



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* DE *Trialeurodes vaporariorum* (HOMOPTERA: ALEYRODIDAE) Y *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: LIVIIDAE) AL HONGO *Stagonospora* sp.

PEDRO HERNÁNDEZ LÓPEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2017

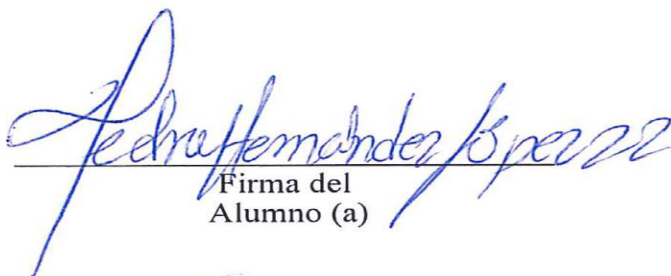
CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

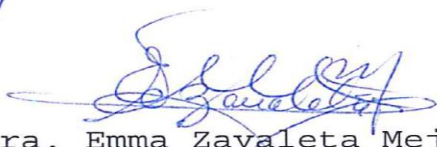
En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Pedro Hernández López, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dra. Emma Zavaleta Mejía, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis

Susceptibilidad in vitro de *Trialeurodes vaporariorum* (HOMÓPTERA: ALEYRODIDAE) y *Diaphorina citri* (HEMÍPTERA: LIVIIDAE) al hongo *Stagonospora* sp.

y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 17 de 07 de 2017


Firma del
Alumno (a)


Dra. Emma Zavaleta Mejía
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* DE *Trialeurodes vaporariorum* (HOMOPTERA: ALEYRODIDAE) Y *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: LIVIIDAE) AL HONGO *Stagonospora* sp** realizada por el alumno: **PEDRO HERNÁNDEZ LÓPEZ**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

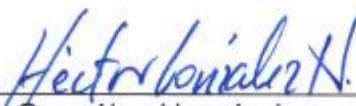
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



Dra. Emma Zavaleta Mejía

ASESOR



Dr. Héctor González Hernández

ASESORA



M.C. Victoria Ayala Escobar

Montecillo, Texcoco, Estado de México, noviembre de 2017

SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* DE *Trialeurodes vaporariorum* (HOMOPTERA: ALEYRODIDAE) Y *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: LIVIIDAE) AL HONGO *Stagonospora* sp.

Pedro Hernández López, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

El presente trabajo se realizó para conocer la susceptibilidad *in vitro*, de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* y del psílido *Diaphorina citri* a *Stagonospora* sp (S) (= *Saccharicola* sp.) y al hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii* (LI). Se aplicaron 1×10^8 -conidios (LI) o fragmentos de hifa (S) sobre ninfas de segundo (N2) y cuarto instar (N4) en el caso de mosca blanca y sobre adultos en el psílido, y se registró el porcentaje de mortalidad. Para *Stagonospora* sp se registró una mortalidad del 58.5% en las ninfas N2 y de 26% en las N4, coincidiendo con lo reportado por la mayoría de autores quienes señalan que los primeros estados ninfales de cualquier plaga son los más susceptibles a hongos entomopatógenos; en cambio *L. lecanii* causó una mortalidad del 42% en ambos estadíos. Para el psílido asiático de los cítricos, *L. lecanii* causó el 94 % de mortalidad de los adultos inoculados; mientras que con *Stagonospora* sp solamente el 8% de los adultos murieron.

Palabras clave: control biológico, ninfas, *Lecanicillium lecanii*, propágulos, entomopatógeno.

IN VITRO SUSCEPTIBILITY OF *Trialeurodes vaporariorum* (HOMÓPTERA: ALEYRODIDAE) AND *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: LIVIIDAE) TO FUNGUS *Stagonospora* sp.

Pedro Hernández López, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

The present work was carried out to know the *in vitro* susceptibility, of the whitefly *Trialeurodes vaporariorum* and the psyllid *Diaphorina citri* to *Stagonospora* sp (S) (= *Saccharicola* sp.) and the entomopathogenic fungus *Lecanicillium lecanii* (LI). 1×10^8 conidia (LI) or hypha fragments (S) were applied over nymphs of second (N2) and fourth instar (N4) in the case of whitefly and over adults in the psyllid, and the mortality rate was recorded. For *Stagonospora* sp a mortality of 58.5% in N2 nymphs and 26% in N4 was registered, coinciding with that reported by most of authors who indicate that the first nymphal states of any pest are the most susceptible to entomopathogenic fungi; whereas *L. lecanii* caused a mortality of 42% in both stages. In the case of the Asian citrus psyllid, *L. lecanii* caused 94% of the mortality of the adults of *D. citri*; in contrast, *Stagonospora* sp only caused 8% of mortality.

Key words: biological control, nymphs, *Lecanicillium lecanii*, propagules, entomopathogen.

DEDICATORIA

A mi madre Marcela López Gerónimo por ser el magnífico pilar afectivo y emocional de la familia. Por tu valentía y apoyo incondicional, haces que mi vida sea mejor; tenga sentido y propósito. Faltan las palabras para expresarte todo mi amor, agradecimiento y devoción.

Muchas maravillas hay en el universo; pero la obra maestra de la creación es el corazón materno....Ernest Berson

A mi padre Martín Hernández Nolasco por cada uno de tus sacrificios y esfuerzos muchos de ellos secretos pero todos encaminados al bienestar de los que quieres. Por tu fortaleza y gran capacidad de afrontar los retos de la vida. Eres un hombre digno de admiración.

Un padre vale por cien maestros.....George Herbert

“DULCE ES EL FRUTO DE LA ADVERSIDAD QUE, COMO EL SAPO FEO Y VENENOSO, LLEVA EN LA CABEZA UNA PRECIOSA JOYA”

William Shakespeare

AGRADECIMIENTOS

A los mexicanos a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme la beca para la realización de mis estudios.

Al Colegio de Postgraduados y al Instituto de Fitosanidad por recibirme y contribuir sustancialmente a mi desarrollo como profesional. A cada uno de sus profesores por su disposición para la enseñanza, el esfuerzo y compromiso en la formación de investigadores.

A la Dra. Emma Zavaleta Mejía por su paciencia, por ser una consejera y guía fundamental para la culminación de este documento. Más allá de la admiración y reconocimiento de su trayectoria profesional como investigadora y su enorme papel en la transmisión del conocimiento; personalmente agradezco su calidad humana, su sabiduría y ecuanimidad; por ver más allá de lo fácilmente perceptible.

Al Dr. Héctor González Hernández por sus invaluable consejos y aportaciones. Por siempre estar dispuesto a brindar su apoyo y transmitir sus conocimientos y experiencia.

A la Dra. Laura Delia Ortega Arenas por su valioso e inmejorable apoyo en la identificación de la mosca blanca *T. vaporariorum* así como por la provisión de ninfas y adultos de *D. citri*. Agradezco enormemente su apoyo.

A la M.C. Victoria Ayala Escobar por compartir sus conocimientos y contribuir con la presente investigación, por hacer manifiesto su interés mediante su ayuda. Por su vasta experiencia.

Al Dr. Remigio Guzmán Plazola por las facilidades otorgadas en la utilización del invernadero para la cría y mantenimiento de insectos y por sus valiosos consejos.

Al Dr. Ariel Wilbert Guzmán Franco por facilitarme los aislamientos de *L. lecanii* ARSEF974 (aislado de áfidos) y ARSEF2009 (aislado de *Toxoptera citricida*). Su apoyo fue fundamental.

Al M.C. Jorge M. Valdez Carrasco por su valioso magnífico apoyo en el procesamiento de imágenes. Gracias por su paciencia y dedicación.

A mi amiga Luvia Marlén Pintado López simple y sencillamente por ser y estar. Agradezco tu amistad y esencial apoyo en los momentos más difíciles que me tocó sortear y de los cuales en gran medida tú formaste parte; agradezco a la vida por tenerte a mi lado en esos momentos porque en amistad, todos los pensamientos, todos los deseos, todas las esperanzas nacen y se comparten en espontánea alegría. Prioritariamente, eres una de las mejores cosas que me pudo haber pasado durante mis estudios de maestría. Conocerme ha sido un singular regalo.

A mi hermana Saira Hernández López por ser y estar, simple y sencillamente porque eres un ser maravilloso.

A Martha Fabiola Alarcón Alavéz por tu amistad de tantos años, por encontrarnos y reencontrarnos más de una vez y de algún modo crecer juntos.

A la profesora Clelia Moreno Zárate por su espléndido y desinteresado apoyo, un hecho vale más que mil palabras y usted es un claro ejemplo de ello. Gracias por confiar en mí.

A todos los que de manera indirecta a través de una frase de aliento, un sentimiento o pensamiento contribuyeron a que las cosas fueran más llevaderas. A los que creen en mí y me brindan una oportunidad y no se decepcionan a la menor falta, error o fallo.

GRACIAS.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
SUSCEPTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE <i>Trialeurodes vaporariorum</i> (HOMOPTERA: ALEYRODIDAE) Y <i>Diaphorina citri</i> (HEMIPTERA: LIVIIDAE) AL HONGO <i>Stagonospora</i> sp.	1
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Mosca blanca <i>T. vaporariorum</i>	3
2.2. Morfología de las etapas de desarrollo ninfales de <i>T. vaporariorum</i>	4
2.3. Psílido <i>Diaphorina citri</i>	5
2.4. Utilización de microorganismos como agentes de control biológico	6
2.5. Hongos entomopatógenos como componente del MIP	7
2.6. Proceso infeccioso de hongos entomopatógenos	8
2.7. Uso de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico en aleuródidos.	9
2.8. <i>Stagonospora</i> sp (Hawksw & O.E. Erikss) (= <i>Saccharicola</i> sp)	10
2.9. Descripción morfológica de <i>Stagonospora</i> sp (= <i>Saccharicola</i> sp.)	12
2.10. Potencial biológico de <i>Stagonospora</i> sp (= <i>Saccharicola</i> sp.)	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Cría de mosca blanca y del psílido <i>D. citri</i>	13
3.2. Obtención de ninfas de <i>T. vaporariorum</i>	15
3.3. Identificación morfológica de la especie <i>T. vaporariorum</i> con base a las características físicas de la pupa.	15
3.4. Cultivo de <i>Stagonospora</i> sp (<i>Saccharicola</i> sp)	16
3.5. Cultivo monospórico de <i>L. lecanii</i>	17

3.6 Preparación del inóculo de <i>Stagonospora</i> sp y de <i>L. lecanii</i>	18
3.7. Pruebas de patogenicidad sobre ninfas de mosca blanca.....	18
3.8. Pruebas de patogenicidad sobre adultos de <i>D. citri</i>	19
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Pruebas de patogenicidad sobre ninfas de mosca blanca.....	22
4.2. Pruebas de patogenicidad sobre adultos de <i>D. citri</i>	26
5. DISCUSIÓN.....	28
6. CONCLUSIONES.....	31
7. LITERATURA CITADA.....	32

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Organismos benéficos disponibles comercialmente en todo el mundo para el control biológico de plagas en agricultura protegida.	7
Cuadro 2. Tratamientos para las pruebas de patogenicidad de los hongos <i>Stagonospora</i> sp (S) y <i>Lecanicillium lecanii</i> (LI) contra ninfas del 2° y 4° instar de <i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Tv).....	19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mantenimiento de colonias de mosca blanca en invernadero en plantas de frijol..	14
Figura 2. Incremento de población insectil de <i>T. vaporariorum</i>	14
Figura 3. Disposición de jaulas tipo clip sobre el envés de hojas de plantas de frijol....	15
Figura 4. Características estructurales de <i>Stagonospora</i> sp.....	17
Figura 5. Dispositivo diseñado para la incubación de brotes de <i>M. paniculata</i> infestados con adultos de <i>D. citri</i> .	20
Figura 6. Vista ventral de ninfas de cuarto instar con características morfológicas distintivas de la especie <i>T. vaporariorum</i> .	22
Figura 7. Número de ninfas de segundo y cuarto instar de mosca blanca (<i>T. vaporariorum</i>) infectadas y colonizadas por los hongos <i>Stagonospora</i> sp (S) y <i>L. lecanii</i> .	23
Figura 8. Número total de ninfas de <i>T. vaporariorum</i> infectadas y colonizadas por los hongos <i>Stagonospora</i> sp y <i>L. lecanii</i> a través del tiempo en cada tratamiento.	24
Figura 9. Desarrollo de la infección con características típicas de parasitismo fúngico en ninfas infectadas por <i>L. lecanii</i> (LI) y <i>Stagonospora</i> sp.	25
Figura 10. Número de adultos de <i>D. citri</i> infectados y colonizados 10 días después de ser tratados con suspensiones de los hongos <i>Stagonospora</i> sp.	26
Figura 11. Adultos del psílido <i>D. citri</i> completamente momificados por <i>Lecanicillium lecanii</i> bajo condiciones controladas.	27

SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* DE *Trialeurodes vaporariorum* (HOMOPTERA: ALEYRODIDAE) Y *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: LIVIIDAE) AL HONGO *Stagonospora* sp.

1. INTRODUCCIÓN

En la década de los años 80s y 90s del siglo pasado las moscas blancas (Homóptera: Aleyrodidae), llamaron la atención como plaga agrícola por las pérdidas económicas debido a los daños directos por la succión de savia y a los daños indirectos por la transmisión de enfermedades de origen viral (Macías *et al.*, 2012). *Trialeurodes vaporariorum* transmite virus del género crinivirus en forma semipersistente (Wintermantel, 2004).

En años recientes, el psílido asiático de los cítricos (PAC) *Diaphorina citri*, se ha reconocido como una plaga importante por el daño directo que ocasiona y por ser el vector de la enfermedad dragón amarillo (Huanglongbing, HLB, por sus siglas en inglés) (Hernández *et al.*, 2013). El insecto se alimenta de la savia de especies silvestres y cultivadas de cítricos (Aubert, 1987), provocando daños en los brotes tiernos y en fuertes infestaciones causa la caída de follaje y flores (Rogers y Stansly, 2006).

El control de estas plagas agrícolas se realiza principalmente mediante la aplicación de plaguicidas; sin embargo, esta medida tiene un éxito limitado debido a que solo reducen la población de adultos pero no afectan los huevos y estados inmaduros (Laska, 1982; Tiwari *et al.*, 2011). Esto permite que los adultos alcancen una alta densidad en pocos días y que la incidencia de plantas enfermas aumente progresivamente (Morales *et al.*, 2006; Quesada *et al.*, 2006). Una alternativa a los plaguicidas químicos, es el uso de microorganismos patógenos de insectos (entomopatógenos) y parasitoides como un componente primordial en los sistemas de MIP (Huffaker, 1985). Las enfermedades causadas por los hongos en insectos son muy comunes y ampliamente distribuidas; a menudo ocasionan una alta reducción en poblaciones de insectos en forma de epizootias espectaculares. Los entomopatógenos reportados para mosca blanca se restringen exclusivamente a hongos (Van Lenteren *et al.*, 1996) por sus mecanismos de acción únicos que les permiten atravesar de forma directa la cutícula (Fransen, 1990; Charnley

y Collins, 2007). Siendo las especies *Isaria fumosorosea* y *Lecanicillium lecanii* las más ampliamente utilizadas para su control.

El principal agente de control biológico del PAC que ha sido ampliamente estudiado, es el ectoparasitoide idiobionte *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae). En México, se han aislado, caracterizado y probado experimentalmente cepas de hongos que se encuentran regulando de forma natural al PAC, como *I. fumosorosea* y *H. citriformis* (Subandiyah *et al.*, 2000); *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* son otras especies de hongos comúnmente utilizadas en el manejo de plagas agrícolas.

El hongo *Stagonospora* sp (= *Saccharicola* sp.) produce metabolitos secundarios denominados “poliquétidos” (Chapla *et al.*, 2012), que poseen actividad antibiótica, anticolesterémica, inmunosupresora y anticancerígena (Kwan y Schulz, 2011; Rojas *et al.*, 2011). Además actúa como antagonista de hongos fitopatógenos, su efecto se ha probado contra *Fusarium* spp., *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *Microbotryum violaceum* (Chapla *et al.*, 2012), *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* (Uc-Argüelles *et al.*, 2017). En laboratorio también se observó que este hongo penetraba y parasitaba adultos y huevecillos de ácaros (Manuel Silva Valenzuela comunicación personal). Con base en estos antecedentes se consideró relevante investigar qué potencial tiene el hongo *Stagonospora* sp como patógeno de la mosca blanca *T. vaporariorum* y del psílido *D. citri*, en condiciones *in vitro*, en comparación con *L. lecanii*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Mosca blanca *T. vaporariorum*

Las moscas blancas son pequeños insectos fitófagos de plantas herbáceas, arbustos, árboles, plantas silvestres y cultivos de importancia económica; en ocasiones se convierten en un serio problema, debido en primera instancia a daños directos provocados al succionar la savia y por la transmisión de virus fitopatógenos (Carapia y Castillo-Gutiérrez, 2013). Los adultos y ninfas de mosca blanca utilizan su aparato bucal perforador-chupador para alimentarse del floema de las plantas hospedantes. Esto resulta en un daño directo, con presencia de manchas localizadas, amarillamiento, o defoliación. Bajo presiones de alimentación elevada puede ocurrir una reducción del crecimiento y marchitez severa.

Las moscas blancas también secretan grandes cantidades de gotas de miel que recubren las hojas de la planta con material pegajoso. Esta secreción azucarada proporciona un sustrato para el crecimiento de hongos del tipo fumagina, un complejo de especies de hongo que interfiere con la fotosíntesis y transpiración de las plantas (Mellor *et al.*, 1997; Hamdi *et al.*, 2011).

Las moscas blancas son un grupo sumamente polífago; sin embargo, muestran preferencia por ciertas plantas hospedantes donde desarrollan su mayor potencial biótico (Bonato *et al.*, 2007). Estos insectos reconocen a las plantas hospedantes a través de estímulos visuales, olfativos, gustativos y táctiles (Van Lenteren y Noldus, 1990), y la percepción de los compuestos químicos de la planta les permiten identificar su ubicación, disponibilidad y calidad (Singer, 2000). La preferencia que las hembras tienen por las plantas para su alimentación y ovoposición está determinada por la calidad y cantidad de nutrientes, compuestos volátiles, metabolitos secundarios, fenología, dureza de los tejidos y defensas mecánicas (Costa *et al.*, 2009). La mosca blanca *T. vaporariorum*, es una plaga importante de cultivos en invernadero, es vector del virus pseudoamarillo de la remolacha (BPYV), el virus de la palidosis de la fresa (SPaV), el virus del amarillamiento infeccioso del tomate (TICV), y el virus de la clorosis del tomate (ToCV), entre otros (Wintermantel, 2004). Se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, incluyendo la mayoría de las regiones templadas de Norteamérica, Sudamérica, Europa,

Asia Central e India, Norte y Este de África, Nueva Zelanda y Sur de Australia. El origen de esta especie no está claro aún pero se piensa que es originaria de México o Suroeste de Estados Unidos de Norteamérica (Capinera, 2008).

Se tienen más de 300 especies de plantas hospedantes registradas. Las plantas preferidas por la mosca blanca de los invernaderos son frijol, melón, calabacita, lechuga, jitomate, berenjena, y ocasionalmente se encuentra infestando plantas de repollo, camote, chile y papa. Entre los vegetales de invernadero, los hospedantes más comunes son jitomate, berenjena y calabacita. Asimismo, muchas plantas ornamentales son hospedantes de esta plaga, entre ellos el aster, crisantemo, gardenia, gerbera, nochebuena, salvia y verbena (Landa *et al.*, 1994; Capinera, 2008). La dispersión de esta plaga es favorecida por el movimiento extensivo a través del comercio de plantas y otras partes vegetativas (Ellsworth y Martínez-Carrillo, 2001).

2.2. Morfología de las etapas de desarrollo ninfales de *T. vaporariorum*

Primer estadio larval (N1): mide 240- 270 μm de largo y 150 μm de ancho, es activo y se desplaza en busca de un lugar adecuado para la alimentación por lo que sus patas y sus antenas son relativamente grandes; presentan 17 pares de sedas marginales muy aparentes; seda marginal anterior, marginal posterior, cefálica, primera abdominal, octava abdominal y caudal presentes; tubérculos cefálicos bien desarrollados, semirectangulares abiertos hacia la parte media; y orificio vasiforme cuadrangular ubicado en la parte posterior (Morales y Jones, 2004; Cardona *et al.*, 2005; Carapia y Castillo, 2013).

Segundo estado larval (N2): mide 420 μm de largo y 330 μm de ancho, su cuerpo es redondeado, no agudo posteriormente; sedas marginal anterior, marginal posterior, cefálica, primera abdominal, octava abdominal y caudal presentes; seda dorsal del segmento cefálico bien desarrollada; pliegues torácicos traqueales no indicados ventralmente; orificio vasiforme semicordiforme; y llingula con dos lóbulos laterales (Morales y Jones, 2004; Cardona *et al.*, 2005; Carapia y Castillo, 2013).

Tercer estado larval (N3): mide 560-600 μm de largo y 400 μm de ancho; el margen del cuerpo es uniformemente granulado; pliegue torácico traqueal no indicado ventralmente;

sedas marginales anteriores, marginales posteriores, cefálicas, primera abdominal, octava abdominal y caudal presentes. Orificio vasiforme semicordiforme con una muesca en la parte media posterior a la llingula, llingula lobulada lateralmente y con dos pares de lóbulos (Morales y Jones, 2004; Cardona *et al.*, 2005; Carapia y Castillo, 2013).

Cuarto estadio larval y pupario (N4): mide 780-800 μm de largo y 510 μm de ancho. Pupas vivas con la superficie dorsal elevada por la palizada de la superficie ventral, la cual está sobre la superficie de la hoja; superficie dorsal con cubierta y varillas de cera blanquecina; área submarginal con filamentos cortos de cera; superficie ventral y lateral con cubierta de cera. Los especímenes son de forma elíptica, redondeados en su parte posterior; papilas dorsales y submarginales presentes; margen uniformemente granuloso; área porosa traqueal torácica y caudal se diferencian distintivamente en el margen; antenas situadas lateralmente de las patas protorácicas, sedas marginal anterior, marginal posterior, cefálica, primera abdominal, octava abdominal y caudal presentes; pliegue torácico traqueal no indicado ventralmente; orificio vasiforme semicordiforme; y llingula lobulada (Morales y Jones, 2004; Cardona *et al.*, 2005; Carapia y Castillo, 2013).

2.3. Psílido *Diaphorina citri*

El psílido asiático de los cítricos (PAC), *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Liviidae) es una de las plagas más importantes en la mayor parte de las zonas citrícolas del mundo debido a que es vector de la enfermedad más perjudicial de los cítricos, el Huanglongbing (HLB), también conocida como citrus greening (Bouvet *et al.*, 2014) y en México como dragón amarillo.

El ciclo de vida de este insecto abarca la etapa de huevecillo, cinco instares ninfales y el estado adulto. Los adultos son insectos chupadores que miden entre 3 mm a 4 mm de longitud, cuerpo de color pardo, alas cerosas con manchas pardas dejando un área central clara y ojos rojos. Los machos son más pequeños que las hembras y con la punta del abdomen roma (Fernández *et al.*, 2005), mientras que la hembra posee un abdomen con la punta bien marcada. Se les encuentra posados en hojas tiernas y maduras, con la parte superior del cuerpo hacia arriba y con el estilete insertado en el tejido. Tienen preferencia por el envés de las hojas (Graftón *et al.*, 2010) pero cuando las infestaciones

son altas pueden encontrarse tanto en el haz como en el envés. Cuando son molestados saltan y se desplazan a distancias cortas (Hall y Albrigo, 2010).

El insecto durante su alimentación extrae grandes cantidades de savia y produce abundante miel de rocío que cubre la superficie de la hoja y sirve de sustrato para el crecimiento de hongos productores de fumagina. Durante su alimentación inyectan toxinas a la planta que detienen el crecimiento de los brotes y deforman las hojas (Michaud, 2004). Una sola ninfa alimentándose por menos de 24 h es capaz de provocar una malformación de la hoja tanto joven como madura. Con frecuencia las infestaciones iniciales del psílido ocurren localizadas en determinados árboles cítricos. Los árboles maduros suelen tolerar los daños, debido a que la pérdida de hojas es mínima si se le compara con el tamaño de la copa.

El principal daño causado por *D. citri* es producto de su habilidad para transmitir eficientemente la bacteria llamada *Candidatus Liberibacter asiaticus*, que causa la enfermedad conocida como Huanglongbing. El psílido puede transmitir el patógeno con una eficiencia de sólo el 1%, asignándose este rol a las ninfas de cuarto y quinto instar y a los adultos, quienes adquieren a la bacteria patógena después de haberse alimentado de una planta enferma durante 30 min o más (Alemán *et al.*, 2007), entonces el patógeno permanece latente en el interior del insecto entre 3 y 20 días, momento en que se le puede detectar en las glándulas salivares (Huang *et al.*, 1984). Una vez que el insecto adquiere al patógeno, es capaz de transmitirlo durante toda su vida, sin embargo no puede pasar a la progenie a través de los huevos.

2.4. Utilización de microorganismos como agentes de control biológico

Desde finales de los años 1940s el control de plagas se ha basado principalmente en insecticidas químicos, pero la aparición de resistencia en muchas especies de insectos, ha incentivado el estudio del manejo integrado de plagas, en el cual el control biológico puede jugar un papel significativo (Scorsetti *et al.*, 2008).

Algunos microorganismos han sido utilizados para el control biológico de insectos y enfermedades de plantas desde principios del siglo XX, demostrándose recientemente las ventajas de su uso frente al manejo de insecticidas químicos, ya que éstos generan

graves problemas como daños al ecosistema y afectación a la salud humana, entre otros (Franco *et al.*, 2011). Los principales grupos de microorganismos utilizados para el control biológico de plagas son los virus, bacterias y hongos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Organismos benéficos disponibles comercialmente en todo el mundo para el control biológico de plagas en agricultura protegida.

ENEMIGO NATURAL	INSECTO QUE CONTROLA
Bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i>	Lepidópteros, dípteros.
Hongos <i>Beauveria bassiana</i> <i>Isaria fumosorosea</i> <i>Lecanicillium lecanii</i>	Mosquitas blancas, áfidos mosquitas blancas, áfidos, trips áfidos, mosquitas blancas
Virus NPV (virus de la polihedrosis nuclear)	<i>Spodoptera frugiperda</i>

Fuente: Enkeegard y Broodsgaard (2006).

2.5. Hongos entomopatógenos como componente del MIP

Se han descrito más de 70 000 especies de hongos y más de 800 000 especies de insectos. Se estima que existen más de 700 especies, incluyendo subespecies, patotipos y cepas de hongos como agentes de control de plagas insectiles (Roberts y Humber, 1981; Bielikova *et al.*, 2002). Las especies más estudiadas y utilizadas como agentes de control biológico en el mundo corresponden a *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium lecanii* y *Beauveria bassiana* (López y Börge, 2001). Recientemente se han descubierto funciones adicionales de muchos hongos entomopatógenos; desempeñándose además como endófitos de plantas (*Acremonium*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Clonostachys* e *Isaria*), antagonistas de fitopatógenos (*Beauveria bassiana* y *Lecanicillium* spp) y como microorganismos asociados a la rizósfera-promotores del crecimiento (*Metarhizium*, *Beauveria* e *Isaria*) (Vega *et al.*, 2009), lo cual les confiere un importante protagonismo biológico.

Los patógenos de *T. vaporariorum* son principalmente hongos (Capinera, 2008). Más de 20 diferentes especies de hongos se han reportado en todo el mundo infectando y causando epizootias en moscas blancas. Estos incluyen *Aschersonia aleyrodís*, *A.*

andropogonis, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium lecanii*, *Conidiobolus* spp, *Entomophthora* sp, *Zoopthora radicans* e *Isaria farinosa* (Faria y Wraight, 2001). Asimismo, más de 170 productos han sido desarrollados en todo el mundo basados en al menos 12 especies de hongos entomopatógenos (Jun y Chin, 2008).

En México, el uso de hongos entomopatógenos no está generalizado, aunque el empleo de dichos microorganismos para el combate de plagas se inició desde hace 60 años, con un incremento significativo a partir de 1990. Comercialmente se encuentran disponibles en nuestro país productos como BEA-SIN[®], PAE-SIN[®], META-SIN[®] y VERTA-SIN[®]. Las formulaciones tienen como principio activo conidios y lo único en que varían es el vehículo inerte que protege a la espora de los efectos de los rayos ultravioleta y mantiene la humedad requerida (Torres, 2007).

2.6. Proceso infectivo de hongos entomopatógenos

El mecanismo de patogenicidad de los hongos entomopatógenos ha sido intensamente estudiado y se conocen las etapas principales del proceso infectivo, lo que ha permitido poder establecer estrategias para mejorar su aplicación como control biológico (Srivastava, 2009).

Los hongos entomopatógenos invaden directamente a través del exoesqueleto, sin embargo, la infección puede ocurrir a menudo entre las partes bucales, membranas intersegmentales o a través de los espiráculos, donde existe alta humedad que promueve la germinación y la cutícula está poco esclerotizada; esto facilita la penetración. Se considera que estos microorganismos patógenos actúan por contacto, ya que las unidades infectivas se adhieren a la superficie de la cutícula a través de fuerzas hidrófobas (Charnley, 1997).

Una vez en contacto con la cutícula, bajo condiciones favorables las esporas pueden germinar siguiendo procesos análogos a los de los hongos fitopatógenos: producción de tubos germinativos, apresorios y filamentos de infección. Los mecanismos de penetración son físicos y enzimáticos (Sánchez-Peña, 2014). El apresorio ejerce presión física sobre el exoesqueleto y la penetración es ayudada por la producción de enzimas

proteasas, quitinasas, quitobiasas, lipasas y lipooxigenasas que degradan la cutícula (Cho *et al.*, 2006; Alatorre-Rosas, 2010). Una vez dentro del insecto, el hongo se desarrolla como cuerpos hifales que se van diseminando a través del hemocele e invaden diversos tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi y hemocitos, ocasionando la muerte del insecto después de 3 a 14 días de iniciada la infección (Pucheta *et al.*, 2006).

Poco tiempo después de que ocurre la muerte del hospedero, las hifas del hongo atraviesan la cutícula, ocurriendo la formación de esporóforos o conidióforos que dan origen a las esporas sexuales o conidias, que funcionan como unidades de dispersión e infección. Cada insecto infectado constituye un nuevo foco de infección para otros individuos de la población (Alatorre-Rosas, 2010).

2.7. Uso de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico en aleuródidos.

En la mayoría de las investigaciones sobre control biológico con hongos entomopatógenos en poblaciones de *T. vaporariorum* y otras especies de mosca blanca, se emplean estados inmaduros del insecto, ya que hasta el momento no se encuentran disponibles insecticidas con efecto sistémico sobre estados ninfales o larvales. Además, los primeros estados ninfales son más susceptibles que los huevos y adultos (Wraight *et al.*, 2000).

Wraight *et al.*, (2000) evaluaron el efecto de *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea* sobre ninfas de tercer y cuarto instar de *Bemisia argentifolii* asperjando una suspensión de conidios de $0.6-1.4 \times 10^3$ conidios/mm² sobre hojas de hibisco, calabacita y melón. La infección de los estados inmaduros del insecto superó el 70%, pero sobre individuos adultos el efecto fue mínimo. El potencial como agentes de control biológico de 35 cepas de *Lecanicillium lecanii* sobre ninfas de tercer instar, huevos y adultos de *B. argentifolii* fue evaluado por Gindin *et al.*, (2000); los huevos resultaron inmunes a la infección por los aislamientos más virulentos que causaron una mortalidad del 85% de las ninfas y el máximo porcentaje de mortalidad causado por *L. lecanii* en adultos fue de 34.1-52.6%.

Tres aislamientos de *Aspergillus parasiticus*, 100 de *Fusarium moniliforme*, uno de *Aschersonia* sp y 246 aislamientos de *Fusarium oxysporum* fueron colectados en áreas

agrícolas cercanas a una reserva ecológica en Quintana Roo, México; de ellos, los aislamientos de *F. moniliforme* y *F. oxysporum* resultaron más virulentos al inocularse (5 μ L de una suspensión de 10^8 conidios/mL) sobre ninfas de tercer instar de *T. vaporariorum* (Torres-Barragán *et al.*, 2004).

Cuthberson *et al.*, (2005) realizaron bioensayos para determinar la eficiencia como entomopatógeno de *L. muscarium* en cada uno de los estados inmaduros de *B. tabaci*. A densidades de 10^7 conidios/mL las ninfas de segundo y tercer instar fueron más susceptibles que las de cuarto instar.

Con aislamientos de los hongos *L. lecanii*, *L. muscarium*, *L. longisporum*, *I. fumosorosea* e *I. javanica* obtenidos de cadáveres de *T. vaporariorum* en Argentina, se obtuvieron mortalidades de 26.6%-76.6% a los 7 días después de la infección de ninfas de cuarto instar inoculadas con una suspensión de conidios de 1×10^7 conidios/mL (Scorsetti *et al.*, 2008). Por su parte, Zhu y Jun (2011) estudiaron la susceptibilidad de *Bemisia tabaci* biotipo Q a 21 aislamientos de *B. bassiana*, tres aislamientos de *Isaria fumosorosea*, un aislamiento de *Isaria cateni*, tres aislamientos de *L. lecanii*, un aislamiento de *L. attenuatum* y uno de *Aschersonia aleyrodis* a una densidad de 1×10^8 conidios/mL; todos los hongos fueron patogénicos, destacando los aislamientos de *L. lecanii* que causaron mortalidades arriba del 90%.

2.8. *Stagonospora* sp (Hawksw & O.E. Erikss) (= *Saccharicola* sp)

Un aislamiento fungoso proveniente de material de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) con síntomas de tizón foliar y descrito con base a sus características morfológicas como *Leptosphaeria bicolor* (Kaiser *et al.*, 1979), fue determinado como *Saccharicola bicolor* por Eriksson y Hawksworth (2003). Quienes mediante estudios moleculares y filogenéticos (SSU rDNA) con la correspondiente comparación de secuencias de bases, encontraron que la mayoría de los taxones relacionados con *L. bicolor* estaban dentro del orden Pleosporales, siendo los Hyphomycetes *Helminthosporium solani* y *H. vetulinum* los que obtuvieron el mayor porcentaje de similitud (99%). Por otra parte, el análisis morfológico (forma, tamaño y color del ascocarpo, ascas, y ascosporas) indicó que *L. bicolor* correspondía al género

Saccharicola, que filogenéticamente es cercano a los Hyphomycetes *Helminthosporium solani* y *Helminthosporium vetulinum*. Recientemente, con la finalidad de revelar la diversidad de especies incluidas dentro del suborden *Massarineae* (*Pleosporales*, *Dothideomycetes*, *Ascomycota*) y, establecer la relación filogenética entre cada una de ellas; se examinaron 106 aislamientos pertenecientes al suborden y mediante el análisis morfológico-molecular de las secuencias de DNA (SSU y LSU nrDNA) de la subunidad mayor y menor del ribosoma nuclear de cada uno de los 106 aislamiento, y con la correspondiente comparación de secuencias de bases publicadas en el GenBank, se hizo una reestructuración taxonómica del suborden *Massarineae* (*Pleosporales*, *Dothideomycetes*, *Ascomycota*) con el consecuente cambio de taxones, propuesta de nuevas familias taxonómicas, y reajuste filogenético, por lo cual, se propuso el cambio de nombre del género *Leptosphaeria* por *Stagonospora* (Tanaka *et al.*, 2015). Con base a lo anterior, de acuerdo con estos autores el hongo *Saccharicola bicolor* [(D. Hawksw. *et al.*) D. Hawksw. and O.E. Erikss., *Mycologia* 95: 431. 2003], queda como *Stagonospora bicolor* [(D. Hawksw. *et al.*) Kaz. Tanaka & K. Hiray., *comb. nov.* MycoBank MB811316]; siendo su basónimo (basionym) *Leptosphaeria bicolor* [D. Hawksw. *et al.*, *Mycologia* 71: 483. 1979].

Se sabe que la mayoría de los hongos entomopatógenos con potencial para control de insectos están en el orden Entomophthorales (clase Zygomycetes) y en la subdivisión Deuteromycotina (clase Coelomycetes, principalmente los Hyphomycetes). Los Entomophthorales se caracterizan por ser especies con alta especificidad y gran potencial epizoótico. Muchas especies de los Hyphomycetes tienen un rango de hospedantes amplio y generalmente son fáciles de propagar *in vitro* (Roberts *et al.*, 1991).

2.9. Descripción morfológica de *Stagonospora* sp (= *Saccharicola* sp.)

Presenta una estructura reproductiva sexual (ascoma) correspondiente a un pseudotecio subgloboso, inmerso, de color negro que aparece de manera dispersa en el tejido infectado. Ostiolo papilado del pseudotecio y paredes de éste compuesto por capas de células pseudoparenquimáticas de color marrón oscuro. Pseudoparáfisis del hamatecio (himenio no fructífero). Ascas subcilíndricas con ocho ascosporas. Ascosporas fusiformes con 1-3 septos hialinas al principio y posteriormente melanizadas con ornamentaciones de tipo verrugoso en la superficie. La penúltima célula de la ascospora a menudo más gruesa y oscura que las demás células.

2.10. Potencial biológico de *Stagonospora* sp (= *Saccharicola* sp.)

En Brasil a partir de *Eugenia jambolana*, planta comúnmente utilizada en la medicina tradicional brasileña, se aisló una cepa endófito de *Saccharicola* sp en la que se detectaron genes asociados a la producción de metabolitos secundarios denominados poliquétidos, los cuales poseen actividad antibacteriana, inmunosupresora, antitumoral, anticolesterémica y antiparasítica. Asimismo, en 2013 en ese mismo país se reportó la actividad antagónica de aislamientos endófitos de *Saccharicola* sp contra los hongos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* y *Cladosporium sphaerspermum* (Chapla *et al.*, 2012). Recientemente, Silva (2015) aisló un hongo de la maleza acuática *Typha domingensis*, el cual de acuerdo a un análisis molecular se determinó que correspondía al género *Saccharicola*. Esta cepa no causó síntomas de enfermedad al inocularla en plantas de caña de azúcar y en un estudio de rango de hospedantes en especies hortícolas, aproximadamente 40 cultivares resultaron inmunes cuando se inocularon con el hongo. El efecto antifúngico de *Saccharicola* sp (= *Stagonospora* sp), se ha probado contra *Fusarium* spp., *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *Microbotryum violaceum* (Chapla *et al.*, 2012), *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* (Uc-Argüelles *et al.*, 2017). También se observó que este hongo penetraba y parasitaba adultos y huevecillos de ácaros (Manuel Silva Valenzuela comunicación personal).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cría de mosca blanca y del psílido *D. citri*

Se establecieron dos colonias de *T. vaporariorum* utilizando como sustrato plantas de frijol cv flor de mayo (hábito de crecimiento determinado). Para lo cual, se sembraron semillas de frijol en una charola germinadora con mezcla peat-moss-agrolita (3:1). Cuando se observó el desarrollo de dos hojas verdaderas, se transfirieron a vasos de unicel de 1 L conteniendo suelo estéril (Figura 1). A los 21 días del trasplante, se confinaron en dos jaulas entomológicas (80x80x80 cm), ocho plantas por jaula y se introdujeron 500 adultos de mosca blanca en cada jaula; las colonias se mantuvieron en un invernadero con una humedad relativa al 70%. Constantemente se introdujeron plantas nuevas a las jaulas con el fin de incrementar la población insectil (Figura 2). Las plantas senescentes se retiraban de la jaula una vez que se sacudían dentro para asegurar la permanencia de los adultos.

La cría, reproducción y mantenimiento de las colonias del psílido asiático de los cítricos libres de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, se realizó en plantas de *Murraya paniculata* de un año de edad mantenidas en jaulas entomológicas en invernadero a 27 ± 2 °C y 60-80% de humedad relativa. Para el ensayo de antagonismo *in vitro* los insectos se capturaron con un aspirador bucal y se colocaron en viales de vidrio en grupos de 11 especímenes por vial; también se colectaron brotes de *M. paniculata* y se introdujeron en bolsas de polietileno. Los viales y los brotes se colocaron en una hielera y se transportaron al laboratorio.



Figura 2. Mantenimiento de colonias de mosca blanca en invernadero en plantas de frijol. A) Sustrato para la alimentación y oviposición de insectos. B) Plantas confinadas en una de las jaulas construidas para el pie de cría.

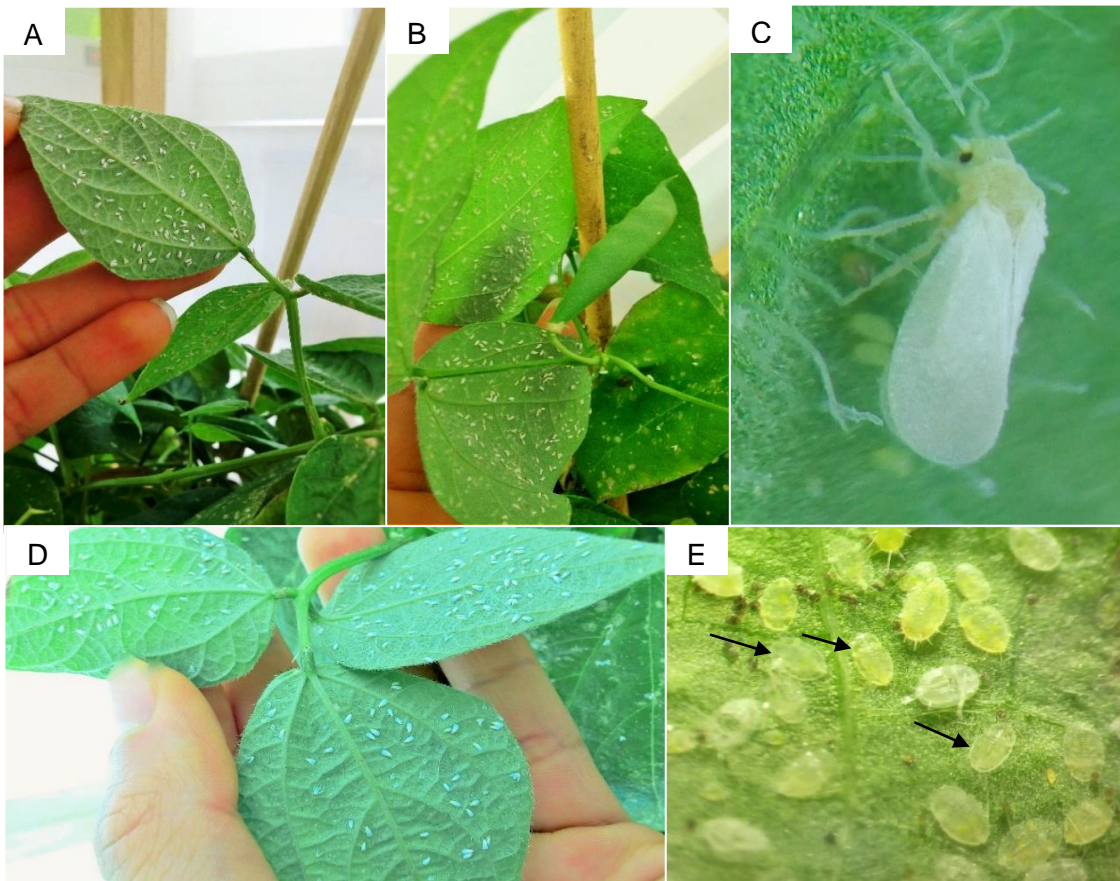


Figura 2. Incremento de población insectil de *T. vaporariorum*. A), B), y D) Foliolos altamente infestados con adultos de mosca blanca. C) Ejemplar hembra de mosca blanca ovipositando en el envés de hojas de frijol. E) Diferentes estadios larvales de mosca blanca (ninfas de segundo instar señaladas por flechas).

3.2. Obtención de ninfas de *T. vaporariorum*.

Grupos de 25 adultos de *T. vaporariorum*, tomados de la colonia previamente establecida en el invernadero, se introdujeron dentro de jaulas clip circulares de 2.5 cm de diámetro, éstas se sujetaron a los folíolos de la planta de frijol y se mantuvieron durante 2 días para que ovipositaran (Figura 3). Las plantas se mantuvieron en un cuarto de crecimiento a 27°C, 50% de H.R y fotoperiodo luz: oscuridad de 16h: 8h. Posteriormente, se retiraron las jaulas clip junto con los adultos y se identificaron los folíolos infestados con huevecillos para darle seguimiento hasta el desarrollo de los estados larvales de interés y utilizar de esta forma individuos homogéneos en su fase biológica (segundo y cuarto instar). Con base en las características morfológicas se distinguieron los diversos estados inmaduros del insecto descartando el primer y tercer estado larval.

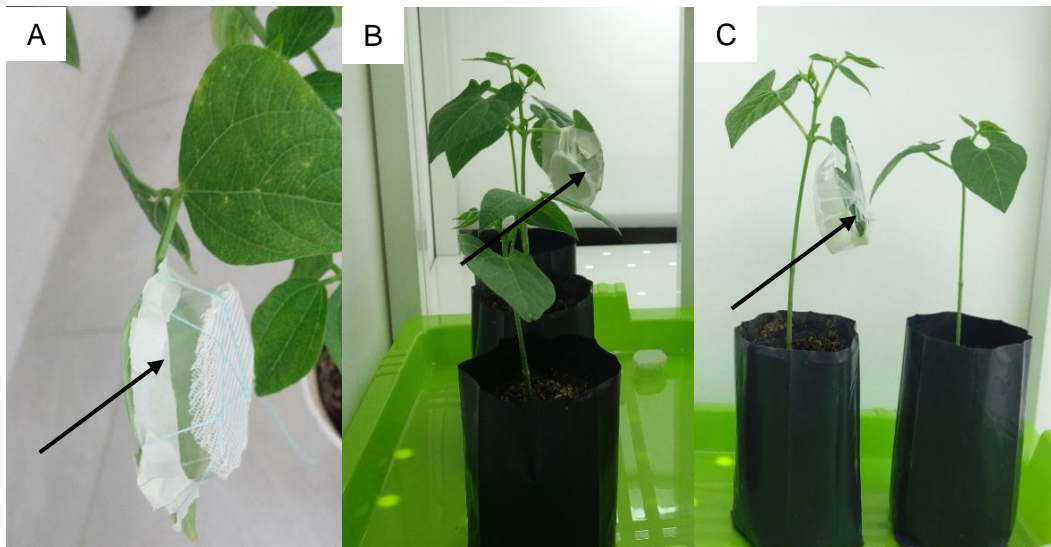


Figura 3. Disposición de jaulas tipo clip sobre el envés de hojas de plantas de frijol (A, B y C). Cada una de las mini jaulas contenían 25 adultos de mosca blanca. Condiciones de cuarto de crecimiento (27°C, 50% de H.R y fotoperiodo luz: oscuridad de 16h: 8h).

3.3. Identificación morfológica de la especie *T. vaporariorum* con base a las características físicas de la pupa.

Con la finalidad de corroborar que el estudio se realizaba sobre la especie de interés, de las colonias establecidas, se hicieron preparaciones en láminas fijadas, con la técnica

descrita por Martin (1987). Ninfas de cuarto instar se maceraron en hidróxido de potasio al 40% durante un lapso de 60 min en un vidrio de reloj, después se lavaron con agua destilada durante 15 min. Posteriormente, se deshidrataron en cloral-fenol (hidrato de cloral 1 parte: fenol 1 parte) por 60 min a 40°C; en seguida se pasaron a ácido acético glacial por 5 min y se tiñeron con fucsina ácida por 5 min; a continuación se expusieron a ácido glacial por 5 min y se sumergieron en esencia de clavo por 2.5 h. Finalmente se montaron en bálsamo de Canadá. Las preparaciones se observaron al microscopio óptico para determinar las características de la llingula y orificio vasiforme que constituyen rasgos importantes de identificación.

3.4. Cultivo de *Stagonospora* sp (*Saccharicola* sp)

Se realizó la reactivación de la cepa original de *Stagonospora* sp (conservada en papel filtro a -20° C) aislada de *T. domingensis* por Silva (2015) (Figura 4). Se colocó un segmento del papel filtro con micelio del hongo en una placa con PDA y se incubó a 25±2°C. Del crecimiento micelial se tomó un bloque de 0.5 cm (de lado), se transfirió al centro de otra caja Petri con medio fresco y se incubó a 27 °C durante 48 h. Transcurrido este tiempo, se observó bajo el estereoscopio el micelio del hongo en crecimiento, enfocando los bordes de la colonia para identificar las puntas de las hifas en crecimiento. Con un alfiler estéril, se cortó el pedazo de agar que contenía la punta de una sola hifa y este pedazo se transfirió a una placa de PDA (colocando solo una hifa en cada caja). Las cajas con la punta de hifa se incubaron a 27 °C durante 15 días. A partir de los cultivos de puntas de hifa, se incrementó del hongo con el fin de producir el inóculo suficiente para las pruebas de patogenicidad.

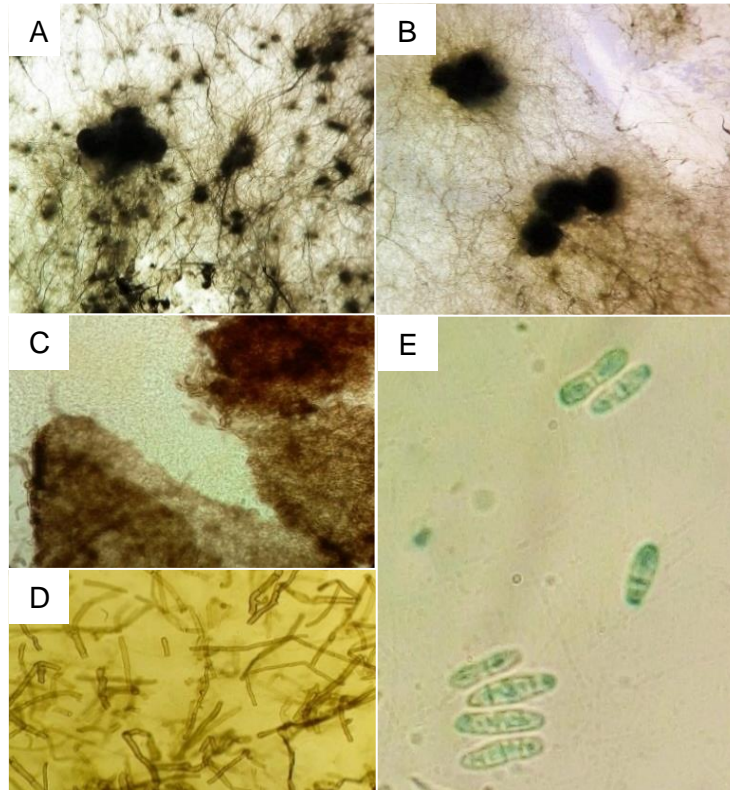


Figura 4. Características estructurales de *Stagonospora* sp. A) y B) Agregación de picnidios subglobosos creciendo en medio de cultivo PCA. C) Liberación de conidios por presión mecánica del picnidio. D) Segmentos de hifa. E) Conidios con cuatro septos gatulados.

3.5. Cultivo monospórico de *L. lecanii*

Con la finalidad de tener un punto de comparación del potencial patogénico de *Stagonospora* sp, se seleccionó como referencia al hongo *L. lecanii*, ampliamente reconocido por su capacidad patogénica. Se utilizó el aislamientos ARSEF974^a (obtenido de áfidos en Venezuela) crio preservado a -80 °C en cilindros de ADS (Agar Dextrosa Sabouraud) en la Colección de hongos entomopatógenos del Colegio de Postgraduados. Cinco cilindros de 5 mm de diámetro de medio de cultivo ADS con micelio del hongo se transfirieron al centro de cajas Petri conteniendo ADS fresco y se incubaron a 25 °C durante 20 días (un cilindro por caja). De una de las colonias desarrolladas, con un asa bacteriológica, se tomó una cantidad no cuantificada de conidios, estos se depositaron en un frasco de vidrio con 20 mL de Tween 20 al 0.03%, agitando durante 3 minutos en un vórtex. De la suspensión homogénea de conidios, se tomó una alícuota de 50 µL que

se depositó en el centro de una caja Petri con 15 mL de agar-agua al 1.5%. Con un asa de Digrafsky estéril, se dispersó la alícuota en toda la superficie de la placa de agar-agua y se incubó a 25°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, con la caja cerrada, se localizaron los conidios germinados y se marcó en el reverso de la caja el sitio de ubicación. Cada fragmento de agar conteniendo el conidio germinado se transfirió en forma invertida a una caja Petri con medio de cultivo ADS fresco. Las cajas se incubaron a 25°C durante 20 días.

3.6 Preparación del inóculo de *Stagonospora* sp y de *L. lecanii*.

Dado que la producción de conidios por *Stagonospora* sp en medio de cultivo es muy escasa, se utilizaron como propágulos infectivos fragmento de micelio. Para esto, sobre cajas con PDA con crecimiento micelial de *Stagonospora* sp de 15 días de incubación, se vertieron 5 mL de solución salina al 0.09% + 10 mL de Tween 20 al 0.03% estéril (por caja) y se raspó la superficie de cada caja para suspender el micelio y el contenido de la suspensión de ocho cajas se licuó para fragmentar el micelio. El número de propágulos (segmentos de hifa) se cuantificó en un hematocitómetro ajustando el nivel del inóculo a 1×10^8 propágulos/mL. También sobre cajas conteniendo ADS con cultivos monospóricos de *L. lecanii* de 20 días de incubación, se vertieron 15 mL de Tween 20 al 0.03% estéril (por caja). Se raspó la superficie de cada caja para remover la mayor cantidad de conidios y micelio. Se depositó el material extraído de cinco cajas Petri en tubos para centrífuga de 50 mL y se agitaron en un vórtex durante 5 min. La suspensión de conidios y micelio se filtró con una doble capa de pañalina, se cuantificó el número de conidios y se ajustó a una suspensión conteniendo 1×10^8 conidios/mL.

3.7. Pruebas de patogenicidad sobre ninfas de mosca blanca

Se desprendieron los folíolos de las plantas de frijol conteniendo los estadios larvales desarrollados en las jaulas clip, se lavaron con agua destilada estéril y se secaron con papel absorbente estéril. Bajo un estereoscopio a 40 aumentos se retiraron las ninfas del envés con una aguja aplanada. Sobre portaobjetos estériles se colocarán 10 gotas (5 μ L/gota) de la suspensión del hongo a evaluar y en medio de cada gota se colocó una ninfa. Después, los portaobjetos se secaron en la cámara de flujo laminar y una vez secos se colocaron en una caja Petri que tenían en el fondo un segmento de papel filtro,

el que diariamente se humedeció con 0.5 mL de agua destilada. Las cajas Petri se incubaron a 25 ± 2 °C por 7 días. La infección de las ninfas se evaluó a los 3,4, 5, 6 y 7 días después de haber sido inoculadas. Los criterios que se tomaron en cuenta para determinar mortalidad fueron la momificación de las ninfas (invasión y muerte de la ninfa causada por el hongo) y la emergencia de micelio del interior del insecto. La mortalidad de las ninfas causada por el hongo se verificó observando al microscopio la esporulación característica de *L. lecanii* y el crecimiento micelial característico de *Stagonospora* sp. En total se establecieron cinco tratamientos como se muestra en el Cuadro 2. La unidad experimental consistió de una caja Petri con 10 ninfas/portaobjeto, dispuestas en un diseño completamente al azar. Cada tratamiento se repitió 10 veces (un total de 100 ninfas/tratamiento), y el experimento se repitió una vez más.

Cuadro 2. Tratamientos para las pruebas de patogenicidad de los hongos *Stagonospora* sp (S) y *Lecanicillium lecanii* (Ll) contra ninfas del 2° y 4° instar de *Trialeurodes vaporariorum* (Tv).

1.S vs Tv 2°ins
2.Ll vs Tv 2°ins
3.S vs Tv 4°ins
4.Ll vs Tv 4°ins
5. Testigo (tratados con 5 µL de Tween 20 al 0.03%)

3.8. Pruebas de patogenicidad sobre adultos de *D. citri*

La preparación de las suspensiones inoculantes de *L. lecanii* (1×10^8 conidias/mL) y *Stagonospora* sp (1×10^8 propágulos/mL) se hizo de la misma forma que para el bioensayo con *T. vaporariorum*. Los adultos de *D. citri* se inocularon individualmente aplicando con una micropipeta 20 µL de la suspensión inoculante directamente en la región dorsal del tórax, de acuerdo con el método topical. Los individuos una vez inoculados se transfirieron, utilizando un pincel fino, a los brotes de *M. paniculata* previamente desinfectados y colocados en el interior de dispositivos construidos para la incubación de los insectos (Figura 5). A una caja Petri (60 mm de diámetro) se le insertó un tubo eppendorf de 2 mL que contenía agua estéril, con la finalidad de que el brote introducido en él, conservara la turgencia de los tejidos durante el periodo de incubación

del ensayo. Se establecieron tres tratamientos: 1) psílidos inoculados con *L. lecanii* (LI vs Dc); 2) psílidos inoculados con *Stagonospora* sp. (S vs Dc); y 3) testigo sin inocular, a los insectos solamente se les aplicó 20 μ L de Tween 20 al 0.03% (T). La unidad experimental consistió de una caja Petri con once adultos/brote, dispuestas en un diseño completamente al azar. Cada tratamiento se repitió 10 veces (un total de 110 adultos/tratamiento). Las cajas Petri se incubaron a 25 ± 2 °C durante 10 días. A partir del tercer día hasta el décimo, se hicieron observaciones diarias para registrar el número de insectos infectados. La momificación del insecto y la emergencia de las estructuras del hongo del interior de su cuerpo fueron criterios indicativos de la muerte del individuo. Con la finalidad de inducir la esporulación del hongo a partir de los individuos muertos, éstos se colocaron en cajas Petri estériles conteniendo un círculo de papel filtro sin humedad adicional durante 2 días y se incubaron a 25 ± 2 °C; transcurrido este tiempo, el papel filtro se humedeció con agua destilada estéril y se incubó durante 7 días para favorecer la esporulación de los hongos y confirmar infección.

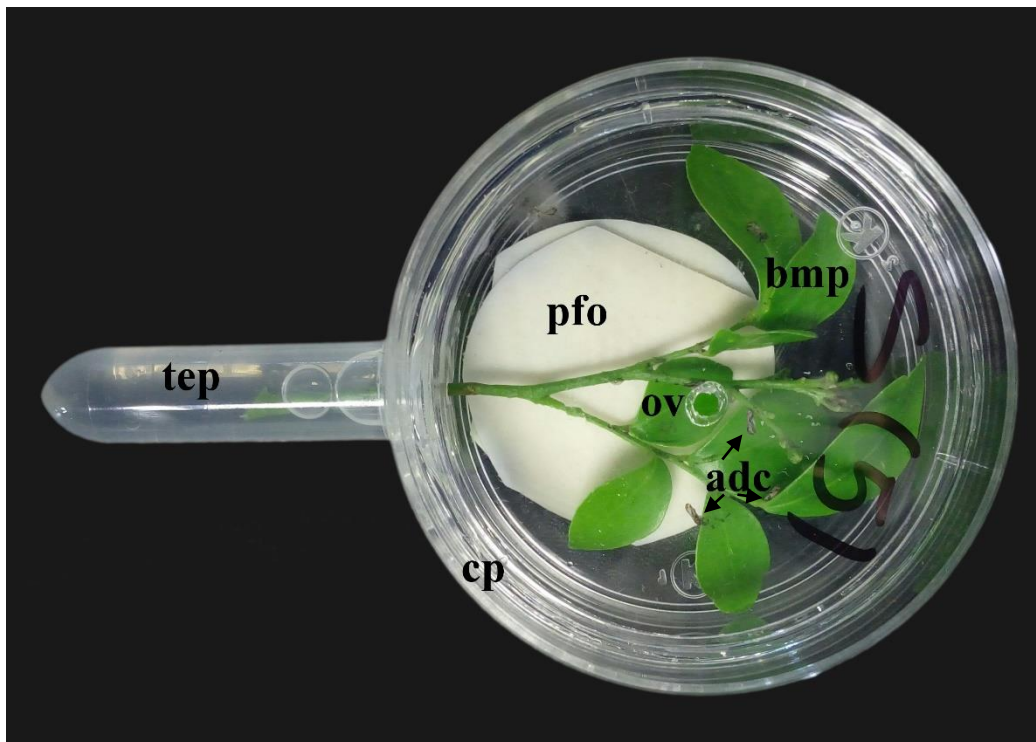


Figura 5. Dispositivo diseñado para la incubación de brotes de *M. paniculata* infestados con adultos de *D. citri*. tep: Tubo eppendorf de 2 mL conteniendo agua corriente estéril. cp: Caja Petri de 6 cm de diámetro sellada con silicón. bmp: Brote de *M. paniculata*. pfo: Círculo de papel filtro para conservar la humedad relativa. adc: Adultos de *D. citri* inoculados, ov: Orificio para la ventilación.

3.9. Análisis estadístico

Con los datos de número de especímenes (ninfas y adultos) infectados, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$), utilizando el paquete estadístico SAS versión 9.0. El análisis se realizó con los datos de los dos experimentos.

4. RESULTADOS

4.1. Pruebas de patogenicidad sobre ninfas de mosca blanca

Las características morfológicas presentadas por las ninfas del cuarto instar como: presencia de orificio vasiforme tipo semicordiforme, l ngula lobulada, papilas dorsales y submarginales, y margen granulado indicaron que éstas correspondían a la especie *Trialeurodes vaporariorum* (Figura 6).

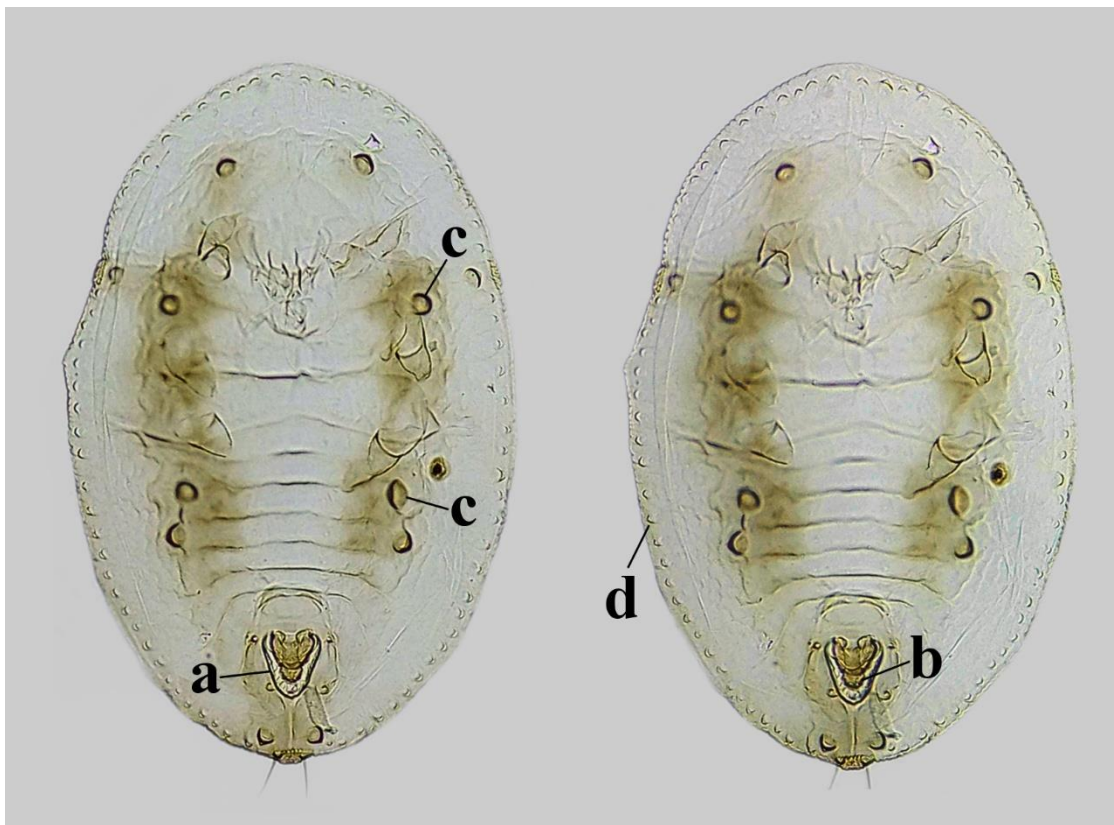


Figura 13. Vista ventral de ninfas de cuarto instar con características morfológicas distintivas de la especie *T. vaporariorum*. a: orificio vasiforme semicordiforme, b: l ngula lobulada, c: papilas dorsales y submarginales, d: margen uniformemente granulado.

El número de ninfas de mosca blanca infectadas, fue significativamente mayor ($P= 0.05$) en las inoculadas con propágulos de *Stagonospora* sp y *L. lecanii*, en comparación con el testigo tratado con Tween 20 al 0.03%. A los 8 días después de la inoculación, el mayor número de ninfas parasitadas se registró en el tratamiento S vs Tv 2  ins, seguido de los dos tratamientos con el hongo *L. lecanii* (LI vs Tv 2  ins y LI vs Tv 4  ins). La

patogenicidad de *L. lecanii* fue la misma para ambos estados inmaduros de mosca blanca. Sin embargo, en los tratamientos con el hongo *S. bicolor* las ninfas de 2° instar fueron más susceptibles que las de 4° instar ($P= 0.05$) (Figura 7). Con *Stagonospora* sp se registró un 42.5% de ninfas de 2° instar a los 5 ddi, mientras que con *L. lecanii* se alcanzó el mismo porcentaje de infección hasta los 8 ddi en ninfas de segundo y cuarto instar (Figura 8). La presencia de síntomas de infección en ninfas de mosca blanca se caracterizó por una progresiva interacción del micelio de *Stagonospora* sp con la cutícula de las ninfas de segundo y cuarto instar, seguida de la invasión, colonización e infección interna antecedida por un cambio en la coloración. En el caso de las ninfas de moscas blancas infectadas por *Lecanii*, los especímenes muertos se tornaron de color amarillo pálido a oscuro, rugosos y opacos, y alrededor de los 5 días se notó crecimiento fúngico blanco cubriéndolas (Figura 9).

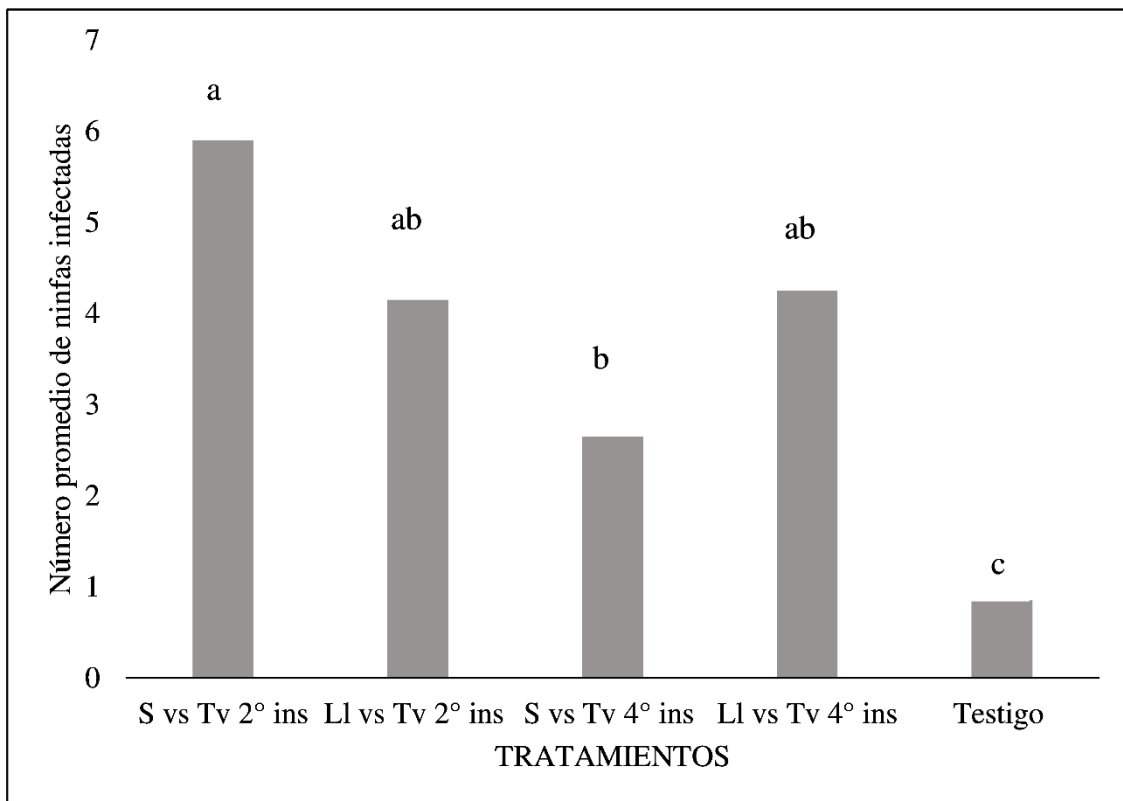


Figura 21. Número de ninfas de segundo y cuarto instar de mosca blanca (*T. vaporariorum*) infectadas y colonizadas por los hongos *Stagonospora* sp (S) y *L. lecanii* (L1). Barras con la misma letra no difieren significativamente (Tukey, 0.05).

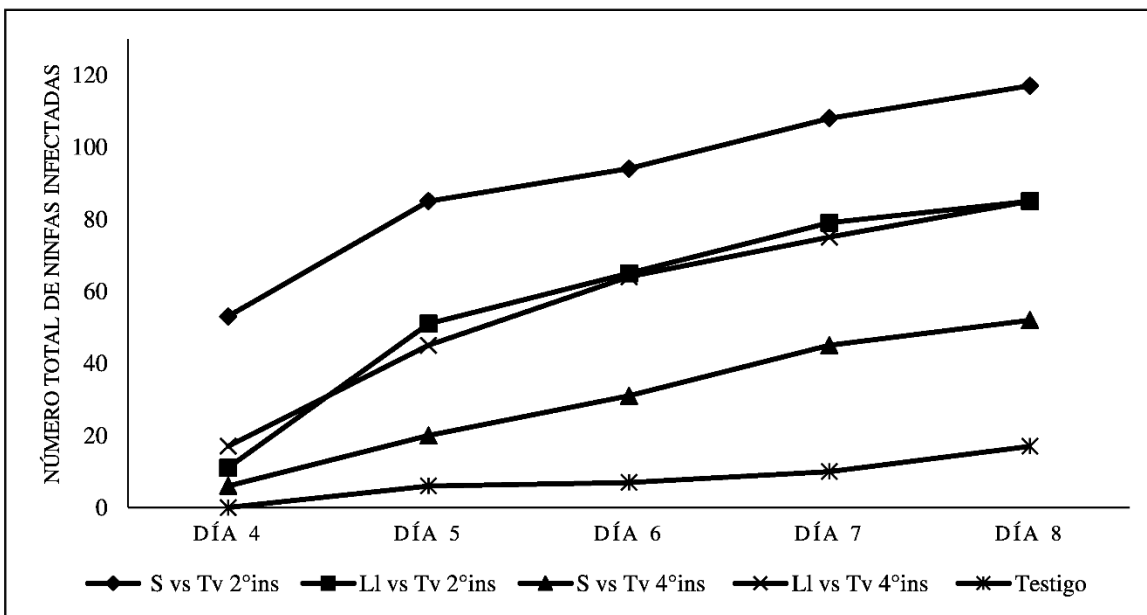


Figura 29. Número total de ninfas de *T. vaporariorum* infectadas y colonizadas por los hongos *Stagonospora* sp y *L. lecanii* a través del tiempo en cada tratamiento.

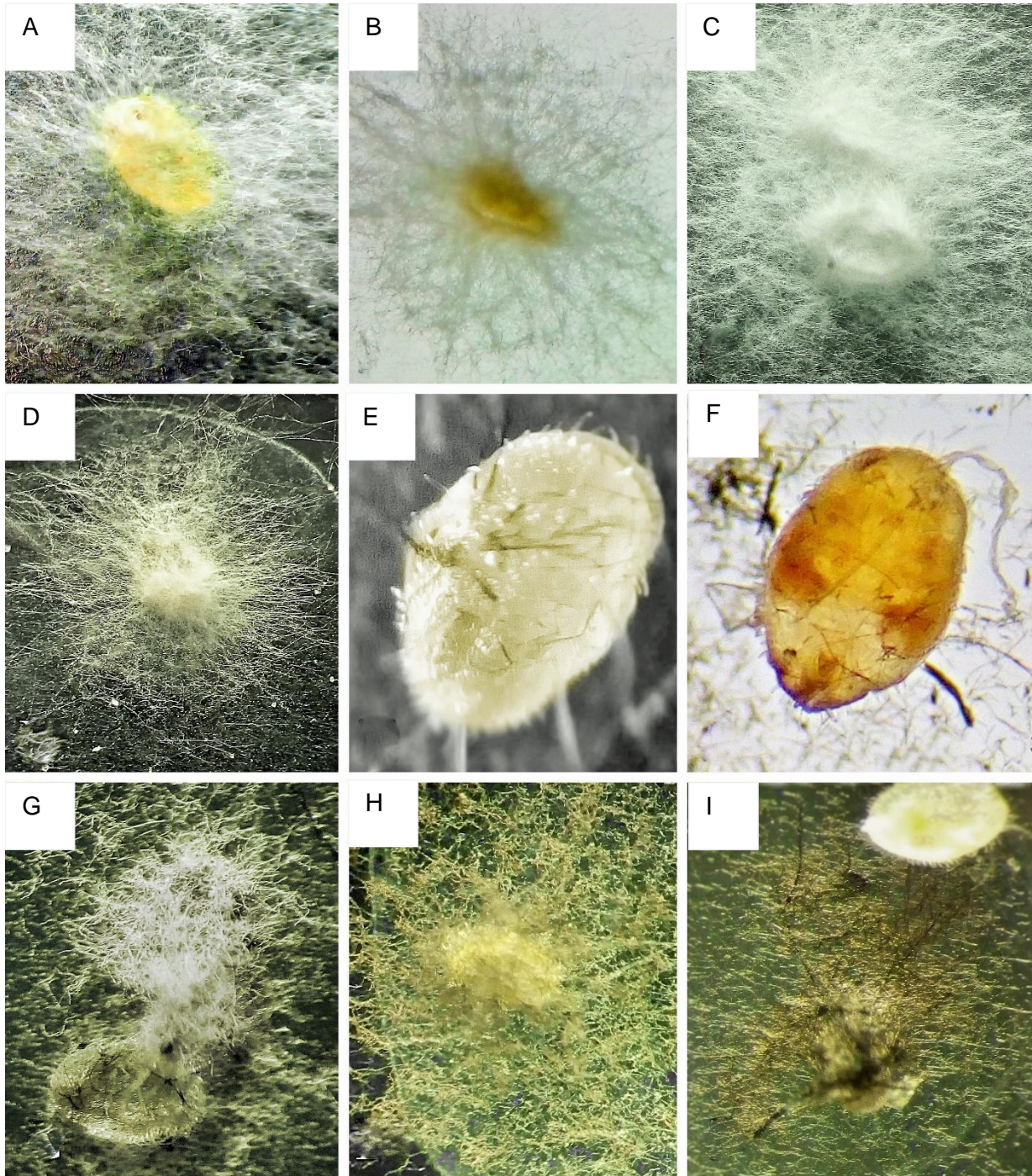


Figura 37. Desarrollo de la infección con características típicas de parasitismo fúngico en ninfas infectadas por *L. lecanii* (LI) y *Stagonospora* sp (S). A: la degradación causada por LI se inicia en el centro (infección en forma interna); B: cambio de coloración de amarillo claro a color amarillo oscuro en ninfas infectadas con LI; C: ninfas N2 colonizada por LI; D: micelio fúngico sobre ninfa afectada por LI; E: micelio negro de *Stagonospora* sp interactuando con la epicutícula de una ninfa; F: cambio de coloración en ninfas inoculadas con *Stagonospora* sp; G,H: ninfas N4 colonizadas por *Stagonospora* sp e I: ninfa normal vs ninfa colonizada.

4.2. Pruebas de patogenicidad sobre adultos de *D. citri*.

El número de adultos de *D. citri* infectados, fue significativamente mayor ($P= 0.05$) en los inoculados con propágulos de *Stagonospora* sp y *L. lecanii*, en comparación con el testigo tratado con Tween 20 al 0.03%. *L. lecanii* causó el 94% de mortalidad de los adultos del PAC mientras que *Stagonospora* sp solamente causó un 8% (Figura 10).

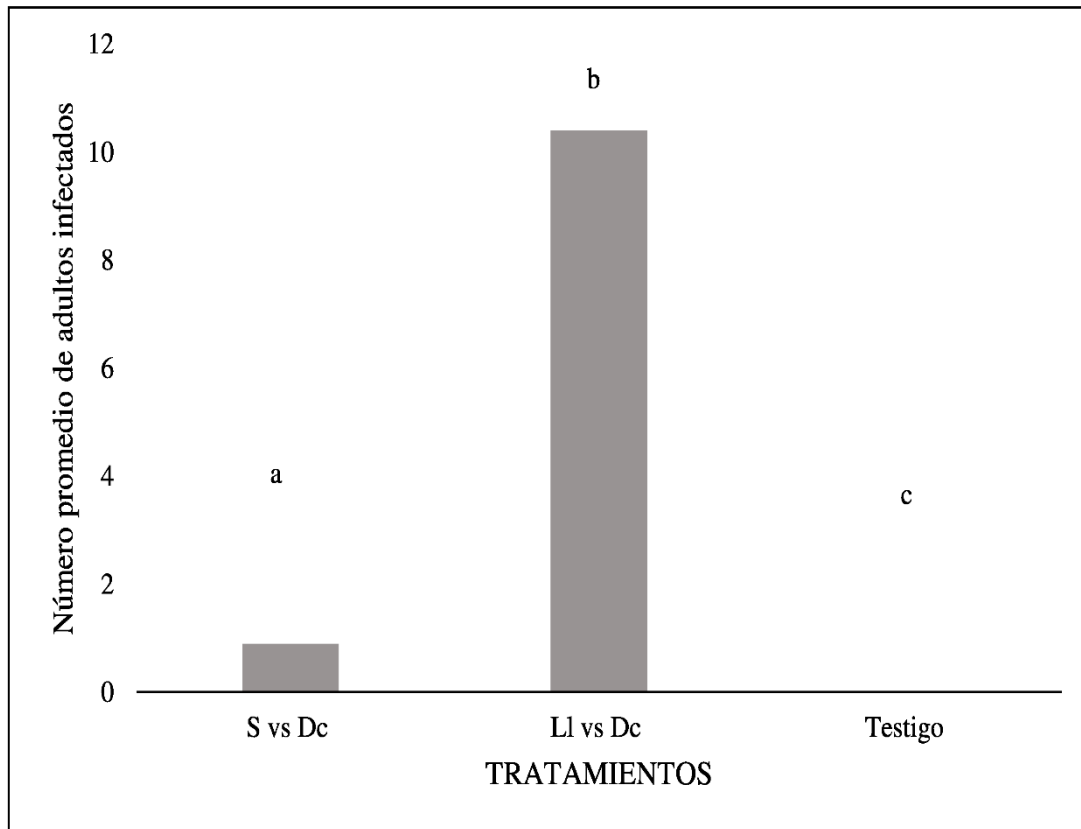


Figura 45. Número de adultos de *D. citri* infectados y colonizados 10 días después de ser tratados con suspensiones de los hongos *Stagonospora* sp (S) y *Lecanicillium lecanii* (L1). Barras con la misma letra no difieren significativamente (Tukey, 0.05).

La presencia de síntomas de infección de *L. lecanii* en adultos del PAC se caracterizó por la degradación interna e invasión gradual de los tejidos del insecto que se inició y extendió a partir de la región dorsal al resto del cuerpo de *D. citri*; posteriormente apareció el crecimiento micelial de color blanco sobre los cadáveres. Se observó dificultad de movimiento, obstrucción mecánica de los conductos respiratorios, producción de conidias en la superficie del cadáver y parálisis (Figura 11). En el caso de los adultos de

D. citri inoculados con *Stagonospora* sp, los segmentos de hifa se observaron adheridos a la superficie de la cutícula del insecto.



Figura 53. Adultos del psílido *D. citri* completamente momificados por *Lecanicillium lecanii* bajo condiciones controladas.

5. DISCUSIÓN

En condiciones *in vitro*, ninfas de segundo (N2) y cuarto instar (N4) de *Trialeurodes vaporariorum* fueron susceptibles (58.5% y 26% de individuos infectados), al hongo *Stagonospora* sp. Las ninfas N2 resultaron más susceptibles que las N4, coincidiendo con lo reportado por la mayoría de autores quienes señalan que los primeros estados ninfales de cualquier plaga son los más susceptibles a los hongos patógenos de insectos (Wraight *et al.*, 2000; Cuthbertson *et al.*, 2005). Algunos autores indican que el micelio de los hongos no tiene la capacidad de invadir artrópodos (Sánchez-Peña, 2014). Sin embargo, los segmentos de hifa de *Stagonospora* sp infectaron los estados inmaduros de mosca blanca (principalmente las ninfas N2), debido posiblemente a que la cutícula de las ninfas no está altamente esclerotizada. Por otro lado se conoce que la mayoría de los hongos entomopatógenos con potencial para el control de insectos pertenecen al orden Entomophthorales (clase Zygomycetes) y en la subdivisión Deuteromycotina (clase Coelomycetes, principalmente los hyphomycetes) (Roberts *et al.*, 1991) y el del género *Stagonospora* presenta una alta proximidad filogenética (99 % de identidad) con el grupo de los hyphomycetes (Eriksson y Hawksworth, 2003).

Aunque *Stagonospora* sp no había sido consignado como patógeno de insectos, recientemente se han descubierto funciones adicionales de muchos hongos entomopatógenos; así, muchos de ellos se desempeñan además como antagonistas de fitopatógenos, como microorganismos asociados a la rizósfera y como endófitos de plantas (Vega *et al.*, 2009); y *Stagonospora* sp también vive como endófito (Chapla *et al.*, 2012). La plasticidad biológica es un fenómeno recurrente en hongos, de manera que el hongo *Saccharicola* sp (= *Stagonospora* sp) originalmente caracterizado como un organismo endófito (Chapla *et al.*, 2012), también tiene la capacidad de desempeñarse como antagonista de fitopatógenos (Rojas *et al.*, 2011; Uc-Argüelles *et al.*, 2017), y de acuerdo con nuestros resultados, como patógeno de estados inmaduros de mosca blanca. Como organismo endófito de algunas plantas, el hongo *Stagonospora* sp tiene la capacidad de producir metabolitos secundarios conocidos como poliquetidos (Rojas *et al.*, 2011) que podrían estar implicados en la capacidad de *Stagonospora* sp de sobrepasar las barreras de defensa de las ninfas N2 de la mosca blanca *T. vaporariorum*, ya que dichos compuestos poseen actividad antibacteriana, inmunosupresora,

antitumoral, anticolesterémica y antiparasítica. Por otro lado, existe evidencia de que hongos endófitos tienen la capacidad de producir quitinasas (Govinda *et al.*, 2011); aunque para el caso particular de *Stagonospora* sp no se encontró reporte alguno al respecto.

El número promedio de ninfas de *T. vaporariorum* infectadas por *L. lecanii* fue similar para ambos estados inmaduros (42%), lo cual podría sugerir que la presencia de varillas de cera en la superficie dorsal de las ninfas N4 no es un factor que limite la capacidad del entomopatógeno para penetrar, infectar y colonizar a su hospedero. Al parecer, *L. lecanii* expresó el mismo potencial patogénico para cada uno de los subestadios ninfales de mosca blanca; de manera similar, Meade y Byrne (1991) consignan que las ninfas N1, N2 y N3 de *B. tabaci* no mostraron diferencias de susceptibilidad a este hongo. Los resultados obtenidos en este estudio para *L. lecanii*, se encuentran dentro del rango señalado por Scorsetti *et al.* (2008), quienes obtuvieron un 26.6%-76.6 % de mortalidad en ninfas de cuarto instar de *T. vaporariorum* infectadas con *L. lecanii*. En contraste otros autores indican porcentajes de mortalidad mayores al 85% (Kanagaratnam *et al.*, 1982; Gindin *et al.*, 2000; Ortíz *et al.*, 2011).

Con ambos hongos la incidencia de individuos infectados aumentó con el transcurso del tiempo, pero el crecimiento de la incidencia fue mayor con *Stagonospora* sp, en comparación con *L. lecanii*, a pesar de que se señala que la infección por este último ocurre 24 h después del contacto de la conidia con el cuerpo del hospedero (Pineda-Guillermo y Alatorre-Rosas, 1995). Mediante la observación periódica de las ninfas inoculadas, luego de su permanencia en condiciones de cámara húmeda, se pudo reconocer la sintomatología característica de la acción de los hongos, su desarrollo micelial y la formación de sus estructuras reproductivas; lo anterior permite deducir que la muerte del insecto se debió a la acción patogénica de los microorganismos inoculados. La mortalidad de algunos individuos en el testigo se podría deber a daños físicos durante la manipulación del insecto.

En cuanto al Psílido *Diaphorina citri*, en casi la totalidad de los insectos inoculados tópicamente con la suspensión de conidias de *L. lecanii*, ocurrió invasión gradual de los tejidos que se inició a partir de la región dorsal y se extendió al resto del cuerpo del

psílido, culminando con la esporulación externa sobre los cadáveres. Este resultado coincide con lo reportado para aislamientos de *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* que causaron en adultos de *D. citri*, porcentajes de mortalidad superiores al 94 % (Orduño, 2015). En contraste, solamente el 8% de los adultos de *D. citri* inoculados con *Stagonospora* sp murieron.

En general las fases inmaduras en insectos, se caracterizan por presentar un tegumento poco esclerotizado, débilmente pigmentado y translúcido, y generalmente son de un aspecto muy diferente al que presentan los adultos (Pérez-Íñigo, 1997). En cambio los individuos adultos, presentan un exoesqueleto pluriestratificado con placas endurecidas denominadas escleritos, formados por quitina y proteínas. Las ninfas se caracterizan por presentar tegumentos menos endurecidos que el adulto (Osuna, 1995). Las ninfas de mosca blanca presentan una capa cerosa o epicutícula resistente al agua y caracterizada por no contener quitina; debajo de la epicutícula es frecuente la presencia de una endocutícula delgada en las etapas larvarias de muchos insectos. Por otro lado está documentado que *L. lecanii* produce quitinasas (Bing-Lan *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2008), mientras que para *Stagonospora* no se encontraron reportes que evidencien su capacidad para producir estas enzimas. Todo lo anterior podría, en parte explicar, porque el hongo *Stagonospora* sp no mostró un efecto importante sobre adultos de *D. citri*.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación, indicaron que *Stagonospora* sp causó una reducción significativa en el número de ninfas de segundo y cuarto instar (58.5% y 26%, respectivamente) de *Trialeurodes vaporariorum*; sin embargo, sobre adultos de *D. citri* tuvo un efecto mínimo (8% de mortalidad) en comparación con *Lecanicillium lecanii* (94%).

7. LITERATURA CITADA

- Alemán J, Baños H y Ravelo J. 2007. *Diaphorina citri* y la enfermedad Huanglongbing: una combinación destructiva para la producción citrícola. *Revista Protección Vegetal* 22(3):154-165.
- Aubert B. 1987. *Trioza erytreae* del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: biological aspects and possible control strategies. *Fruits* 42: 149-162.
- Bielikova L, Landa Z, Osborne L and Curn V. 2002. Characterization and identification of entomopathogenic and mycosporasitic fungi using RAPD-PCR technique. *Plant Protection Science* 38:1-12.
- Bing-Lan L, Pao-Min K, Yew-Min T and Kuo-Ching F. 2003. Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 410-415.
- Bonato O, Lurette A, Vidal C and Fargues J. 2007. Modelling temperature-dependent bionomics of *Bemisia tabaci* (Q-biotipe). *Physiological Entomology* 32: 50-55.
- Bouvet RJP, Vanaclocha P, Stansly PA, Urbaneja A and Monzó C. 2014. El psílido asiático de los cítricos y la enfermedad de HLB, el gran desafío para nuestra citricultura. *Nutrición y Sanidad Vegetal. Agricultura* 279:1-7.
- Capinera JL. 2008. Greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae). Pp: 1723-1725. *In: Encyclopedia of Entomology. USA.*
- Carapia RVE y Castillo-Gutiérrez A. 2013. Estudio comparativo sobre la morfología de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Acta Zoológica Mexicana*. 29: 178-193.
- Cardona, C, Rodríguez IV, Bueno JM y Tapia X. 2005. Biología y manejo de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* en habichuela y frijol. Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT. Cali, Colombia. 54p.
- Chapla MV, Somensi A, Cavalheiro JA, Bolzani SV y Araujo AR. 2012. Substâncias acetilênicas produzidas por *Saccharicola* sp., um fungo endofítico isolado de *Eugenia jambolana*. 35a Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Quimica. Brasil. 1p.
- Charnley KA and Collins AS. 2007. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. Pp: 159-187. *In: Kubicek PC and Druzhinina SI (eds.). The Mycota: environmental and microbial relationship. Vol 4. Springer Berlin Heidelberg, Germany. 360p.*
- Charnley KA. 1997. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. Pp: 185-201. *In: Wicklow and Sodertröm (eds.). The Mycota, Environmental and microbial relationships. Vol 4. Springer Berlin Heidelberg, Germany.*

- Cho EM, Boucias D and Keyhani NO. 2006. EST analysis of cDNA libraries from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Fungal cells sporulating on chitin and producing oosporein. *Microbiology* 152: 2855-2864.
- Costa JF, Cosio W, Cardenas M, Yabar E y Gianoli E. 2009. Preferencia de la polilla de la quinua: *Eurysacca melanocampta* Meyrick (Lepidóptera: Gelechiidae) por dos variedades de quinua (*Chenopodium quinoa*), en ensayos de olfatometría. *Chilean Journal of Agricultural Research* 69:71-78.
- Cuthbertson AGS, Walters KFA and Northing P. 2005. The susceptibility of immature stages of *Bemisia tabaci* to the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* on tomato and verbena foliage. *Mycopathologia* 159: 23-29.
- Ellsworth P and Martínez-Carrillo JL. 2001. IPM for *Bemisia tabaci*: a case of studio in North America. *Crop Protection* 20:853-869.
- Eriksson EO and Hawksworth LD. 2003. *Saccharicola*, a new genus for two *Leptosphaeria* species on sugar cane. *Mycologia* 95: 426-433.
- Enkegaard A and Broodsgaard. FH. 2006. Biocontrol in protected crops: is lack of biodiversity a limiting factor?. Pp: 97-99. *In: An ecological and societal approach to biological control*. Springer®. Chapter 7.USA
- Faria M and Wraight SP. 2001. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. *Crop Protection* 20: 767-778.
- Fernández M y Miranda I. 2005. Comportamiento de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Psyllidae). Parte III. Relación entre el ciclo de vida y el brote vegetativo foliar. *Revista Protección Vegetal* 20:161-164.
- Franco CKG, Rodríguez NSR, Cervantes MJF y Barranco FJE. 2011. Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. *Sociedades Rurales, Protección y medio ambiente* 11(22): 143-160.
- Fransen JJ. 1990. Natural enemies of whiteflies, fungi. Pp: 187-210. *In: Gerling D (ed.). Whiteflies: their bionomics, pest status and management*. Intercept. Andover, UK. 348p.
- Gindin G, Geschout UN, Raccah B and Barash I. 2000. Pathogenicity of *Verticillium lecanii* to different developmental stages of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Phytoparasitica* 28: 229-239.
- Govinda RMB, Thirunavukkarasu N, Suryanarayanan TS, Ravishankar JP, el Gueddari NE and Moerschbacher BM. 2011. Chitinolytic enzymes from endophytic fungi. *Fungal Diversity* 47: 43-53.
- Graftón CEE, Godfrey KE, Rogers ME, Childers CC and Stansly PA. 2010. Asian citrus psyllid. University of California Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 8205.USA.

- Hall DG and Albrigo LG. 2007. Estimating the relative abundance of flush shoots in citrus, with implications on monitoring insects associated with flush. *HortScience* 42: 364-368.
- Hamdi F, Fargues J, Ridray G, Jeannequin B and Bonato O. 2011. Compatibility among entomopathogenic hyphocreales and two beneficial insects used to control *Trialeurodes vaporariorum* in Mediterranean greenhouses. *Journal of Invertebrate Pathology* 108:22-29.
- Hernández FLM, López AJJ, Velázquez MJJ, Urías LMA, Gómez JR y Róbles BA. 2013. Eficacia biológica de compuestos químicos de bajo impacto ambiental aplicados al suelo y follaje contra *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en *Citrus latifolia* Tanaka. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4: 687-700.
- Huang CH, Tsai MY and Wang CL. 1984. Transmission of citrus likubin by a psyllid, *Diaphorina citri*. *Journal of Agricultural Research of China* 33: 15-72.
- Huffaker CB. 1985. Biological control in integrated pest management: an entomological perspective. Pp: 13-23. In: Hoy MA and Herzog DC (eds.). *Biological control in agriculture IPM systems*. Academic Press, INC, New York. 575p.
- Jun KJ and Chin KK. 2008. Selection of a highly virulent isolate of *Lecanicillium attenuatum* against cotton aphid. *Journal of Asian-Pacific Entomology* 11:1-4.
- Kaiser WJ, Ndimande BN and Hawksworth DL. 1979. Leaf-scorch disease of sugar cane in Kenya caused by a new species of *Leptosphaeria*. *Mycologia* 71:479-492.
- Kanagaratnam P, Hall RA and Burges HD. 1982. Control of glasshouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* by an "aphid" strain of the *Verticillium lecanii*. *Annals of Applied Biology* 100: 213-219.
- Kwan DH and Schulz F. 2011. The stereochemistry of complex polyketide biosynthesis by modular polyketide synthases. *Molecules* 16: 6092-6115.
- Landa Z, Osborne LS, López F and Eyal J. 1994. A bioassay for determining pathogenicity of entomogenous fungi on whiteflies. *Biological Control* 4:341-250.
- Láska P, Betlach J and Havránková M. 1982. Resistance to the glasshouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum* Westw.) in sweet pepper (*Capsicum annum* L.). *Euphytica* 31: 977-980.
- López LV y Börge HJ. 2001. Biodiversidad del suelo: control biológico de nematodos fitopatógenos por hongos nematófagos. *Cuaderno de biodiversidad* No 6. pp: 12-15.
- Macías FA, Santillán OC y Robles BA. 2012. Casos selectos de resistencia a insecticidas en moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en el mundo. *Bio Ciencias* 2: 4-16.

- Martin JH. 1987. An identification guide to common whitefly pest species of the world (Homopt: Aleyrodidae). *Tropical Pest Management* 33: 298-322.
- Meade DI and Byrne DN. 1991. The use of *Verticillium lecanii* against submarginal instars of *Bemisia tabaci*. *Journal of Invertebrate Pathology* 57: 296-298.
- Mellor HE, Bellingham J and Anderson M. 1997. Spectral efficiency of the glasshouse *Trialeurodes vaporariorum* and *Encarsia formosa* its hymenopteran parasitoid. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 83: 11-20.
- Michaud JP. 2004. Natural mortality of asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. *Biological Control* 29: 260-269.
- Morales FJ and Jones PG. 2004. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research* 100: 57-65.
- Morales JF, Cardona C, Bueno JM y Rodríguez I. 2006. Manejo integrado de enfermedades de plantas causadas por virus transmitidos por moscas blancas. CIAT, Colombia. 43p.
- Orduño CN. 2015. Selección de un hongo entomopatógeno para el control biológico de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). Tesis Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx. 91p.
- Ortíz CM, Alatorre-Rosas R, Ortega AL, Ortiz CA, Alvarado CS, Ibarra SS y Santillán OC. 2011. Hongos entomopatógenos para el control de moscas blancas (*Bemisia tabaci* Gennadius, *Bemisia argentifolii* Bellows and Perring y *Trialeurodes vaporariorum* Westwood). *Naturaleza y Desarrollo* 9: 1-10.
- Osuna AE. 1995. Morfología del exoesqueleto de los insectos. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas, Venezuela. 73p.
- Pérez-Íñigo C. 1997. Acari: oribatei, gymnonota I. Pp: 16-22. In: Ramos MA (ed.). Fauna ibérica. Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC. Vol.9. Madrid, España. 374p.
- Pineda-Guillermo S y Alatorre-Rosas R. 1995. Potencialidad de los hongos entomopatógenos *Verticillium lecanii*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Beauveria bassiana* sobre la mosquita blanca *Trialeurodes vaporariorum*. Pp: 77-78. In: Memoria XVIII Congreso Nacional de Control Biológico y I Congreso Americano de Control Biológico. Chiapas, México. 149p.
- Pucheta DM, Flores MA, Rodríguez NS, de la Torre M. 2006. Mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia* 31(12): 856-860
- Quesada-Moraga E, Maranhao AAE, Valverde-García P and Santiago-Álvarez C. 2006. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. *Biological Control* 36: 274-287.

- Roberts DW and Humber RA. 1981. Entomogenous fungi. Pp: 201-236. *In*: Cole GT and Kendrick B (eds.). Biology of conidial fungi. Academic Press, New York. USA.
- Roberts DW, Fuxa JR, Gaugler R, Goettel MS, Jacques R and Maddox J. 1991. Use of pathogens in insect control. Pp: 243-278. *In*: Pimentel D (ed.). CRC handbook of pests management in agriculture. CRC Press, Florida, USA. 579p.
- Rogers ME and Stansly PA. 2006. Biology and management of the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, in Florida citrus. University of Florida, IFAS. Publ. 739. USA. 6p.
- Rojas JD, Sette LD, de Araujo WL, Lopes MS, da Silva LF, Furlan RL and Padilla G. 2011. The diversity of polyketide synthase genes from sugarcane-derived fungi. *Microbial Ecology* 63: 556-577.
- Sánchez-Peña SR. 2014. Uso de hongos entomopatógenos en control biológico. Pp: 274-278. *In*: González HH, Rodríguez LE y Lomelí FJF (eds.). Memorias del XXV Curso Nacional de Control Biológico, Yucatán, México. 306p.
- Scorsetti AC, Humber RA, de Gregorio C and López LCC. 2008. New records of entomopathogenic fungi infecting *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum*, pest of horticultural crops, in Argentina. *Bio Control* 53: 787-796.
- Silva VM. 2015. *Saccharicola* sp., agente de control biológico del tule (*Typha domingensis* Pers). Tesis Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx. 56p.
- Singer MC. 2000. Reducing ambiguity in describing plant-insect interactions: “preference”, “acceptability” and “electivity”. *Ecological Letters* 3:159-162.
- Srivastava D. 2009. Prospective role of insecticides of fungal origin. *Entomology Research* 39: 341-355.
- Subandiyah S, Nikoh N, Sato H, Wagiman F, Tsuyumu S and Fakatsu T. 2000. Isolation and characterization of two entomopathogenic fungi attacking *Diaphorina citri* (Homoptera, Psylloidea) in Indonesia. *Mycoscience* 41: 509-513.
- Tanaka K, Hirayama K, Yonezaka H, Sato G, Toriyabe A, Kudo H, Hashimoto A, Matsumura M, Harada Y, Kurihara Y, Shirouzu T and Hosoya T. 2015. Revision of the *Massarineae* (*Pleosporales*, *Dothideomycetes*). *Studies in Mycology* 82: 75-136.
- Tiwari S, Mann RS, Rogers ME and Stelinski LL. 2011. Insecticide resistance in field populations of asian citrus psyllid in Florida. *Pest Management Science* 67: 1258-1268.
- Torres-Barragán A, Anaya AL, Alatorre-Rosas R and Toriello C. 2004. Entomopathogenic fungi from “El Eden” Ecological Reserve, Quintana Roo, México. *Mycopathologia* 158: 61-71.

- Torres E. 2007. Biocontrol de plagas agrícolas y enfermedades de las plantas. Fundamentos y casos experimentales de biotecnología moderna. Ediciones Bolívar. 2a edición. pp. 519-524.
- Uc-Argüelles AK, Pérez-Moreno J, Ayala-Escobar V y Zavaleta-Mejía E. 2017. Antagonismo de *Saccharicola* sp. contra fitopatógenos de la raíz de chile jalapeño (*Capsicum annuum*). Revista Mexicana de Fitopatología 35: 263- 283.
- Van Lenteren JC and Noldus LP. 1990. Whiteflies-plant relationships: behavioral and ecological aspects. Pp: 47-89. *In*: Gerling D (ed.). Whiteflies: Their bionomics, pest status and management. Intercept. Andover, UK.
- Van Lenteren JC, Van Roermund HJW and Sütterlin S. 1996. Biological control of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) with the parasitoid *Encarsia formosa*: how does it work?. Biological Control 6: 1-10.
- Vega FE, Goettel MS, Blackwell M, Chandler D, Jackson MA, Keller S, Korke M, Maniania NK, Monzón A, Ownley BH and Pell JK. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. Fungal Ecology 2: 149-159
- Wintermantel MW. 2004. Progress on management and control of criniviruses in tomato. USDA-ARS. Archives of Virology. Publ.150. USA. 3p.
- Wraight SP, Carruthers RI, Jaronski ST, Bradley CA, Garza CJ and Wraight SG. 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. Biological Control 17: 203-217.
- Zhu Y, Pan J, Qiu J and Guan J. 2008. Isolation and characterization of a chitinase gene from entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. Brazilian Journal of Microbiology 39: 314-320.