. Al analizar las características macroscópicas de las colonias así como la microscopía de las estructuras fúngicas entre los conidios estudiados, no se encontraron alteraciones por el contacto con el

**Tabla 1. Porcentaje de inhibición de la viabilidad de *Verticillium lecanii* por efecto del insecticida piretroide fenpropatrin.**

| Viabilidad       | Porcentaje de Inhibición                                     |   |
|------------------|--|---|
|                  | Conidios en medio II Adicionado de fenpropatrin <sup>a</sup> | Conidios incubados 16 h Con fenpropatrin <sup>b</sup> |
| UFC <sup>b</sup> | 9.8  | 45.6  |
| Germinación      | 6.0  | 43.0  |

<sup>a</sup> Concentración del 0.2 %

<sup>b</sup> UFC = Unidades formadoras de colonias

insecticida, lo que concuerda con nuestros resultados arriba mencionados, los cuales no muestran inhibición del crecimiento vegetativo del hongo. Utilizando diferentes plaguicidas químicos, Carrión *et al.* (1990) y Mier (com. pers.) observaron alteraciones morfológicas en *V. lecanii* ocasionadas por el tratamiento del hongo con triadimefón y oxieloruro de cobre, y con lambda-cialotrina, permetrina y metamidofós, respectivamente, lo cual coincidió con la inhibición del crecimiento del hongo por estos plaguicidas.

La prueba del ICDF descrita por Landa *et al.* (1994) ha sido recomendada para estudios de compatibilidad con agroquímicos por estos autores, ya que es un bioensayo de utilidad para discernir la repercusión de estos productos sobre la patogenicidad del hongo sobre el insecto plaga, antes de ser utilizado en campo. Los resultados de este bioensayo con el fenpropatrin pueden observarse en la figura 1. Las fotos de la columna de la izquierda corresponden al testigo sin insecticida, en comparación con la columna de la derecha que corresponde al hongo con insecticida (tratamiento), a las 24, 48, 72 y 96 h de duración del bioensayo. A las 24 h, se observó una diferencia en el ICDF, en la cual el testigo muestra un ICDF de 1.5 en comparación con 0.5 correspondiente al tratamiento. La figura 1a (testigo) muestra conidios, conidios germinados cercanos a la ninfa, así como conidios e hifas en la superficie del insecto que muestran el primer contacto del hongo con el insecto; en la figura 1b (tratamiento) solamente se observan algunos conidios germinados en el área cercana a la ninfa. A las 48 h del ensayo, el ICDF alcanza un valor de 2.0 en el testigo, en comparación a 1.0 del tratamiento. La figura 1c (testigo) muestra hifas dentro de la ninfa, y la figura 1d (tratamiento) conidios, conidios germinados e hifas alrededor de la ninfa. A las 72 h del bioensayo, el ICDF del testigo

alcanza 2.5 en comparación a 1.5 del tratamiento. En la figura 1e (testigo) se puede observar la ninfa cubierta de micelio con inicio de esporulación, mientras que en la figura 1f (tratamiento) se inicia el crecimiento de los conidios e hifas en la superficie del insecto, de manera similar a la figura 1a del testigo. A las 96 h, el ICDF del testigo alcanza el valor máximo de 3.0, que corresponde a la invasión completa de la ninfa por el hongo, que después de colonizar el insecto vuelve a salir a la superficie a esporular. En comparación, los conidios tratados con el fenpropatrin, sólo alcanzan al mismo tiempo de 96 h, un ICDF de 2.5 que corresponde a la ninfa cubierta con micelio pero con inicio solamente de esporulación. La figura 1g (testigo) muestra la ninfa cubierta por completo con micelio mientras que en la figura 1h (tratamiento) se observa micelio con inicio de esporulación.

El resultado del bioensayo (ICDF) en ninfas de mosquita blanca mostró que el fenpropatrin provocó un retraso en el crecimiento y desarrollo del hongo en la ninfa infectada durante el transcurso del experimento en comparación con el testigo. Por ejemplo, el ICDF de 1.5 se alcanzó hasta las 72 h en el tratamiento (Fig. 1f), mientras que con el testigo se alcanzó a las 24 h (Fig. 1a). En el tratamiento, a las 96 h, el ICDF correspondió a 2.5, mientras que en el testigo se había ya alcanzado el valor máximo de 3.0. Éste es el primer reporte en México donde se utiliza este bioensayo para investigar el efecto de insecticidas químicos en la patogenicidad de hongos entomopatógenos.

Al aplicar este bioensayo, Landa *et al.* (1994) encontraron que fue de utilidad para probar el efecto de diferentes insecticidas en el desarrollo fúngico de *Paeecilomyces fimosorosus* contra ninfas de cuarto estadio de *Bemisia argentifolii*. Es interesante que estos autores comparan la patogenicidad de tres

hongos entomopatógenos, *P. fumosoroseus*, *V. lecanii* y *B. bassiana* en ninfas de mosquita blanca (*B. argentifolii*), encontrando como el más patógeno a *P. fumosoroseus*, por su ICDF de 3.0 a las 120 h del bioensayo. Sin embargo, en nuestro trabajo, utilizando la misma prueba con la cepa C de *V. lecanii* y ninfas de cuarto estadio de otra especie de mosquita blanca, *T. vaporariorum*, se encontró un ICDF de 3.0 a las 96 h para el testigo, en comparación con un índice de 2.03 a 2.63 que Landa *et al.* (1994) reportan para tres cepas de *V. lecanii*. Estos datos apoyan la utilidad de esta prueba para la selección de cepas virulentas en el laboratorio, como lo sugerido por Landa *et al.* (1994).

El desarrollo del bioensayo mostró los diferentes eventos que se suceden en la interacción entre el parásito (*V. lecanii*) y el hospedero (ninfas de mosquita blanca), como lo son la orientación del hongo hacia el hospedero, germinación de los conidios en la superficie ninfal, la producción de micelio en la superficie y dentro del insecto, y por último la colonización masiva del insecto por el hongo que se observa por la presencia de micelio con esporulación completa (Fig. 1a-h). Estos eventos son consistentes con la secuencia que caracteriza las infecciones de hongos entomopatógenos (Charnley, 1989), y en especial la infección del áfido *Macrosiphum euphorbiae* por *V. lecanii* (Askary *et al.* 1999).

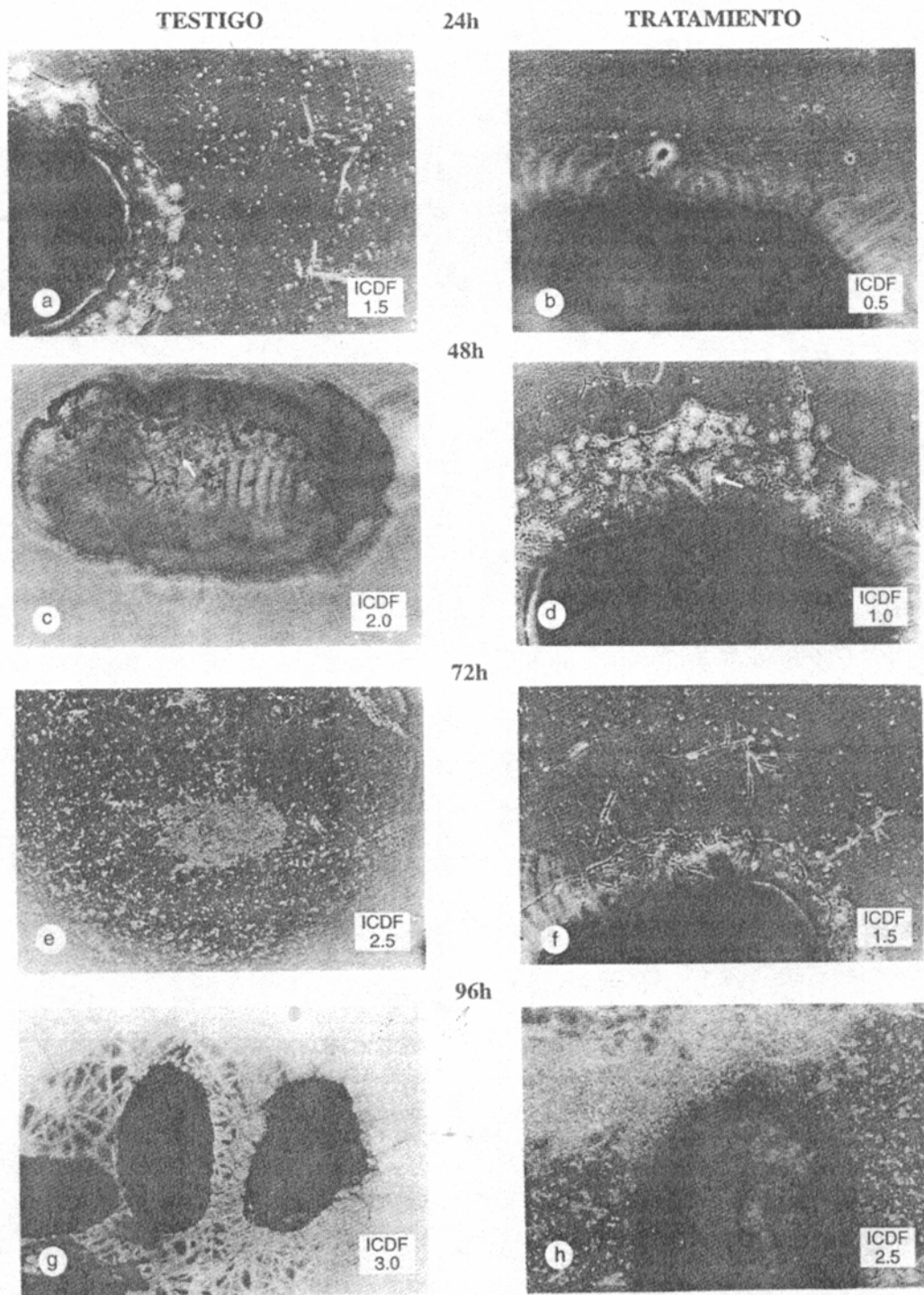
El efecto del fenpropatrin sobre la viabilidad de *V. lecanii* podría ser un indicador de sus repercusiones en campo sobre diversos hongos biorreguladores y la microbiota benéfica en general. Los resultados obtenidos con los dos métodos utilizados en este trabajo sugieren que las pruebas de compatibilidad de *V. lecanii* con agroquímicos sean llevadas a cabo en condiciones experimentales que simulen un tanque de aspersión. Debido a los resultados de las pruebas de viabilidad y al bioensayo, se recomienda la aplicación en campo del fenpropatrin, por separado y en momentos diferentes, evitando ser mezclados previamente hongo e insecticida en tanques de aspersión.

## Literatura citada

- Alves, S.B., A.M. Junior, S.A. Vieira, 1993. Ação toxica de alguns defensivos agrícolas sobre fungus entomopatógenicos. **Ecossistema** 18: 161-170.
- Anderson, T.E., D.W. Roberts, 1983. Compatibility of *Beauveria bassiana* isolates with insecticide formulations used in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) control. **J. Econ. Entomol.** 76: 1437-1441.
- Askary, H., N. Benhamou, J. Brodeur, 1999. Ultrastructural and cytochemical characterization of aphid invasion by the hyphomycete *Verticillium lecanii*. **J. Invertebr. Pathol.** 74: 1-13.
- Barberá, C., 1989. **Pesticidas agrícolas**. 4ta ed. Omega, Barcelona.
- Carrion, G., 1988. Estudio sobre el control biológico de la roya del café mediante *Verticillium lecanii* en México. **Mic. Neotrop. Aplic.** 1: 79-86.
- Carrion, G., F. Ruiz-Beltrán, R. Alarcón, 1990. Efecto del triadimifon y del oxalcloruro de cobre en el crecimiento *in vitro* de *Verticillium lecanii*. **Rev. Mex. Mic.** 6: 85-90.
- Charnley, A.K., 1989. Mechanisms of fungal pathogenesis in insects. In: J.M. Whipps & R.D. Lamden (eds). **The Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth**. Cambridge University Press, Londres, pp. 85-125.
- Gbewande, M.P., 1990. Biological control of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) rust (*Puccinia arachidis* Sp.) in India. **Trop. Pest Manage.** 36: 17-20.
- Goettel, M.S., T.J. Poprawski, J.D. Vanderberg, Z. Li, D.W. Roberts, 1990. Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. In: M. Laird, L.A. Lacey & E.W. Davidson (eds). **Safety of Microbial Insecticides**. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 209-231.
- Hassan, S.A., F. Bigler, H. Bogenschütz, E. Boller, J. Brun, J.N.M. Calis, J. Coremans-Pelseneer, C. Duso, A. Grove, U. Heimbach, N. Helyer, H. Hokkanen, G.B. Lewis, F. Mansour, I. Moreth, I. Polgar, L. Samsøe-Petersen, B. Sauphanor, A. Stäubli, G. Sterk, A. Vainio, M. van de Veire, G. Vagstad, H. Vogt, 1994. Results of the sixth joint pesticide testing programme of the IOBC/WPRS-Working Group "Pesticides and Beneficial Organisms". **Entomophaga** 39: 107-119.
- Landa, Z., L. Osborne, F. López, J. Eyal, 1994. A bioassay for determining pathogenicity of entomopathogenic fungi on whiteflies. **Biol. Control** 4: 341-350.
- Mier, T., F. Rivera, J.C. Bermúdez, Y. Domínguez, C. Benavides, M. Ulloa, 1991. Primer reporte en México del aislamiento de *Verticillium lecanii* a partir de la mosquita blanca y pruebas de patogenicidad *in vitro* sobre este insecto. **Rev. Mex. Mic.** 7: 149-156.
- Ortega, A., 1992. Mosquitas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) vectores de virus en hortalizas. In: R.S. Anaya, N. Bautista & B. Domínguez (eds.), **Manejo Fitosanitario de las Hortalizas en México**. Centro de Entomología y Acarología, Chapingo, México, pp. 20-40.
- Ravensberg, W.J., A.C. Van Buysen, R. Berns, 1994. Side-effects of pesticides on *Verticillium lecanii*: *in vivo* tests on whitefly and aphids. **Bulletin OILB-SROP** 17: 234-238.
- Restrepo, J., 1988. **Naturaleza muerta. Los plaguicidas en México**. Editorial Terra Nova, México.
- Saito, T., M. Yabuta, 1996. Laboratory studies on effect of pesticides on entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. **Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.** 40: 71-76.

Recibido: 6 de octubre de 1999. Aceptado: 2 de diciembre de 1999.

Solicitud de sobretiros: Dra. Teresa Mier.



**Fig. 1.** Prueba de patogenicidad para determinación del Índice de Crecimiento y Desarrollo Fúngico (ICDF) de conidios de *Verticillium lecanii*, expuestos al insecticida piretroide fenpropatrin durante 16 h, en ninfas del cuarto estadio de la mosquita blanca *Trialeurodes vaporariorum*. Las fotos de la columna izquierda corresponden al testigo sin insecticida, y las de la derecha al hongo con tratamiento, a las 24, 48, 72 y 96 h. (a) conidios germinados y no germinados, en la superficie de la ninfa: ICDF = 1.5 (85 x). (b) inicio de germinación de conidios, especialmente en el área cercana a la ninfa: ICDF = 0.5 (95 x). (c) hifas dentro de la ninfa: ICDF = 2.0 (90 x); las flechas indican hifas. (d) conidios germinados y no germinados e hifas alrededor de la ninfa: ICDF = 1.0 (90 x), flechas indican estructuras ninfales. (e) ninfa cubierta de micelio, inicio de la esporulación: ICDF = 2.5 (30 x). (f) conidios germinados y no germinados, en la superficie ninfal: ICDF = 1.5 (80 x). (g) ninfa cubierta por completo con micelio: ICDF = 3.0 (40 x). (h) ninfa cubierta de micelio, inicio de la esporulación: ICDF = 2.5 (80 x).



## Effect of the Insecticide Fenpropathrin on Exoenzyme Production in *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas

MARITZA GARCÍA-JUÁREZ<sup>1</sup>, CONCHITA TORIBLLO<sup>2</sup> AND TERESA MIER<sup>1\*</sup>

Depto. El Hombre y su Ambiente, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, 04960 México, D. F., México.<sup>1</sup>

Depto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D. F., México.<sup>2</sup>

\*Corresponding author: Tel. 54-83-72-26, FAX 54-83-74-69, E-mail: tmier@cueyatl.uam.mx

Studies on the collateral effects of chemical insecticides on entomopathogenic fungi have consisted mainly in the description of their effects on fungal growth and sporulation.<sup>1</sup> The pesticide's action on the enzymatic activity of fungi is a scarcely studied aspect. Considering that the virulence of these natural bioregulators of pests depends, to a great extent, on their ability to synthesize enzymes that degrade the cuticle of insects,<sup>2,8</sup> it is important to know the effect of chemical insecticides, widely used in agriculture, on the enzymatic activity of entomopathogenic fungi. This study was aimed at analyzing the effect of a pyrethroid insecticide, fenpropathrin, used for chemical control of the whitefly (Homoptera: Aleyrodidae), on the enzymatic activity of strain C of *Verticillium lecanii*, used as a bioinsecticide for the whitefly. This strain was isolated in Mexico, its virulence was demonstrated in the laboratory based on the 92% mortality on nymphs of *Trialeurodes vaporariorum* whitefly,<sup>5</sup> its safety tested by infectivity in mammals,<sup>6</sup> and its efficiency as a bioinsecticide was demonstrated in an open field bean crop, where it produced a mortality of 72.7 to 84.3% in different-stage nymphs of *T. vaporariorum* (Mier, personal communication).

Strain C of *V. lecanii* was preserved in H medium (0.5% dextrose, 1.0% saccharose, 0.5% yeast extract, 0.05% peptone, 1.5% agar) and also as a spore suspension in distilled water, both at 4°C, in the Microbiology Laboratory, Department El Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. A suspension of 10<sup>8</sup> conidia/ml was prepared from a *V. lecanii* culture (medium H), incubated for 12 days at 26°C, and used for all assays. For enzymatic determination, the fungus was grown in liquid culture in Gupta medium<sup>1</sup> (0.06% MgSO<sub>4</sub>, 0.05% NaCl, 1.5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.001% FeSO<sub>4</sub>, 0.001% ZnSO<sub>4</sub>, pH 6.0 and, supplemented with 1.0% gelatine, 1.0% glucose, 0.6% NO<sub>3</sub>Na) on a rotary shaker at 150 rpm and 26°C for 12 days. The liquid medium was supplemented with Herald 375 (fenpropathrin: (RS)- $\alpha$ -cyano-3-phenoxybenzyl-2,2,3,3-tetramethyl cyclopropanecarboxylate, equivalent to 375 g of a.i.A, Valent de México, S.A. de C.V.) at a final concentration of 0.2%. The supernatant was obtained by

centrifugation at 2000 g, 10 min. Exoenzymes were determined in the supernatant using the API ZYM test kit system (bioMérieux México, S.A.), a semi-quantitative micro-method designed for the research of enzymatic activities.<sup>3,7</sup> Briefly, test strips were inoculated with 65  $\mu$ l culture fluid in each well, and incubated for 4 h at 26°C. Enzyme activity was determined by color reactions after adding the API ZYM reagents A and B, and according to the sensitivity of the method indicated in the kit included color chart, where the approximate number of free nanomoles (nmol), may be known from the color strength: 1 corresponds to the liberation of 5 nmol, 2 to 10 nmol, 3 to 20 nmol, 4 to 30 nmol and 5 to 40 or more nmol. Results were compared with those obtained with the fungus incubated in the same culture conditions without insecticide (control). Assays were performed in triplicate and the experiment was performed on three separate occasions in order to investigate the reproducibility of the results.

All exoenzymes tested are depicted on Table 1, revealing inhibition of enzymatic activities when the fungus was incubated with fenpropathrin, in all the enzymes detected in the fungus. The highest color intensity detected in *V. lecanii* supernatant without insecticide (control) was for leucine arylamidase (protease) and N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase (chitinase). These two enzymes showed the greatest inhibition when the fungus was incubated with fenpropathrin. Results showed that *V. lecanii* contact with the pyrethroid influences protease and chitinase activities, enzymes involved on the degradation of the epicuticle of insects.<sup>2,8</sup> Furthermore, St. Leger<sup>8</sup> suggested that proteases initiate insect cuticle degradation, and recent studies of aphid invasion by *V. lecanii*<sup>2</sup> provided further evidence of chitinase activity during cuticle colonization by this fungus. Variations in pathogenicity of *V. lecanii* related, among other characteristics, to enzymatic activities evidence the probable repercussions of this chemical insecticide on natural bioregulators. This is the first report in Mexico on the effect of a chemical insecticide on the enzymatic activities of an entomopathogenic fungus.



Table 1. Effect of fenpropathrin on enzymatic activities of *Verticillium lecanii* strain C by the API ZYM test system.

|                                    |    |   |
|------------------------------------|----|---|
| Phosphatase alcaline               | 1  | 0 |
| Esterase                           | <1 | 0 |
| Esterase Lipase                    | <1 | 0 |
| Lipase                             | 0  | 0 |
| Leucine arylamidase                | 5  | 0 |
| Valine arylamidase                 | 1  | 0 |
| Cystine arylamidase                | <1 | 0 |
| Trypsin                            | 0  | 0 |
| $\alpha$ -Chymotrypsin             | 0  | 0 |
| Phosphatase acid                   | 3  | 0 |
| Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase    | 3  | 2 |
| $\alpha$ -galactosidase            | 2  | 0 |
| $\beta$ -galactosidase             | 3  | 0 |
| $\beta$ -glucuronidase             | 0  | 0 |
| $\alpha$ -glucosidase              | 3  | 0 |
| $\beta$ -glucosidase               | 3  | 0 |
| N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase | 5  | 0 |
| $\alpha$ -mannosidase              | 0  | 0 |
| $\alpha$ -fucosidase               | 0  | 0 |

<sup>1</sup>Nanomoles of the hydrolyzed substrate after a 4h incubation period at 26°C. Numerical values indicate the enzymatic activity as an increase in color intensity, according to manufacturer's scale.

## REFERENCES

- Alves, S. B., A. M. Junior y S. A. Vieira. 1993. Ação tóxica de alguns defensivos agrícolas sobre fungos entomopatogênicos. *Ecossistema* 18:161-170.
- Askary, H., N. Benhamou y J. Brodeur. 1999. Ultrastructural and cytochemical characterization of aphid invasion by the hyphomycete *Verticillium lecanii*. *J. Invertebr. Pathol.* 74:1-13.
- Bridge, P. D., M. A. J. Williams, C. Prior, y R. R. M. Paterson. 1993. Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *J. Gen. Microbiol.* 139:1163-1169.
- Gupta, S. C., T. D. Leathers, G. N. El-Sayed y C. M. Ignoffo. 1991. Production of degradative enzymes by *Metarhizium anisopliae* during growth on defined media and insect cuticle. *Exp. Mycol.* 15:310-315.
- Mier, T., F. Rivera, J. C. Bermúdez, Y. Domínguez, C. Benavides y M. Ulloa. 1991. Primer reporte en México del aislamiento de *Verticillium lecanii* a partir de la mosquita blanca y pruebas de patogenicidad *in vitro* sobre este insecto. *Rev. Mex. Mic.* 7:149-156.
- Mier, T., F. Rivera, M. P. Rodríguez-Ponce, J. Carrillo-Farga y C. Toriello. 1994. Infectividad del hongo entomopatogénico *Verticillium lecanii* en ratones y cobayos. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 36:107-111.
- Slots, J. 1981. Enzymatic characterization of some oral and nonoral Gram-negative bacteria with the API ZYM system. *J. Clin. Microbiol.* 14:288-294.
- St. Leger, R. J. 1995. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Can. J. Bot.* 73 (Suppl. 1): S119-S1125.
- St. Leger, R. J., A. K. Charnley y R. M. Cooper. 1986. Enzymatic characterization of entomopathogens with the API ZYM system. *J. Invertebr. Pathol.* 48:375-376.

## DISCUSIÓN

Los plaguicidas químicos son sustancias perjudiciales que sólo deben ser usados cuando sea necesario, aplicándolos en las dosis recomendadas y manejándolos como complemento de otras estrategias de control de plagas y no como alternativa (Mier *et al.*, 2004). Debido a lo anterior se hace necesario el estudio de la compatibilidad de hongos entomopatógenos con insecticidas para ser utilizados en programas de manejo integrado de plagas (Mier *et al.*, 1999).

En este estudio, mediante la aplicación de estudios fisiológicos y la prueba de ICDF descrita por Landa *et al.* (1994), recomendada para estudios de compatibilidad con agroquímicos y selección de cepas, se adicionó el insecticida piretroide Herald, que actualmente es empleado en el campo mexicano, para conocer su efecto en la viabilidad, velocidad de crecimiento radial, morfología, esporulación producción de enzimas y patogenicidad de *V. lecanii* para proporcionar las bases que nos permitan conocer el comportamiento del hongo en caso de ser aplicado en forma conjunta con el insecticida en programas de manejo integrado de plagas. Los valores del ICDF de la cepa C de *V. lecanii* en ninfas del cuarto estadio de *T. vaporariorum*, correspondieron a 3.0 a las 96 h para el testigo, en comparación con el índice de 2.03 a 2.63 reportado por Landa *et al.* (1994) para otra cepa del hongo. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio apoyan lo planteado por los autores respecto a la utilidad del ICDF en la selección de cepas con base a su virulencia. Asimismo esta prueba también nos permite evaluar la virulencia del hongo mediante la determinación de la tasa de crecimiento y el desarrollo fúngico sobre el insecto durante un periodo de observación desde las 24 a las 94 h.

Además, empleando la técnica del ICDF, coincidimos ampliamente con lo observado por Askary, Benhamou y Brodeur (1999) en lo que respecta a cada una de las fases de la infección micótica.

Un aspecto que hay que resaltar para estudiar el efecto de los insecticidas sobre *V. lecanii* es el de los métodos empleados, ya que existe tal diversidad en ellos, que la discusión de los resultados obtenidos por los investigadores se hace compleja; por ejemplo, hay autores que han utilizado medio sólido contaminado (Askary, Benhamou y Brodeur, 1999; Batista-Filho, Almeida y Lamas, 2001; Loureiro *et al.*, 2002; Mier *et al.*, 1999), círculos de las hojas asperjando el insecticida y los conidios (Ahmadi, Askary y Ashouri, 2004; Roditakis *et al.*, 2000), o la aplicación del insecticida y una suspensión conidial directamente en las plantas bajo condiciones de invernadero (Fournier y Brodeur, 2000; Ludwing y Oetting, 2001; Scholz-Dobelin y Stockmann, 2003). En los trabajos de Olmert y Kenneth (1974) se emplearon discos de papel con insecticida y midieron el halo de inhibición formado, en esta investigación se utilizó un medio contaminado y la incubación de los conidios con el insecticida, y los resultados obtenidos coinciden con Loureiro *et al.* (2002), quienes determinaron que el insecticida fenpropatrin en medio contaminado inhibe el

crecimiento del hongo, aunque Batista-Filho, Almeida y Lamas (2001) sugieren que para que los insecticidas sean compatibles con los hongos se apliquen en dosis subletales para la plaga y esto impide que cause daño al hongo. En nuestro estudio se sugiere que la aplicación del insecticida sea de manera independiente a la aplicación del hongo, ya que el fenpropatrin sí retrasa la infección micótica como se observó con el ICDF, el cual mostró un retraso de 24 horas en la infección con respecto al testigo.

La infectividad de *V. lecanii* ha sido probada contra escarabajos, áfidos, larvas de lepidópteros, homópteros, nemátodos y moscas blancas de invernaderos (Hall, 1989; Houle *et al.*, 1987; Landa *et al.*, 1994; Lezama y Mellin, 1991; Mier *et al.*, 1991; Meyer y Meyer, 1996; Puterka *et al.*, 1994; Yokomi y Gottwald, 1988), en los que se muestra un porcentaje de mortalidad, desde el 78% hasta un 100%; con dosis de  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  conidios  $\text{ml}^{-1}$  y un  $\text{TL}_{50}$  de 5 hasta 9 días según la plaga. Por ello varios autores afirman que *V. lecanii* puede tener un papel relevante en la regulación de las plagas a través de su aplicación en programas de control biológico. Con los resultados derivados de esta investigación se determinó que la patogenicidad de *V. lecanii* contra ninfas del 4º estadio de la mosquita blanca se abate en presencia del insecticida químico. La concentración de conidios ( $10^6 \text{ ml}^{-1}$ ), como el tiempo (5 días) para lograr el 50% de mortalidad, concuerda con los datos calculados para otras plagas por otros autores (Ahmadi, Askary y Ashouri, 2004; Fournier y Brodeur, 2000; Wang *et al.*, 2004).

La producción de enzimas que degradan la cutícula es una propiedad determinante relacionada con la patogenicidad de los hongos hacia los insectos. En *V. lecanii* se han identificado enzimas que trabajan secuencialmente: primero son producidas las esterasas y enzimas proteolíticas como endoproteasas, aminopeptidasas y carboxil-peptidasas durante las primeras 24 horas, seguidas por exoquitinasas (N-acetilglucosamidasa), endoquininasas y lipasas (Bidochka y Khachatourians, 1994; Liu *et al.*, 2003; St. Leger, 1995; St. Leger, Charnley y Cooper, 1986). En este trabajo, con el sistema de determinación semicuantitativa de enzimas API-ZYM, se logró detectar una elevada actividad de proteasas y quitinasas lo que es congruente con lo que se ha mencionado acerca de que la gran producción de proteasas de *V. lecanii* es la clave principal de su patogenicidad (St. Leger, Charnley y Cooper, 1986). La presencia del insecticida fenpropatrin (piretroide) disminuyó fuertemente la producción de las enzimas de *V. lecanii* consideradas clave para la infección tales como proteasas y quitinasas. Como se ha demostrado en estudios de degradación de la cutícula *in vitro*, actúan primero las proteasas y posteriormente las quitinasas, y en ausencia de proteasas no se lleva a cabo la degradación (St. Leger, Cooper y Charnley, 1986).

## CONCLUSIONES

En este trabajo se demuestra el efecto negativo del piretroide Herald fenpropatrin en diferentes propiedades fisiológicas, patogenicidad contra la mosquita blanca y actividad exoenzimática del hongo entomopatógeno *V. lecanii*. Ello sugiere que se deben evitar las mezclas directas del hongo con el piretroide en tanques de aspersión, aplicando por separado hongo e insecticida en el cultivo a tratar en programas de manejo integrado de plagas.



## ANEXO

### TRADUCCIÓN DE LOS OBJETIVOS, METODOLOGÍA Y PRINCIPALES RESULTADOS DEL ARTÍCULO:

García-Juárez, Martha, Conchita Toriello, Teresa Mier. 1999. Effect of the insecticide fenpropathrin on exoenzyme production in *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **41**: 215-216.

## EFFECTO DEL INSECTICIDA FENPROPATRIN EN LA PRODUCCIÓN DE EXOENZIMAS EN *Verticillium lecanii* (ZIMM.) VIÉGAS.

**OBJETIVO:** Analizar el efecto de un insecticida piretroide, fenpropatrin, usado para el control químico de la mosquita blanca (Homóptera:Aleyrodidae) en la actividad enzimática de la cepa C de *Verticillium lecanii*, usado como bioinsecticida contra la mosquita blanca.

**METODOLOGÍA:** La cepa C de *V. lecanii* fue preservada en medio H (0.5% dextrosa, 1.0% de extracto de levadura, 0.05% peptona, 1.5% agar) y también como suspensión de conidios en agua destilada, ambos a 4°C, en el laboratorio de Microbiología del Departamento del Hombre y su Ambiente de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Se preparó una suspensión de  $10^8$  conidios  $\text{ml}^{-1}$  del cultivo de *V. lecanii* (medio H), incubada por 12 días a 26°C y usada para todas las pruebas. Para la determinación enzimática, el hongo se cultivó en medio Gupta (0.06%  $\text{MgSO}_4$ , 0.05% NaCl, 1.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.001%  $\text{FeSO}_4$ , 0.001%  $\text{ZnSO}_4$ , pH 6.0 y suplementado con 1.0% gelatina, 1.0% glucosa, 0.6%  $\text{NO}_3\text{Na}$ ), en una incubadora de agitación orbital a 150 rpm y 26°C por 12 días. El medio líquido fue adicionado con Herald 375 (fenpropatrin: (RS)- $\alpha$ -ciano-3-fenoxibencil 2,2,3,3 tetrametil ciclopropancarboxilato, equivalente a 375 g a...i./l, Valent de México. S.A. de C.V.) a una concentración final de 0.2%. Se obtuvo el sobrenadante centrifugando a 2000 g, 10 min. Las exoenzimas del sobrenadante fueron determinadas usando la prueba de API ZYM (bioMérieux México, S.A.), un micrométodo semicuantitativo diseñado para determinar la actividad enzimática. Las galerías fueron inoculadas con 65  $\mu\text{mol}$  del sobrenadante e incubadas por 4 h a 26°C. La actividad enzimática fue determinada mediante el color de la reacción después de adicionar los reactivos A y B del API ZYM, de acuerdo a los colores dados por una tabla que contiene dicho sistema, los nanomoles de cada reacción corresponden a 1 = 5 nmol; 2 = 10 nmol; 3 = 20 nmol; 4 = 30 nmol; 5 = 40 nmol o más. Los resultados fueron comparados con los obtenidos con el hongo incubado sin insecticida en las mismas condiciones. Las pruebas fueron hechas por triplicado y repetidas en tres diferentes ocasiones.

**PRINCIPALES RESULTADOS:** La actividad de todas las exoenzimas probadas muestra una inhibición cuando el hongo fue incubado con fenpropatrin. La intensidad mayor detectada en el sobrenadante de *V. lecanii* sin insecticida (control) fue para leucina arilamidasa (proteasa) y N-acetil- $\beta$ -glucosamidasa (quitinasa). Los resultados muestran que el insecticida en contacto con *V. lecanii* interfiere con la actividad de la proteasa y quitinasa, enzimas involucradas en la degradación de la epicutícula de los insectos.

## BIBLIOGRAFIA

Ahmadi, L. B., Askary H., Ashouri A. 2004. Preliminary evaluation of the effectiveness of a *Verticillium lecanii* isolate in the control of *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae). *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* **69**(3): 29-36.

Ahmadzadeh, Z., Hatami B. 2003. Comparison of the effects of three insecticides and release of lacewing, *Crysoperla carnea* (Steh.), against nymphal stages of greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* West. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources* **7**(3): 225-234.

Alean, C., Morales R., Holguin A., Bellotti A. C. 2004. Pathogenicity of different fungal entomopathogens for the control of *Aleurotrachelus socialis* (Homoptera: Aleyrodidae) under greenhouse conditions. *Revista Colombiana de Entomología* **30** (1): 29:36.

Allan, I.J., House W. A., Parker A., Carter J. E. 2005. Diffusion of synthetic pyrethroid permethrin into bed-sediments. *Environmental Science & Technology* **39**(2): 523-530.

Askary, H., Benhamou N., Brodeur J. 1997. Ultrastructural and cytochemical investigations of the antagonistic effect of *Verticillium lecanii* on cucumber powdery mildew. *Phytopathology* **87**: 359-368.

Askary, H., Benhamou N., Brodeur J. 1999. Ultrastructural and cytochemical characterization of aphid invasion by the hyphomycete *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology* **74**(1): 1-13.

Barberá, C. 1989. Pesticidas agrícolas. Omega, Barcelona.

Barranco-Florido, J.E., Alatorre-Rosas R., Gutiérrez-Rojas M., Viniestra-González G., Saucedo-Castañeda G. 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology* **30**(7): 910-915.

Batista-Filho A., Almeida J. E. M., Lamas C. 2001. Effect of thiamethozam on entomopathogenic microorganisms. *Neotropical Entomology* **30**(3): 437-447.

Bidochka, M. J., Khachatourians G. G. 1994. Basic proteases of entomopathogenic fungi differ in their adsorption properties to insect cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* **64**: 26-32.

Carrión, G., Ruiz B., Alarcon R. 1990. Efecto del triadimefón y el oxiclóruo de cobre en el crecimiento *in vitro* de *Verticillium lecanii*. *Revista Mexicana de Micología* **6**: 85-90.



Ciscato C. H. P., Gebara A. B., Spinosa H. D. 2002. Pesticide residues in cow milk consumed in Sao Paulo City (Brazil). *Journal of Environmental Science and Health part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* **37**(4): 323-330.

Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. 1994. Catálogo oficial de Plaguicidas. SARH-SEDESOL-SSA-SECOFI, México D. F.

Deacon, J. W. 1990. Introducción a la micología moderna. Limusa-Noriega Editores. México D. F.

Doekes, G., Larsen P., Sigsgaard T., Baelum J. 2004. IgE sensitization to bacterial and fungal biopesticides in a cohort of Danish greenhouse workers: the BIOGART study. *American Journal of Industrial Medicine* **46**(4): 404-407.

Faria M., Wraight S. 2001. Biological control of *Bemisia Tabaci* with fungi. *Crop Protection* **20**(9): 767-778.

Fave, C., Guerineau C., Trotin-Caudal Y., Ravidat M. L. 2005. *Bemisia tabaci* in culture under greenhouse of tomato: a big attention be on the lookout. *Infos-Ctifl*. (211): 39-42.

Fournier, V., Brodeur J. 2000. Dose-response susceptibility of pest aphids (Homoptera: Aphididae) and their control on hydroponically grown lettuce with the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*, azadirachtin, and insecticidal soap. *Environmental Entomology* **29**(3) 568-578.

Ghewande, M. P. 1990. Biological control of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) rust (*Puccinia arachidis* Speg.) in India. *Tropical Pest Management* **36**: 17-20.

Ghosh, S. K., Laskar N., Basak S. N., Senapati S. K. 2004. Seasonal fluctuation of *Bemisia tabaci* Genn., on brinjal and field evaluation of some pesticides against *Bemisia tabaci* under Terai region of West Bengal. *Environmental And Ecology* **22**(4): 758-762.

González-Zamora, J. E., Leira D., Bellido M. J., Avila C. 2004. Evaluation of the effect of different insecticides on the survival and capacity of *Eretmocerus mudus* Mercet to control *Bemisia tabaci* (Gennadius) populations. *Crop Protection* **23**(7): 611-618.

Gottlich, E., van der Lubbe W., Lange B., Fiedler S., Melchert I., Reifenrath M., Flemming H. C., Hoog S. 2002. Fungal flora in groundwater-derived public drinking water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **205**(4): 269-279.

Hall, R. A. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphid and scales. En: Burges, H. D. (ed). Microbial control of pest and plant diseases. 1970-1980. Academic Press, Londres.

Hall, R. A. 1989. Pathogenicity of fungi and bioassay design. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro* **84**: Suppl. III 45-50.

Herrera, T., M. Ulloa. 1990. El reino de los hongos. Micología Básica Aplicada. UNAM-MFCE, México D. F.

Hassan, S. A., Bigler F., Bogenschutz H., Boller E., Brun J., Chiverton P., Eswards P., Mansour F., Naton E., Oomen P. A., Overmeer W. P. J., Polgar L., Rieckmann W., Samsoe-Petersen L., Stäubli A., Sterk G., Tavares K., Tuset J. J., Viggiani G., Vivas A. G. 1988. Results of the fourth joint pesticide testing programme carried out by the IOBC/WPRS-Working group "Pesticides and beneficial organisms". *Journal of Applied Entomology* **105**: 321-329.

Houle, C., Hartmann G. C., Wasti S. S. 1987. Infectivity of eight species of entomogenous fungi to the larvae of the elm bark beetle, *Scolytus mutistriatus* Marsham). *Journal of New York Entomology Society* **95**(1): 14-18.

Huffaker, C. B., Messenger P. S. 1976. Theory and practice of biological control. Academic Press, Nueva York.

Javed, M. A., Matthews G. A. 2002. Bioresidual and integrated pest management status of biorational agent and novel insecticide against whitefly and its key parasitoids. *International Journal of Pest Management* **48**(1): 13-17.

Jazzar, C., Hammad E. A. F.. 2004. Efficacy of multiple biocontrol agents against the sweet potato whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato. *Journal of Applied Entomology* **128**(2004): 188-194.

Kim, J. J., Kim K. Ch., Roberts D. W. 2005. Impact of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* on development of an aphid parasitoid, *Aphidius colemani*. *Journal of Invertebrate Pathology* **88**(3): 254-256.

Landa, Z., Osborne L., Lopez F., Eyal J. 1994. A bioassay for determining pathogenicity of entomogenous fungi on whiteflies. *Biological Control* **4**: 341-350.

Lenteren, van., 1992. Biological control in protected crops: Where do we go? *Pesticide Science* **36**: 321-327.

Lezama, G. R., Mellin R. 1991. Efectividad de *Metarhizium anisopliae*(Metsch.) Sor., *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil y *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viègas, (Deuteromicete: Hyphomicete) en el control del gusano del melón *Diaphania bialinata* (L.) (Lepidóptera: Pyralidae) en laboratorio. Memorias del XIV Congreso Nacional de Control Biológico, SARH-UAAAN, Saltillo.

Liu, B-L., Kao P-M, Tzeng Y-M., Feng K-Ch. 2003. Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* **33**(4): 410-415.

Loureiro, E. S., Moino A. Jr., Arnostia A., de Souza G. C. 2002. Effect of chemical products used in lettuce and chrysanthemum on entomopathogenic fungi. *Neotropical Entomology* **31**(2): 263-269.

Lourencao, A. L., Miranda M. A. C., Alves S. B. 2001. Epizootic occurrence of *Verticillium lecanii* on *Bemisia tabaci* B biotype (Hemiptera: Aleyrodidae) in the State of Maranhao, Brazil. *Neotropical Entomology* **30**(1): 183-185.

Ludwing S. W., Oetting R. D. 2001. Susceptibility of natural enemies to infection by *Beauveria bassiana* and impact of insecticides on *Ipheseius degenerans* (Atari: Phytoseiidae). *Journal of Agricultural Urban Entomology* **18**(3): 169-178.

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 1998. Brook. Biología de los microorganismos. Prentice Hall, Barcelona.

Meyer, S. L. F., Meyer R. J. 1996. Survival of the Nematode-antagonistic fungus *Verticillium lecanii* in alignate prills. *Nematologica* **42**: 111-123.

Mier, T., Castellanos M. J., García G. K., Ayala-Zermeño M. A., Fernández V. V., Toriello N. C. 2004. Valoración de hongos entomopatógenos para el control biológico de plagas agrícolas. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente* **5**(8): 57-67.

Mier, T. F., Rivera F., Bermúdez J. C., Domínguez Y., Benavides C., Ulloa M. 1991. Primer reporte en México del aislamiento de *Verticillium lecanii* a partir de la mosquita blanca y pruebas de patogenicidad *in vitro* sobre este insecto. *Revista Mexicana de Micología* **7**: 149-156.

Mier, T. F., Rivera F., Rodríguez-Ponce M. P., Carrillo-Fraga J., Toriello C. 1994. Infectividad del hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii* en ratones y cobayos. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **36**: 107-111.

Mier, T. F., Silva-Romero C., Méndez R. I., Ulloa M., Toriello C. 1999. Effect three insecticides used in México on whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) and a fungicide on the viability and morphology *in vitro* of *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **41** (1999): 217-222.

Novozhilov, K. V. 1988. Microbiological methods for biological control of pests of agricultural crops. Russian Translations Series No. 51. A. A. Balkema-Rotterdam.

Oehme, F. W., Pickrell J. A. 2003. Genetically engineered corn rootworm resistance: Potential for reduction of human health effects from pesticides. *Biomedical and Environmental Science* **16**(1): 17-28.

Olmert, I. R., Kennet G. 1974. Sensivity of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii* and *Verticillium* sp. to fungicides, and insecticides. *Environmental Entomology* **3**(1): 33-38.

Ortega-Ceseña, Espinosa-Torres J., López-Carrillo L. 1994. El control de los riesgos para la salud generados por los plaguicidas organofosforados en México: retos ante el Tratado de Libre Comercio. *Salud Pública México* **36**(6): 624-632.

Ortiz, S. R. 1999.

[www.monografias.com/trabajos14/losplaguicidas/losplaguicidas.shtml](http://www.monografias.com/trabajos14/losplaguicidas/losplaguicidas.shtml)

Osborne, L., Landa Z. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomology* **75**: 456-471.

Pimentel, D., Perkins J. H. 1980. Pest control: cultural and environmental aspects. AAAS. Selected Symposium Series No. 43 Westview Press. Inc. Colorado.

Puterka, G. J., Humber R. A., Poprawski T. J.. 1994. Virulence of fungal pathogens (Imperfect fungi: Hyphomycetes) to pear *Psylla* (Homoptera: Psyllidae). *Environmental Entomology* **23**(2):514-520.

Roditakis, E., Couzin I. D., Balrow K., Franks N. R., Charnley A. K. 2000. Improving secondary pick up of insect fungal pathogen conidia by manipulating host behaviour. *Annals of Applied Biological Biochemistry*. **137**(3): 329-335.

Sankar, C., Dahiya B., Singh S. P. 2005. Insect pests succession on cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., under Hisar (Haryana) agroclimatic conditions. *Haryana Agricultural University Journal of Research* **34**(1): 63-68.

Shaw, K. E., Davidson G., Clark S. J., Ball B. V., Pell J. K., Chandler D., Sunderland K. D. 2002. Laboratory bioassays to assess the pathogenicity of mitosporic fungi to *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasitic mite of the honeybee, *Apis mellifera*. *Biological Control* **24**(3): 266-276.

Scholz-Dobelin, H., Stockmann, S. 2003. Mycoinsecticides against whitefly *Trialeurodes vaporariorum* in tomatoe. *Gesunde Pflanzen* **55**(7): 210-214.

Stansly, P. A., Calvo F., Urbaneja A. 2004. Biological control of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleiroididae) in Protected tomato and pepper culture in Souther Spain. *Acta Horticulturae* **659**(1): 383-394.

St. Leger, R. 1995. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Canadian Journal of Botany* **73**(Suppl.1): S1119-S1125.

St. Leger, R., Charnley A. K., Cooper R. M. 1986. Enzymatic characterization of entomopathogens with the API ZYM system. *Journal of Invertebrate Pathology* **48**(1986): 375-376.

St. Leger, R., Cooper R. M., Charnley A. K. 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation *in vitro* by enzymes from entomopathogens. *Journal of Invertebrate Pathology* **47**: 167-177.

St. Leger, R., Joshi L, Roberts W. 1997. Adaptations of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology* **143**(1997): 1983-1992.

Sugimoto, M., Koike M., Hiyama N., Nagao H. 2003. Genetic, morphological and characterization of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology* **82**(3): 176-187.

Sugimoto, M., Koike M., Nagao H. 2001. Ribotyping of entomopathogenic *Verticillium lecanii* in Japan. *Phytoparasitica* **29**(5): 413-420.

Talbot, P. H. B. 1971. Principles of fungal taxonomy. Mc Millan Press, Londres.

Turusov, V., Rakitsky V., Tomatis L. 2002. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): Ubiquity, persistence and risks. *Environmental Health Perspectives* **110**(2): 125-128.

Ulloa, M., Herrera T. 1994. Entomología e iconografía de géneros de hongos. UNAM-Inst. Biol., México D. F.

Vale, G. A., Grant I. F., Dewhurst C. F., Aigreau D. 2004. Biological and chemical assays of pyrethroids in cattle dung. *Bulletin of Entomological Research* **94**(3): 273-282.

Valenzuela, L. 1987. Microorganismos entomopatógenos. Su aprovechamiento en el control de insectos. UACH-Chapingo.

Vidal, C., Fargues J., Rougier M., Smits N. 2003. Effect of humidity on infection potential of Hyphomycetous fungi as mycoinsecticides for *Trialeurodes vaporariorum*. *Biocontrol Science and Technology* **13**(2003): 183-198.

Wang, L., Huang J., You M., Liu B. 2004. Time-dose—mortality modeling and virulence indices for six strains of *Verticillium lecanii* against sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Journal of Applied Entomology* **128**(7): 494-500.

Yarkulov, F. 2002. Greenhouse whitefly in far East. *Zashchita i Karantin Rastenii* (9): 23-24.

Yokomi, R. K., Gottwald T. R. 1988. Virulence of *Verticillium lecanii* isolates on aphids determined by detached-leaf bioassay. *Journal of Invertebrate Pathology* **51**: 250-258.

Yúfera, E. P., Carrasco D. J. M. 1980. Química agrícola. Vol II. Alhambra, Madrid.

Zare, R., Gams W. 2001. A revision of *Verticillium* sct. *Prostrata*. I. Phylogenetic studies using ITS sequences. *Nova Hedwigia* **71**:465-480.

