



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DE COCHINILLA ROSADA DEL HIBISCO *Maconellicoccus hirsutus* Green

KARLA HAYDEÉ IBARRA CORTÉS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

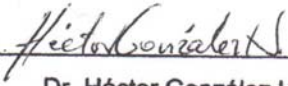
MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2011


La presente tesis titulada: **SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DE COCHINILLA ROSADA DEL HIBISCO (*Maconellicoccus hirsutus* Green)** realizada por el alumna, **KARLA HAYDEÉ IBARRA CORTÉS**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

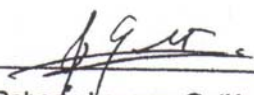
**MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

Consejero: 
Dr. Héctor González Hernández

Asesor: 
Dr. Ariel Wilbert Guzmán Franco

Asesor: 
Dr. Javier Suárez Espinosa

Asesor: 
Dr. Roberto Lezama Gutiérrez

Montecillo, Texcoco, México, febrero 2011

DEDICATORIA

A mi hija Maya por ser ese faro que llegó a iluminar mi vida.

A mi esposo Luis Eduardo Joya Amézquita por todo su amor y apoyo para realizar este sueño juntos.

A mi padres Elvia Cortés Salazar y Salvador Ibarra Moreno por creer en mí y su amor incondicional.

A mis hermanos y sobrinos: Verónica (Alondra y Max), Cristián (Maday, Rony, y Marlyn), Oscar, Laura, Luis, Carolina, Susana y Leonardo por estar siempre conmigo y su amor.

A mis amigos Angélica V. Ríos, Juan Chávez, Sarita Márquez, Vanessa Toscano, Gloria Rodríguez, Gloria Bayardo, Haidel Vargas Madrìz, Martha Olivia Lázaro, Jorge Hernández, Salvador Hernández, Ismael Tucuch y Flor García por su amistad y cariño.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme realizar un objetivo más en mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Colegio de Postgraduados por prepararme como profesional y a sus profesores por compartirme de su aprendizaje.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT): Proyecto Nayarit 2007/CO4/81795, Tecnología Para el Control Biológico de la Cochinilla Rosada del Hibisco (*Maconellicoccus hirsutus* Green) en Nayarit por el financiamiento.

A la Universidad Autónoma de Nayarit por el apoyo en infraestructura para la realización de la presente investigación.

Al Laboratorio Regional de Reproducción de Agentes de Control Biológico del Programa CRH, DGSV, SENASICA, SAGARPA por proporcionar los insectos.

Al Dr. Héctor González Hernández por creer en mí y su invaluable apoyo.

Al Dr. Ariel W. Guzmán Franco por su asesoría y disposición en todo momento para que esta investigación culminará satisfactoriamente.

Al Dr. Javier Suárez Espinosa por sus recomendaciones para el buen desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Roberto Lezama Gutiérrez por la revisión y sugerencias a esta investigación.

Al Dr. Agustín Robles por su apoyo para el desarrollo de este trabajo.

Al M.C Jorge Valdez Carrasco por su disposición y tiempo para el procesamiento de imágenes.

A la Dra. Raquel Alatorre Rosas por incursionarme en la investigación de los hongos entomopatógenos.

A la M.C. Nuvia Cruz Orduño por su asesoría y recomendaciones para esta investigación.

A mis compañeros del Laboratorio de Patología de Insectos por todos sus consejos para mejorar este trabajo.

SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DE COCHINILLA ROSADA DEL HIBISCO *Maconellicoccus hirsutus* Green

Karla Haydeé Ibarra Cortés, M.C

Colegio De Postgraduados, 2011

La cochinilla rosada del hibisco (CRH), *Maconellicoccus hirsutus*, es una plaga importante a nivel mundial que afecta diversos cultivos. Las estrategias más usadas para su control son el químico, y el biológico mediante parasitoides y depredadores. Sin embargo, el uso de hongos entomopatógenos a pesar de ser una herramienta muy importante, ha sido muy poco estudiado. Con base en esto, diversos experimentos fueron realizados para seleccionar un aislamiento para el control de esta plaga. Se estudió el efecto de la temperatura (15, 20, 25 y 30 °C) en el desarrollo *in vitro* de 16 aislamientos de las especies *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii* y *Paecilomyces fumosoroseus*. Posteriormente, se estimó la susceptibilidad de ninfas de tercer instar de CRH hacia 8 aislamientos, para finalmente estimar la esporulación *in vivo* de siete aislamientos. En general, los aislamientos de *M. anisopliae* presentaron mayor crecimiento a 25 y 30°C, mientras que aislamientos de *B. bassiana* alcanzaron su máximo crecimiento a 20 y 25°C y los aislamientos de *P. fumosoroseus* y *L. lecanii* su mayor crecimiento fue a 15 y 20°C. Se encontró que todos los aislamientos ocasionaron mortalidad en ninfas de CRH; el aislamiento MA65 (*M. anisopliae*) logró la mayor mortalidad (60%) y la menor mortalidad el aislamiento ARSEF974 (*L. lecanii*) con 28%. El aislamiento con la mayor producción *in vivo* de conidios fue MA65, y el que menor cantidad de conidios produjo fue PAE (*P. fumosoroseus*). Los resultados señalan al aislamiento MA65 como el candidato idóneo para el control de CRH.

Palabras clave: CRH, hongos entomopatógenos, desarrollo *in vitro*, susceptibilidad

ABSTRACT

The pink hibiscus mealybug (PHM) *Maconellicoccus hirsutus*, is an important worldwide insect pest species affecting many crops. Amongst the most used control strategies are chemical and biological using predators and parasitoids. Considering that entomopathogenic fungi are a promising alternative control strategy, little has been done to study them. Based on this, different experiments were carried out to select an isolate for the control of this insect species. Firstly, the effect of temperature (15, 20, 25 and 30 °C) on the *in vitro* development of 16 isolates of the species *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii* y *Paecilomyces fumosoroseus* were investigated. Secondly, the susceptibility of third instar nymphs of PHM was determined against a reduced number of isolates (eight) from all fungal species. Finally, using seven isolates, the *in vivo* conidia production on third instar nymphs was estimated. Overall, *M. anisopliae* isolates obtained the largest *in vitro* development at 25 and 30 °C, *B. bassiana* isolates at 20 and 25 °C, *P. fumosoroseus* isolates and *L. lecanii* at 15 and 20 °C. Third instar nymphs of PHM were susceptible to all evaluated isolates, but isolate MA65 (*M. anisopliae*) produced the largest mortality (60%) and the isolate ARSEF974 (*L. lecanii*) the smallest mortality (28%). Isolate MA65 produced the largest conidia number on PHM nymphs, and the least number of conidia by isolate PAE (*P. fumosoroseus*). Isolate MA65 resulted on the most promising isolate to further development as a microbial control agent of PHM.

Key Words: PHM, entomopathogenic fungi, *in vitro* development, susceptibility.

CONTENIDO	PÁG.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y METODOS	4
2.1 Aislamientos.	4
2.2 Cultivos monospóricos.	4
2.3 Conservación de aislamientos.	5
2.4 Efecto de la temperatura en el crecimiento <i>in vitro</i> de aislamientos de hongos entomopatógenos.	7
2.4.1 Colonias de hongos.	7
2.4.2 Diseño experimental.	8
2.4.3 Análisis estadístico.	8
2.5 Susceptibilidad de ninfas de tercer instar de CRH hacia aislamientos seleccionados de hongos entomopatógenos.	9
2.5.1 Aislamientos.	9
2.5.2 Ninfas de tercer instar de CRH.	9
2.5.3 Obtención de suspensiones de conidios.	9
2.5.4 Procedimiento de bioensayo.	10
2.5.5 Diseño experimental y análisis de datos.	11
2.6 Estimación de la producción de conidios <i>in vivo</i> .	12
2.6.1 Diseño experimental y análisis de datos.	13
3. RESULTADOS	14

3.1 Efecto de la temperatura en el crecimiento <i>in vitro</i> de aislamientos de hongos entomopatógenos.	14
3.2 Susceptibilidad de ninfas de tercer instar de CRH hacia aislamientos seleccionados de hongos entomopatógenos.	17
3.3 Estimación de la producción de conidios <i>in vivo</i> .	18
4. DISCUSIÓN	19
5. LITERATURA CITADA	25

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	PÁG.
Cuadro 1. Aislamientos de <i>Beuaveria bassiana</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Lecanicillium lecanii</i> y <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> .	6
Cuadro 2. Aislamientos de hongos entomopatógenos seleccionados para estudiar la susceptibilidad de ninfas de CRH.	10
Figura 1. Crecimiento micelial acumulado de los 16 aislamientos expresado en mm ² . Los perfiles de crecimiento son el valor promedio para cada día de medición a 15 °C.	15
Figura 2. Crecimiento micelial acumulado de los 16 aislamientos expresado en mm ² . Los perfiles de crecimiento son el valor promedio para cada día de medición a 20°C.	15
Figura 3. Crecimiento micelial acumulado de los 16 aislamientos expresado en mm ² . Los perfiles de crecimiento son el valor promedio para cada día de medición a 25 °C.	16
Figura 4. Crecimiento micelial acumulado de los 16 aislamientos expresado en mm ² . Los perfiles de crecimiento son el valor promedio para cada día de medición a 30 °C.	16
Figura 5. Proporción de mortalidad de los aislamientos sobre ninfas de tercer instar de CRH. Las barras de error representan límites de confianza del 95% transformadas a partir de la escala logística.	17
Figura 6. Número de conidios totales producidos por los aislamientos evaluados en cadáveres de CRH. Los valores son la media de todas las repeticiones por aislamiento. Las barras de error representan la desviación estándar de la media.	18

1. INTRODUCCIÓN

La cochinilla rosada del hibiscus (CRH) *Maconellicoccus hirsutus* Green (Hemiptera: Pseudococcidae), fue originalmente descrita como *Phenacoccus hirsutus* en la India por Green en 1908 y posteriormente se dispersó en Asia y África (Williams 1958). En 1983 la CRH se introdujo en Hawaii, EUA, en 1984 se reporta para Guam, en 1994 se propagó en 25 territorios del Caribe, Guayana y Venezuela, al norte de Bahamas, Belice y al oeste de California, EUA Kairo *et al.* (2000) y en Puerto Rico en 1997 (Michaud *et al.* 2000).

En México, el primer reporte es en Mexicali, Baja California en 1999, en 2004 se reportó su presencia en Bahía de Banderas, Nayarit y Puerto Vallarta, Jalisco. En 2006, su presencia se extendió hacia otros municipios del norte de Nayarit y Jalisco así como en Chahuites, Oaxaca (DGSV-DPF 2008). Actualmente está presente en los estados de Quintana Roo, Guerrero, Chiapas, Colima y Sinaloa (SENASICA 2009).

Uno de los factores más importantes por la cual la CRH es considerada de importancia económica, es su amplio rango de hospederos, ya que ataca a más de 200 especies de plantas en 70 familias, los cuales incluyen cultivos agrícolas, ornamentales y forestales. Los daños que ocasiona la CRH son por la succión directa de la savia y por la inyección directa de saliva tóxica (Meyerdirk *et al.* 2003).

Los síntomas que se pueden observar en plantas atacadas son malformación en brotes y hojas, donde éstas últimas presentan arrosamiento, se detiene su crecimiento y las flores se secan y caen; además los frutos se deforman e incluso pueden debilitarse y caer prematuramente de la planta (Meyerdirk *et al.* 2003).

Existen reportes del estudio de parasitoides como *Anagyrus kamali* Moursi (Hymenoptera: Encyrtidae) como posible controlador biológico de CRH (Roltsch *et al.* (2006); García-Valente *et al.* (2009); Reddy *et al.* (2009) y el depredador *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae), los cuales han mostrado un control efectivo de la CRH (Ranjan 2006).

Sin embargo, aún es necesario explorar otras alternativas de manejo de esta plaga y mantener su población en niveles que no ocasionen daños económicos. Los hongos entomopatógenos pueden ser una alternativa de manejo de la CRH debido a su capacidad de infectar rápido en condiciones de laboratorio en comparación con otros entomopatógenos, así como su fácil producción comercial en medios artificiales y la aplicación en campo con equipo convencional (Moore 1993; Butt *et al.* 2001).

Sin embargo, antes de incluir a hongos entomopatógenos en un programa de control microbiano, son necesarios varios estudios que evalúen su verdadero potencial, como virulencia, esporulación *in vivo*, velocidad de infección Posada & Vega (2005), persistencia, efecto en insectos benéficos, interacción con otros organismos de control biológico y finalmente la interacción de todos estos atributos con factores abióticos como temperatura, radiación solar, humedad relativa, entre otros (Inglis *et al.* 2001).

Hasta donde se sabe, existen pocos trabajos que estudien la relación patogénica de la CRH y hongos entomopatógenos, como los de Ahmed & Shahzad (2007); Uma-Devi *et al.* (2008), en donde en ambos reportes, se estudió únicamente la virulencia de aislamientos hacia la CRH. Sin embargo, es necesario un mayor número de estudios que no incluyan solamente mortalidad Posada & Vega (2005), si no factores adicionales como esporulación, desarrollo *in vivo* e *in vitro*, etc., que permitan la selección de aislamientos con mayor potencial para ser desarrollados e incluidos en programas de manejo microbiano.

Considerando lo anterior, se llevó a cabo una serie de experimentos para poder seleccionar aislamientos de hongos entomopatógenos con el mayor potencial para el control de la CRH, mediante el siguiente objetivo general.

OBJETIVO GENERAL

Seleccionar aislamientos con mayor potencial para el control de la cochinilla rosada del hibisco.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar el efecto de la temperatura en el desarrollo *in vitro* de aislamientos seleccionados de hongos entomopatógenos.
- Estimar la susceptibilidad de ninfas de CRH hacia la infección de aislamientos seleccionados de hongos entomopatógenos.
- Estimar la capacidad de esporulación *in vivo* de diferentes aislamientos de hongos entomopatógenos en ninfas tercer instar de CRH.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Parte de la presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología de Insectos, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, así como en el Laboratorio de Prácticas de la Preparatoria 10 de la UAN, Ejido Valle de Banderas, Bahía de Banderas y en el Laboratorio de Parasitología, Facultad de Agricultura, de la Universidad Autónoma de Nayarit, Tepic, Nayarit.

2.1 Aislamientos

Los 16 aislamientos empleados en esta investigación (Cuadro 1), se encuentran en las colecciones de hongos entomopatógenos del Colegio de Postgraduados y la Universidad de Colima. Todos se encuentran bajo crio-preservación a -80 °C.

2.2 Cultivos monospóricos

El procedimiento para todos los aislamientos fue el mismo. De una placa de agar dextrosa Sabouraud (ADS) (BIOXON®), con una colonia de hongo con 15 días posteriores a su inoculación, se tomó con la ayuda de un asa bacteriológica, una cantidad no cuantificada de conidios. Estos fueron depositados en frascos de vidrio con tapa de rosca en 20 mL de Tween 80 al 0.03%, el frasco fue agitado durante tres minutos con un vortex para obtener una suspensión homogénea.

Posteriormente, se tomó una alícuota de 50 µL y se depositó en la parte central de una caja de Petri con 15 mL de agar-agua al 1.5 %. Con la ayuda de una varilla de vidrio estéril en forma de “L”, se dispersó la alícuota en toda la superficie de la placa de agar-agua. Este procedimiento se realizó por duplicado para cada aislamiento. Todas las cajas fueron incubadas a 25 °C en total oscuridad durante 24 horas.

Al término de las 24 horas, aún con la caja cerrada y con la ayuda de un microscopio estereoscópico, se localizaron en cada caja, aquellos conidios que estuvieran aislados de otros conidios y que hayan germinado.

Estos conidios fueron marcados encerrándolos en un círculo mediante un marcador de punto fino, dicho círculo se realizó en la base de la caja de Petri.

Una vez seleccionados los conidios con las características previamente descritas, y dentro de una campana de flujo laminar, se extrajo la parte de la placa de agar-agua marcada previamente mediante una navaja estéril y se transfirió a una placa de ADS. El círculo de agar-agua con el conidio se colocó en la placa de ADS de manera invertida. El número de placas con conidios individuales fue variable para cada aislamiento. Del total de cajas producidas de esta manera, se seleccionó al azar una sola caja, la cual fue posteriormente preservada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ siguiendo con la metodología que a continuación se describe.

2.3 Conservación de aislamientos

Todos los aislamientos se crio-preservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. El procedimiento fue el mismo para todos los aislamientos y se realizó bajo una campana de flujo laminar con un cultivo en medio ADS con 15 días posteriores a su inoculación, e incubado a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en total oscuridad. Se extrajeron varios círculos de 5 mm de diámetro por medio de un sacabocados. Entre 4 y 5 círculos se depositaron en crio-viales de 2 mL de volumen (CORNING®) con 1 mL de glicerol al 10% estéril, en caso necesario se añadió más glicerol al 10% estéril para ajustar el volumen final en el crio-vial aproximadamente a 1.8 mL. Todos los crio-viales se colocaron en un ultracongelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Cuadro 1. Aislamientos de *Beuaveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii* y *Paecilomyces fumosoroseus*. Aislamientos con prefijo ATCC pertenecen a la colección de aislamientos American Type Culture Collection, EUA. Aislamientos con el prefijo ARSEF, pertenecen a la colección de aislamientos de Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi, EUA.

Especie	Aislamiento	Huésped	Lugar de origen
<i>B. bassiana</i>	BB1	Hymenoptera	Jalisco, México
	BB2	<i>Scyphophorus acupuntatus</i>	Jalisco, México
	BB88	<i>Hypothenemus hampei</i>	Oaxaca, México
	GCO7	<i>Phyllophaga</i> spp.	San Lorenzo, Jerecuaro, Guanajuato, México
	GHA	Producto comercial Mycotrol®	
<i>M. anisopliae</i>	GCO2	<i>Phyllophaga</i> spp.	Puruagua, Jerecuaro, Guanajuato, México
	MA65	<i>Aneolamia posticata</i>	Veracruz, México
	MA68	<i>Aneolamia posticata</i>	Quintana Roo, México
	MA129	<i>Tetranychus urticae</i>	Tecomán, Colima, México
	MA130	<i>Tetranychus urticae</i>	Tecomán, Colima, México
<i>L. lecanii</i>	ATCC26854	<i>Lecanium corni</i>	Czechoslovakia
	ARSEF974	Áfidos	Venezuela
	ARSEF2009	<i>Toxoptera citricida</i>	Tucumán, Argentina
<i>P. fumosoroseus</i>	PAE	Producto comercial Pae-Sin®	
	PFR4	<i>Bemisia</i> sp.	Tecomán, Colima, México
	PFR16	<i>Bemisia tabaci</i>	Yucatán, México

2.4 Efecto de la temperatura en el crecimiento *in vitro* de aislamientos de hongos entomopatógenos

2.4.1. Colonias de hongos

El efecto de la temperatura en el crecimiento de cada aislamiento fue investigado, donde se midió el área de crecimiento temporal de las colonias a 15, 20, 25 y 30 °C. Cada colonia fue producida de la misma manera. Todos los aislamientos fueron sembrados en cajas Petri de 90 mm de diámetro con 15 ml de ADS e incubados a 25°C durante 15 días. Posteriormente, dentro de una cámara de flujo laminar y con la ayuda de una espátula metálica, se removió la mayor cantidad posible de conidios y micelio de las cajas de Petri.

El material extraído de una caja de Petri, se depositó en un tubo para centrifuga de 50 mL de capacidad y se añadieron 20 mL de Tween 80 estéril al 0.03%. El tubo se agitó con un vortex durante 5 min y el contenido se filtró a otro tubo de centrifuga limpio por medio de una doble capa de pañalina contenida en un embudo de cristal de 5 cm de diámetro. De la suspensión de conidios resultante por aislamiento, se tomó una alícuota de 1 µL y se depositó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL de capacidad con 999 µL de Tween 80 al 0.03%. La suspensión resultante se empleó para estimar la concentración de conidios por mL mediante una cámara de Neubauer y realizar una suspensión con una concentración de 1×10^7 conidios mL^{-1} .

Esta última suspensión fue empleada para volver a inocular placas de ADS e incubarlas por 60 h. A partir de una colonia incubada durante 60 h, círculos de 5 mm de diámetro fueron obtenidos y colocados de manera invertida en el centro de una caja de Petri con 15 mL de ADS y sellada con Parafilm "M" (Pechiney Plastic Packaging Inc. Wisconsin, WI, USA) e incubada en la temperatura seleccionada. Cada colonia fue digitalizada, procesada mediante el paquete Photoshop SC y el área se estimó con el software Image Tool ver 3.0.

El área de cada colonia fue medida cada 24 h durante 20 días o hasta que la colonia alcanzó el borde de la caja de Petri. La temperatura en cada incubadora empleada fue monitoreada durante todo el experimento. Cada combinación aislamiento x temperatura fue repetido en ocho ocasiones de manera que se midió un total de 512 colonias.

2.4.2 Diseño experimental

El diseño experimental usado fue el completamente aleatorio. Los tratamientos fueron: temperaturas (15, 20, 25 y 30 °C) y aislamientos (16) y la variable respuesta fue el crecimiento micelial. La asignación de temperaturas en las cámaras bioclimáticas a las unidades experimentales fue completamente al azar. El experimento contó con cuatro replicas, esto es 64 colonias por temperatura y cada replica fue colocada en un nivel dentro de la cámara bioclimática. Todo el experimento se repitió en dos ocasiones.

2.4.3 Análisis estadístico

Se realizó un análisis longitudinal con modelos de covarianza usando el paquete estadístico SAS versión 9.2. Este tipo de análisis permite comparar el comportamiento del crecimiento micelial de los aislamientos y se consideró las lecturas a través del tiempo para cada temperatura. Se probaron varios modelos de covarianza y se eligió el mejor de acuerdo a los criterios de Akaike y Bayesiano. Los modelos de covarianza estudiados fueron: Matriz no estructurada UN, Estructura de simetría compuesta CS, Estructura autorregresiva de primer orden AR(1) y Estructura autorregresiva de primer orden heterogéneo ARH(1).

Después de seleccionar el modelo de covarianza se realizó la comparación del efecto de los aislamientos en el crecimiento micelial de acuerdo a su comportamiento a través del tiempo (perfil del crecimiento micelial). Lo anterior para cada temperatura y diferencia significativa con un p-value <0.01. Además, se comparó el efecto de la temperatura y aislamiento en el crecimiento micelial. Lo anterior permitió seleccionar a los aislamientos con un mejor crecimiento micelial.

2.5 Susceptibilidad de ninfas de tercer instar de CRH hacia aislamientos seleccionados de hongos entomopatógenos

2.5.1 Aislamientos

De acuerdo a los resultados del experimento anterior, ocho aislamientos, dos de cada especie (Cuadro 2), fueron seleccionados para evaluar los niveles de infección ocasionados en ninfas del tercer instar de CRH. Cabe señalar que este experimento se realizó en las instalaciones de la Preparatoria 10 de la UAN en Valle de Banderas, Bahía de Banderas, Nayarit, ya que la CRH es una plaga cuarentenaria regulada para Nayarit.

2.5.2 Ninfas de tercer instar de CRH

Las ninfas de tercer instar de CRH fueron proporcionadas por el Laboratorio Regional de Reproducción de Organismos Benéficos, Valle de Banderas, Nayarit.

2.5.3 Obtención de suspensiones de conidios

Todas las suspensiones se realizaron a partir de cultivos monospóricos de los aislamientos del Cuadro 2. Los aislamientos fueron recuperados de crio-preservación y la metodología de preparación de las suspensiones de conidios fue la misma para todos los aislamientos. A partir de cultivos con 20 días posteriores a su inoculación en placas de ADS y con la ayuda de una espátula metálica en la cámara de flujo laminar, se removi6 la mayor cantidad posible de conidios y micelio de las cajas de Petri. El material extraído de cuatro a cinco cajas de Petri por aislamiento, se depositaron en un tubo para centrifuga de 50 mL de capacidad y se ańadieron 20 mL de Tween 80 est6ril al 0.03%.

El tubo se agitó con un vortex durante 5 min y el contenido se filtr6 a otro tubo de centrifuga limpio por medio de una doble capa de pańalina contenida en un embudo de cristal de 5 cm de diámetro. De la suspensi6n de conidios resultante por aislamiento, se tom6 una alícuota de 1 μ L y se deposit6 en un tubo Eppendorf de 1.5 mL de capacidad en 999 μ L de Tween 80 al 0.03%.

La suspensión resultante se empleó para estimar la concentración de conidios por mL mediante una cámara de Neubauer. La concentración que se usó en los experimentos fue de 1×10^8 conidios mL^{-1} .

Cuadro 2. Aislamientos de hongos entomopatógenos seleccionados para estudiar la susceptibilidad de ninfas de CRH.

Especie	Aislamiento	Huésped	Lugar de origen
<i>B. bassiana</i>	BB2	<i>Syphophorus acupuntatus</i>	Jalisco, México
	GHA	Producto comercial Mycotrol®	
<i>M. anisopliae</i>	MA65	<i>Aneolamia posticata</i>	Veracruz, México
	MA129	<i>Tetranichus urticae</i>	Tecomán, Colima, México
<i>L. lecanii</i>	ARSEF974	Áfidos	Venezuela
	ARSEF2009	<i>Toxoptera citricida</i>	Tucumán, Argentina
<i>P. fumosoroseus</i>	PAE	Producto comercial Pae-Sin Agrobionsa®	
	PFR16	<i>Bemisia tabaci</i>	Yucatán, México

2.5.4 Procedimiento de bioensayo

El procedimiento de inoculación de todos los aislamientos en ninfas del tercer instar de CRH fue el mismo. Diferentes grupos de 20 ninfas fueron puestos en contacto con discos de 3 cm de diámetro de calabaza moscada japonesa (*Cucurbita moschata* Duchesne var. chirimen), los cuales previamente fueron sumergidos en las suspensiones de conidios a evaluar durante 30 s.

Los discos y las ninfas fueron incubados durante 48 horas dentro de una caja de Petri de 90 mm de diámetro el cual contenía un disco de papel filtro estéril a 25 °C en total oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo, los insectos se transfirieron a discos de calabaza sin inóculo e incubados bajo las mismas condiciones. Un grupo de 20 ninfas fue expuesto a un disco de calabaza sumergido únicamente en Tween 80 al 0.03% y representó el tratamiento testigo.

Todo el experimento se incubó a 25 °C en oscuridad total durante 7 días y la mortalidad se registró diariamente. Los individuos muertos se colocaron en cajas de Petri estériles con un círculo de papel filtro en la base sin humedad adicional durante 2 días y se incubaron a 25 °C. Posteriormente, el papel filtro fue humedecido con agua destilada estéril y vueltas a incubar durante 7 días adicionales para favorecer la esporulación de los hongos y confirmar infección. El criterio para decidir si un insecto estaba infectado fue la observación externa de la esporulación de los cadáveres.

2.5.5 Diseño experimental y análisis de datos

El diseño experimental usado fue el completamente al azar con cuatro replicas y todo el experimento se repitió en tres ocasiones. El tratamiento testigo fue empleado para confirmar que no existió contaminación cruzada y por lo tanto no fue incluido en el análisis estadístico. Los datos fueron analizados mediante regresión logística (asumiendo que los datos tenían una distribución binomial) y un tamaño de muestra igual al número de individuos evaluados. Cada número de individuos muertos fue una proporción del total de individuos evaluados.

En caso necesario, la presencia de una mayor variación de lo esperado bajo el supuesto binomial (sobre-dispersión) fue permitido al comparar la diferencia de la desviación media del tratamiento y la desviación media residual contra la distribución F y no comparando la desviación del tratamiento contra la distribución χ^2 , como normalmente se hace. El análisis estadístico se realizó mediante el programa GenStat ver 8.0.

2.6 Estimación de la producción de conidios *in vivo*

Se utilizaron los aislamientos mencionados (Cuadro 2) excepto el aislamiento GHA de *B. bassiana*. Se emplearon los mismos procedimientos de obtención de suspensiones de conidios e inoculación de insectos descritos anteriormente, con las siguientes modificaciones. Diferentes grupos de 10 individuos fueron expuestos a círculos de calabaza previamente inoculadas con los diferentes aislamientos durante 48 h, posteriormente los individuos tratados fueron transferidos a discos de calabaza libres de inóculo y contenidas en vasos de plástico transparente de 100 mL de capacidad.

El tratamiento testigo consistió de 10 individuos los cuales fueron tratados únicamente con Tween 80 al 0.03 %. Todos los vasos de plástico con los insectos tratados fueron depositados dentro de una caja de plástico transparente de 55 L de capacidad que contenía en la base 1 L de agua destilada estéril para proporcionar una humedad relativa de 90-95%. Las cajas se colocaron sobre una reja metálica, la cual evitó que las cajas estuvieran en contacto con el agua destilada.

La caja de plástico se incubó a 25°C en completa oscuridad. La mortalidad se registró cada 24 h durante 7 días y las CRH muertas se colocaron individualmente en vasos de plástico transparente de 100 mL de capacidad. La tapa de cada vaso tenía un orificio de 2.5 cm de diámetro, el cual fue cubierto con una malla mosquitera, la cual permitió que la humedad relativa lograda en el interior de la caja de 55 L fuera la misma que en el interior de cada vaso de plástico con los cadáveres de CRH.

Así mismo, para evitar diferencias de humedad relativa en el interior de cada uno de los vasos por individuo y entre tratamientos, todos los vasos se colocaron en una sola hilera y nunca se colocó un vaso arriba del otro. De esta manera, se minimizó el posible efecto de variaciones en humedad relativa entre vasos, que podrían haber modificado los niveles de esporulación logrados, de manera que cualquier variación en esporulación fuera atribuible únicamente al factor aislamiento.

Todos los individuos muertos fueron incubados bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, durante 7 días a partir de su muerte. Al término de los 7 días post-muerte, cada uno de los insectos se depositaron dentro de tubos Eppendorf de 600 μ L con 500 μ L de Tween 80 al 0.03%. Los tubos se agitaron durante 10 min con la ayuda de un vortex. Finalmente, los cadáveres fueron retirados de cada tubo y la cantidad de conidios totales contenidos en cada tubo se estimó con una cámara de Neubauer. Todos los individuos que no esporularon o que presentaron desarrollo de otros hongos saprofitos fueron descartados del análisis. El número de individuos por tratamiento, descartados por las razones mencionadas anteriormente, nunca fue mayor al 10%. No se registró infección en los insectos del tratamiento testigo y la mortalidad natural en este tratamiento nunca fue mayor al 10%.

2.6.1 Diseño experimental y análisis de datos

El experimento se realizó con un diseño completamente al azar, con 10 repeticiones (individuos de CRH) por tratamiento y todo el experimento se repitió en dos ocasiones. Los datos fueron transformados mediante transformación de BOX-COX (0.4) para cumplir los requisitos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Posteriormente, los datos de producción de conidios por cadáver infectados con los diferentes aislamientos, fueron comparados mediante ANOVA utilizando el programa GenStat v 8.0.

3. RESULTADOS

3.1 Efecto de la temperatura en el crecimiento *in vitro* de aislamientos de hongos entomopatógenos

No hubo diferencias entre los resultados de las dos repeticiones ($P= 1.0000$), lo que permitió que los datos de ambas repeticiones se pudieran combinar para hacer un análisis conjunto y ver efecto de tratamientos. Se encontraron diferencias significativas entre los perfiles de crecimiento de los 16 aislamientos a 15°C ($P= <0.0001$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los aislamientos MA129 y MA130 (*M. anisopliae*) ($P= 1.0000$). El aislamiento que obtuvo el mayor crecimiento fue BB2 de *B. bassiana* seguido de ARSEF974 y ARSEF2009 de *L. lecanii* y el aislamiento que mostró el menor crecimiento fue BB88 de la especie *B. bassiana* (Fig. 1).

Se encontraron diferencias significativas entre los perfiles de crecimiento de los 16 aislamientos a 20 °C ($P= <0.0001$). El aislamiento que presentó el mayor crecimiento micelial fue BB2 (*B. bassiana*), seguido por los aislamientos PAE y PFR16 de *P. fumosoroseus* y el menor crecimiento fue obtenido por el aislamiento BB88 de *B. bassiana* (Fig. 2).

A 25 °C, los perfiles de crecimiento de los 16 aislamientos fueron significativamente diferentes ($P= <0.0001$). Los aislamientos que tuvieron el mayor crecimiento a 25°C fueron MA65, BB2 y MA68. El menor desarrollo fue obtenido en el aislamiento PFR4 de *P. fumosoroseus* (Fig. 3).

Finalmente, se encontraron diferencias significativas entre los perfiles de crecimiento de los 16 aislamientos a 30° C ($P= <0.0014$). Los aislamientos que presentaron el mayor crecimiento de la especie de *M. anisopliae* (MA65, MA68, MA129, MA130 y GC02). El aislamiento con el menor crecimiento fue ATCC26854 de *L. lecanii* (Fig.4).

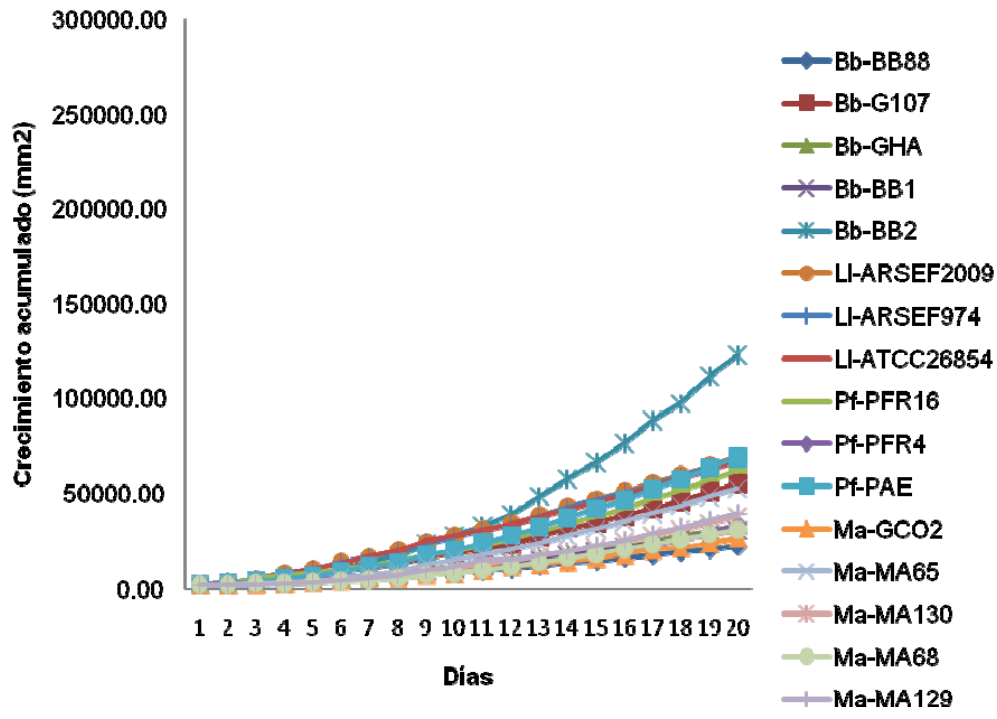


Figura 1. Crecimiento micelial acumulado de los 16 aislamientos expresado en mm². Los perfiles de crecimiento son el valor promedio para cada día de medición a 15 °C.

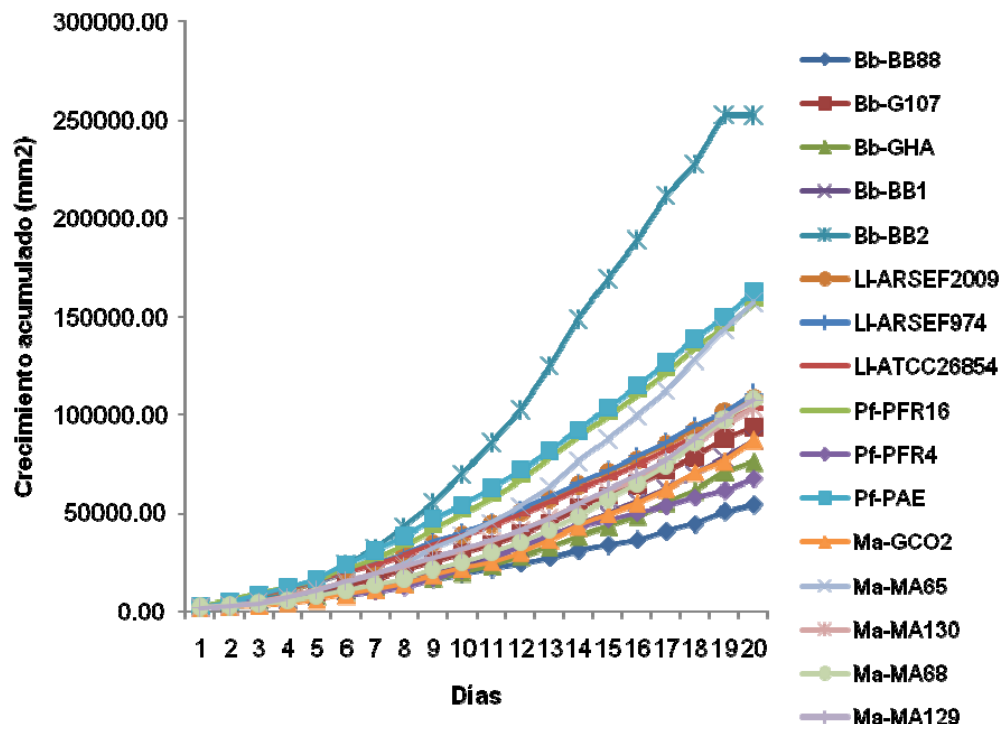


Figura 2. Crecimiento micelial acumulado de los 16 aislamientos expresado en mm². Los perfiles de crecimiento son el valor promedio para cada día de medición a 20 °C.

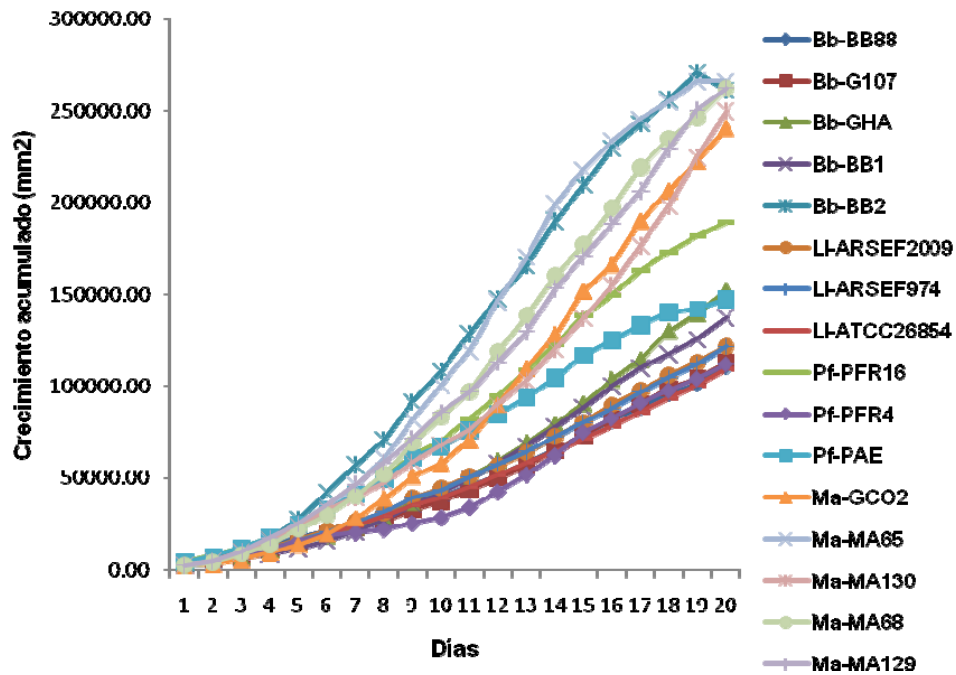


Figura 3. Crecimiento micelial acumulado de los 16 aislamientos expresado en mm². Los perfiles de crecimiento son el valor promedio para cada día de medición a 25°C.

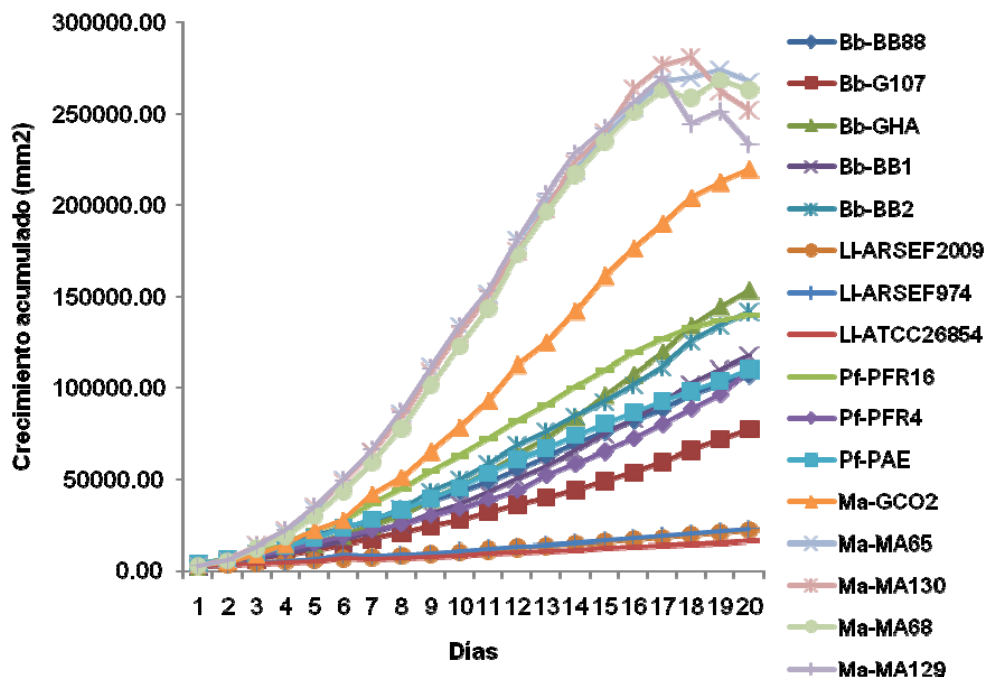


Figura. 4. Crecimiento micelial acumulado de los 16 aislamientos expresado en mm². Los perfiles de crecimiento son el valor promedio para cada día de medición a 30°C.

3.2 Susceptibilidad de ninfas de tercer instar de CRH hacia aislamientos seleccionados de hongos entomopatógenos

Los resultados se analizaron en conjunto debido a que no existieron diferencias significativas entre los datos de las tres repeticiones ($F_{2,93}=2.92$, $P=0.059$). Se encontraron diferencias significativas entre las proporciones de mortalidad ocasionadas por los ocho aislamientos en ninfas de CRH ($F_{7,88}=4.04$, $P<0.001$). Las proporciones de infección por hongos entomopatógenos fueron desde 0.28 hasta 0.6 (Fig. 5). El aislamiento que presentó la proporción máxima de mortalidad de 0.6 (60%) fue MA65 de *M. anisopliae* y la proporción más baja de mortalidad fue por ARSEF974 de *L. lecanii* con 0.28 (28%) (Fig. 5).

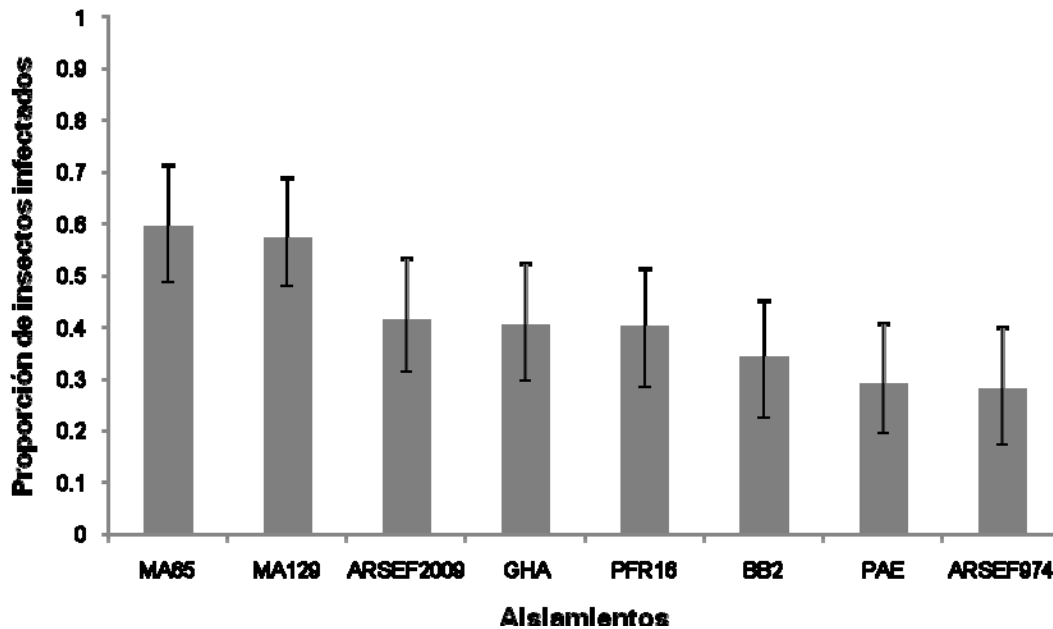


Figura. 5. Proporción de mortalidad de los aislamientos sobre ninfas de tercer instar de CRH. Las barras de error representan límites de confianza del 95% transformadas a partir de la escala logística.

3.3 Estimación de la producción de conidios *in vivo*

Se encontraron diferencias significativas en el número de conidios producidos *in vivo* entre los aislamientos empleados ($F_{6,109} = 2.51$, $P = 0.026$). Se observó que el aislamiento que más conidios produjo fue el MA65 de *M. anisopliae* y el que menos conidios produjo fue el PAE de *P. fumosoroseus* (Figura 6).

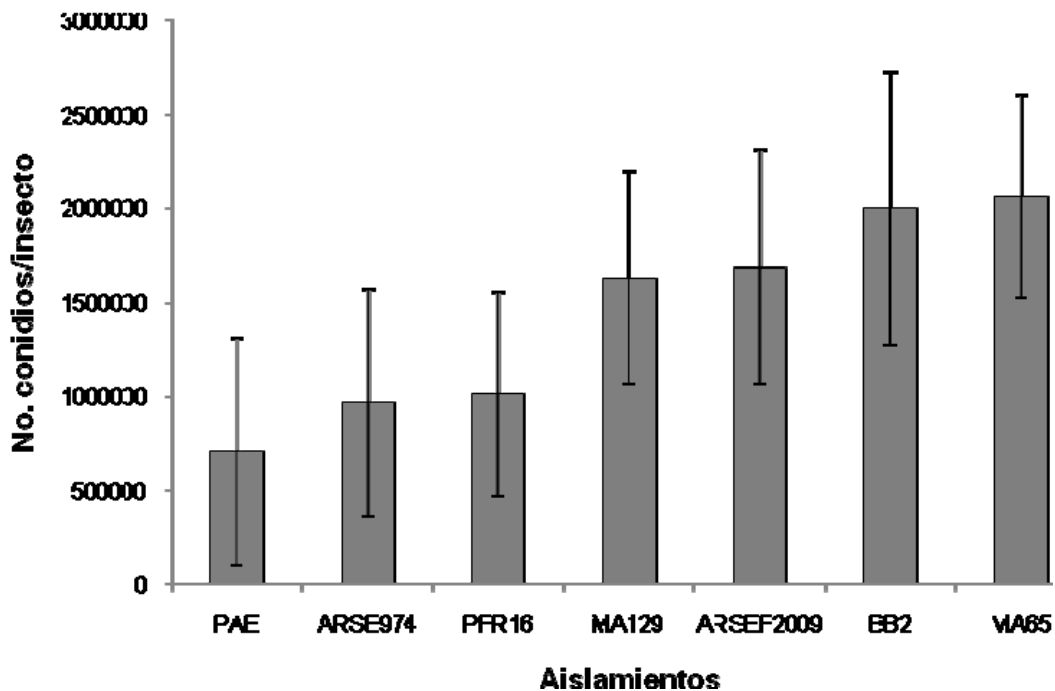


Figura 6. Número de conidios totales producidos por los aislamientos evaluados en cadáveres de CRH. Los valores son la media de todas las repeticiones por aislamiento. Las barras de error representan la desviación estándar de la media.

4. DISCUSIÓN

El éxito de un hongo entomopatógeno como agente de control microbiano depende de una cuidadosa y adecuada selección de una especie y aislamiento (Heale 1988). En este estudio se reporta una serie de experimentos cuyos resultados serán base para la selección de un aislamiento con potencial para el control de CRH.

La temperatura es un factor fundamental en el desarrollo de los hongos entomopatógenos (Tanada & Kaya 1993), por lo que un primer paso hacia la selección de un aislamiento para el control de un insecto plaga es estudiar el efecto de este factor en el desarrollo de estos hongos (Vidal *et al.* 1997; Polar *et al.* 2005). Esto permitió manipular un gran número de aislamientos y tener una base para seleccionar un número reducido de aislamientos para experimentos posteriores.

En general, los aislamientos de la especie *M. anisopliae* fueron los que presentaron el mayor crecimiento micelial y los de la especie *L. lecanii* el menor crecimiento; sin embargo, se detectaron diferencias intra-específicas e interacción con la variable temperatura. En anteriores trabajos se reportan ciertas relaciones entre origen geográfico y preferencia termal Fargues *et al.* (1992); Vidal *et al.* (1997), pero también hay otros trabajos que no encontraron dicha relación (Moorhouse *et al.* 1994; Fargues *et al.* 1997).

En los resultados del presente experimento, es difícil encontrar una relación entre preferencia termal y origen geográfico, ya que no se dispone de datos exactos de las condiciones bajo las cuales se encontraron los aislamientos. Dicha información ha sido sugerida como un requisito importante antes de tratar de establecer la relación entre preferencia termal y crecimiento (Yeo *et al.* 2003).

Como se mencionó anteriormente, se encontraron diferencias entre especies de hongos, pero también entre aislamientos de una misma especie, lo cual pudo ser la causa de no encontrar una relación clara entre origen geográfico y temperatura en el crecimiento radial (Moorhouse *et al.* 1994; Fargues *et al.* 1997).

Los hongos son el grupo más grande de eucariotes haploides (Deacon 1997), los cuales pueden expresar todos sus genes y por lo tanto están expuestos a sufrir mutación. Como resultado, pueden tener diferentes tipos de núcleos en el citoplasma de la hifa. Esto puede dar como resultado que la proporción de cierto tipo nuclear varíe de acuerdo a las condiciones ambientales, dando como resultado aislamientos con núcleos genéticamente diferentes (heterokariosis), con mutación o sin ella en el mismo citoplasma.

Esto permite al hongo acumular mutaciones que pueden estar escondidas de una posible presión de selección y permitir al aislamiento alterar su proporción de núcleos en respuesta a las condiciones prevalecientes (Deacon 1997). Consideramos que esto podría ser la causa de la variación intra-específica encontrada, ya que la heterokariosis podría significar producir aislamientos monospóricos a partir de un solo aislamiento pluriespórico potencialmente muy diferentes entre sí, lo cual se podría acentuar mucho más al trabajar con aislamientos obtenidos de diferentes puntos geográficos.

Por ejemplo, para el caso de *M. anisopliae*, se ha reportado diferentes temperaturas óptimas, desde 25 °C Dimbi *et al.* (2004) hasta 32 °C (Alexandre *et al.* 2006). Ejemplos similares se encuentran con aislamientos del hongo *P. fumosoroseus* (Vidal *et al.* 1997; Hallsworth *et al.* 1999; Fargues *et al.* 2004). Lo mencionado anteriormente refuerza la importancia de que este tipo de investigaciones debe hacerse de manera particular para cada insecto y hábitat, antes de introducirlo dentro de un manejo microbiano en un área determinada.

Sin embargo, los resultados obtenidos lograron el objetivo de permitir seleccionar aislamientos específicos con base en su habilidad de crecer en la mayoría de las temperaturas experimentales y poder continuar con experimentos adicionales para la selección de un aislamiento para el manejo de la CRH. Todos los aislamientos resultaron con diferentes grados de virulencia hacia las ninfas tercer instar de CRH.

Sin embargo, nuevamente los aislamientos de *M. anisopliae* obtuvieron las mortalidades más altas (Fig. 5), lo cual señala a estos aislamientos como agentes potenciales para ser desarrollados como agentes de control biológico de CHR. Estos mismos aislamientos obtuvieron los mayores crecimientos a 25 y 30° C, lo cual concuerda con lo reportado por Doberski (1981) y Moorehouse *et al.* (1994), quienes señalan que los aislamientos de hongos entomopatógenos infectan más rápidamente a la temperatura óptima de desarrollo *in vitro*.

Existen también reportes que indican que la temperatura adecuada de infección es mayor a la temperatura óptima de desarrollo *in vitro* (Thomas & Jenkins 1997). Esta discordancia asegura que un mayor número de experimentos deben realizarse para seleccionar un aislamiento. La mortalidad ocasionada por aislamientos de otras especies de hongos fue similar entre ellas y fue aproximadamente del 30 al 40 %, lo que sugiere que todos los aislamientos tienen la capacidad de infectar a CRH.

Existen reportes de *M. anisopliae* Ahmed *et al.* (2007) y *B. bassiana* Uma Devi *et al.* (2008) infectando a CRH, pero hasta donde se sabe, el presente estudio es el primer reporte de aislamientos de *L. lecanii* y *P. fumosoroseus* infectando a CRH. La susceptibilidad de insectos a varias especies de hongos dentro de un proceso de selección no es común, aunque existen algunos reportes para otras especies de insectos plaga (De Oliveira *et al.* 2004; Pilz *et al.* 2007; Vu *et al.* 2007).

Muchos de los trabajos de selección se hacen con base a varios aislamientos de una misma especie (Quesada-Moraga *et al.* 2006; Santoro *et al.* 2008; Safavi *et al.* 2010). En el caso de los estudios reportados aquí, al no existir reportes de hongos diferentes a *B. bassiana* y *M. anisopliae*, se consideró importante incluir otras especies de hongos. Así mismo, algunos autores aseguran que aislamientos provenientes del mismo hospedante pueden ser más virulentos (Soares *et al.* 1983).

No obstante, al momento de la realización de esos experimentos, no se contó con aislamientos sobre CRH. El hecho de que las ninfas de CRH tengan susceptibilidades muy similares hacia aislamientos de diversas especies es interesante, lo que sugiere que probablemente las diversas poblaciones de CRH no han estado en contacto directo o bajo la presión de selección de aislamientos de hongos entomopatógenos. El desarrollo de cierta tolerancia de insectos hacia el ataque de entomopatógenos ha sido reportado para insectos habitantes de suelo (Tunaz & Stanley 2009).

El suelo posee una alta diversidad de microorganismos, incluyendo entomopatógenos (Keller & Zimmerman 1989), lo cual ejerce una presión constante sobre los insectos habitantes de ese hábitat y como consecuencia, se han reportado mortalidades muy bajas o nulas para algunas especies de plagas rizófagas (Hernández 2010). En el caso de CRH, este es un insecto aéreo, lo cual podría ser una explicación del porqué este insecto presenta una susceptibilidad similar a aislamientos de diversas especies de hongos entomopatógenos.

El aislamiento de *M. anisopliae* MA65 produjo la mayor mortalidad, lo cual indica que esta especie podría ser candidato ideal para ser desarrollado como agente de control microbiano. *Metarhizium anisopliae* produce muchas proteasas St. Leger *et al.* (1986), las cuales junto a una familia de depsipéptidos cíclicos llamados destruxinas, han sido consideradas como responsables de la virulencia de esta especie hacia insectos Charnley & St. Leger (1991), es probable que ésta sea la causa de la elevada virulencia que MA65 mostró sobre CRH; por lo tanto, es necesario determinar sí el aislamiento MA65 produce tales compuestos.

Es difícil explicar porqué no se han presentado infecciones naturales de este insecto por esta especie en particular, se considera que podría ser debido a el hábitat donde el insecto habita, ya que sería difícil que el insecto se ponga en contacto de manera natural con aislamientos de *M. anisopliae*, puesto que éste es un habitante natural del suelo (Meyling & Eilenberg 2007).

Parte importante del proceso de selección de un aislamiento, es conocer diversos atributos como lo es la esporulación *in vivo* Posada & Vega (2005), el cual es un atributo importante porque se asegura la presencia de inóculo aún después de una aplicación artificial (Lomer *et al.* 2001; Posada & Vega. 2005). Considerando esto, es importante realizar estudios que muestren la existencia de este atributo en los aislamientos bajo estudio.

Los resultados de los experimentos realizados muestran que nuevamente el aislamiento MA65 de *M. anisopliae* es el que obtuvo la mayor producción de conidios, seguido por BB2 de *B. bassiana*; mientras que el aislamiento PAE de *P. fumosoroseus*, fue el aislamiento con la menor producción de conidios. Todos los patógenos deben dividir su energía para lograr la infección e invadir a su hospedante y la producción de estructuras de reproducción (conidios).

Si un patógeno completa exitosamente su ciclo y culmina en la producción de propágulos infectivos, se dice que la infección fue exitosa (Ebert and Weisser 1997; Solter *et al.* 2002). Se ha sugerido que un patógeno puede modificar la asignación de recursos entre estos dos aspectos de la biología de un patógeno (producción de propágulos e invasión) como respuesta a un factor externo y como competencia para tratar de sobrevivir (Wargo *et al.* 2007).

Lo anterior sugiere que la variación entre los niveles de producción de conidios *in vivo* entre los aislamientos evaluados, podría ser consecuencia del uso de diferentes estrategias de infección empleados por los aislamientos como mecanismos de supervivencia, de manera que aquellos aislamientos que producen pocos conidios, quizá empleen la mayoría de sus recursos para la infección y pocos recursos a la producción de conidios; sin embargo, esto requiere mayor estudio para poder generar conclusiones más definitivas al respecto.

En conclusión, el estudio de diferentes atributos de un aislamiento para poder seleccionar candidatos a agentes de control microbiano es la mejor estrategia, ya que con esto no solo se asegura que el aislamiento logre infectar al hospedante, sino también que se pueda adaptar a diferentes ambientes y sobre todo, que sea capaz de poder persistir en el ambiente mediante la producción de conidios *in vivo*. A pesar de esto, son necesarios más experimentos para poder seleccionar un aislamiento con mayores probabilidades de éxito en el campo, como persistencia, efecto de la humedad en su biología, etc.

El aislamiento MA65 de *M. anisopliae*, mostró los mejores atributos biológicos para poder ser desarrollado como agente de control microbiano de CRH. *Metarhizium anisopliae* posee un amplio rango de hospedantes, por lo que la especificidad de estos aislamientos es un importante criterio de selección de aislamientos Samson (1988), lo cual sugiere que es importante realizar experimentos para determinar su efecto en otros insectos.

5. LITERATURA CITADA

- AHMED, U. A., S. SHAHZAD. 2007. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* strains on pink hibiscus mealy bug (*Maconellicoccus hirsutus*) affecting cotton crop. Pakistan Journal of Botany 39(3): 967-973.
- ALEXANDRE, T.M., ALVES, L.F.A., NEVES, P.M.O.J., ALVES, S.B. 2006. Effect of temperature and poultry litter in *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) virulence against the lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). Neotropical Entomology 35: 75–82.
- AYALA-ZERMEÑO, M. A. T. MIER, J. SÁNCHEZ ROBLES, C. TORIELLO. 2005. Variabilidad intraespecífica del crecimiento de *Lecanicillium lecanii* (= *Verticillium lecanii*) por efecto de la temperatura. Revista Mexicana de Micología 20: 93-97.
- BUTT, T.M., JACKSON, C.W., MAGAN, N., 2001. Introduction - Fungal Biological Control Agents: Progress, Problems, Potential. pp: 1-8. In: Butt, T.M., Jackson, C.W., Magan, N. (Eds), Fungi as biocontrol agents: Progress, Problems and Potential. CAB International, Wallingford, Oxford, U.K.. 385p.
- DEACON, J.W., 1997. Introduction to Modern Mycology. 3rd ed. Cambridge: Blackwell Science Ltd. 303 p.
- DE OLIVEIRA, R.C., NEVES, P.M.O.J, ALVES, L.F.A. 2004. Entomopathogenic fungi selection to control *Oligonychus yothersi* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) in Paraguay tea crops (*Ilex paraguariensis* St Hill). Neotropical Entomology 33 (3): 347-351.
- CHARNLEY, A.K., ST LEGER R. 1991. The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. pp: 267-283 . In: Cole, G.T.; Hock, H.C. (Eds.). The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Plenum Press, New York. 555p.
- DGSV-DPF. 2008. Apéndice Técnico-Operativo de la Campaña Contra la Cochinilla Rosada del Hibisco (*Maconellicoccus hirsutus* Green). Dirección General de Sanidad Vegetal, Dirección de Protección Fitosanitaria, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (DGSV, DPF, SENASICA, SAGARPA). México, D.F. En prensa.
- DIMBI, S., N. K. MANIANA, S. A. LUX AND J. M. MUEKE. 2004. Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. Biocontrol 49: 83-94.

- DOBERSKY J.W. 1981. Comparative laboratory studies in three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: Effect of temperature and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *Journal Invertebrate Pathology* 37: 195-200.
- EBERT, D. & WEISSER, W.W. 1997. Optimal killing for obligate killers: the evolution of life histories and virulence of semelparous parasites. *Proceedings of the Royal Society of London-B Biological Sciences* 264: 985-991.
- INGLIS, D. G., M. S. GOETTEL., T. M. BUTT AND H. STRASSER. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pest. pp: 23-70. In: T. M. Butt., C. W. Jackson and N. Magan (Eds): *Fungi as biocontrol agents progress, problems and potential*. Cabi Publishing. 385 p.
- FARGUES, J., NK, MANIANIA., JC, DELMAS AND N, SMITS. 1992. Influence de la temperature sur la croissance in vitro d'hyphomycetes entomopathogenes. *Agronomie* 12: 557-564.
- FARGUES, J., GOETTEL, M.S., SMITS, N., OUEDRAOGO, A. & ROUGIER, M. 1997. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia* 89 (3), 383-392.
- FARGUES, J., M. C. BON. 2004. Influence of temperature preferences of two *Paecilomyces fumosoroseus* lineages on their co-infection pattern. *Journal of Invertebrate Pathology* 87: 94-104.
- GARCIA-VALENTE, F., ORTEGA-ARENAS, L.D., GONZALEZ-HERNANDEZ, H., VILLANUEVA-JIMENEZ, J.A., LOPEZ-COLLADO, J., GONZALEZ-HERNANDEZ, A., Y ARREDONDO-BERNAL, H.C. 2009. Natural and induced parasitism of *Anagyrus kamali* against pink hibiscus mealybug on teak shoots in Bahia de Banderas, Nayarit. *Agrociencia* 43 (7): 729-738.
- HALLSWORTH, J.E., NARESH, M. 1999. Water and Temperature Relations of Growth of the Entomogenous Fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *Journal Invertebrate Pathology* 74: 261-266.
- HEALE, J.B. 1988. The potential impact of fungal genetics and molecular biology on biological control, with particular reference to entomopathogens. pp: 211-234. In: Burge, M.N. (Ed.). *Fungi in Biological Control System*. Manchester/New York: Manchester University Press. 555p.
- HERNÁNDEZ LÓPEZ, J., 2010. Virulencia de aislamientos de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (bals.) vuill. y *Metarhizium anisopliae* (metsch.) (Ascomycetes: Hypocreales) en larvas de gallinas ciegas (Coleoptera: Scarabaeidae) y su interacción con algunos factores bióticos y abióticos. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados, México. 45p.

- KAIRO, M. T. K., G. V. POLLARDI., D. D. PETERKIN & V. F. LÓPEZ. 2000. Biological control of the hibiscus mealybug, *Maconellicoccus hirsutus* Green (Hemiptera: Pseudococcidae) in the Caribbean. *Integrated Pest Management Reviews* 5: 242-254.
- KELLER, S., ZIMMERMAN, G. 1989. Mycopathogens of soil insects. pp. 240–270. In: Wilding, N., Collins, N.M., Hammond, P.M., Webber, J.F. (Eds.). *Insect-Fungus Interactions*. Academic Press, London. 344 p.
- LOMER, C.J., BATEMAN, R.P., JHONSON, D.L., LANGEWALD, T.M. 2001. Biological control of locust and grasshoppers. *Annual Review of Entomology* 46: 667-702.
- LUZ C., & J. FARGUES. 1999. Dependence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on high humidity for infection of *Rhodnius prolixus*. *Mycopathologia* 146: 33-41.
- MEYLING, N.V., EILENBERG, J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperature agroecosystems: Potential of conservation biological control. *Biological Control* 43: 145-155.
- MEYERDIRK, D. E., R. WARKENTIN., B. ATTAVIAN., E. GERSABECK., A. FRANCIS., M. ADAMS., AND G. FRANCIS. 2003. Manual del proyecto para el control biológico de la cochinilla rosada del hibisco. Trad. IICA. 2 Ed. San José, Costa Rica. USDA – IICA. Disponible en: http://www.aphis.usda.gov/ppg/manuals/domestic/pdf_files/PHM_Espanol.pdf. (Fecha de revisión: 12 septiembre 2010).
- MICHAUD, J. P., AND G. A. EVANS. 2000. Current status of pink hibiscus mealybug in Puerto Rico including a key to parasitoid species. *Florida Entomologist* 83(1): 97-101.
- MOORE, D. P. C. 1993. The potencial of mycoinsecticides. *Biocontrol News Inf* 14 (2): 31-40.
- MOORHOUSE, E.R., GILLESPIE, A.T. & CHARNLEY, A.K., 1994. The influence of temperature on the susceptibility of vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus* (Fabricius) (Coleoptera: Curculionidae), larvae to *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Annals of Applied Biology* 124: 185-193.
- PILZ, C., WEGENSTEINER, R., KELLER, S. 2007. Selection of entomopathogenic fungi for the control of the western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera*. *Journal Applied Entomology* 131 (6): 426-431.
- POLAR, P., DE MURO, M.A., KAIRO, M.T.K., MOORE, D., PEGRAM, R., JOHN, S., ROACH-BENN, C. 2005. Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae*

isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. *Veterinary Parasitology* 134: 159-167.

POSADA, F.J., VEGA, F.E. 2005. A new method to evaluate the biocontrol potential of single spore isolates of fungal entomopathogens. 10 pp. *Journal of Insect Science* 5: 37, available online: insectscience.org/5.37

QUESADA-MORAGA, E., E. A. A. MARANHAO., P. VALVERDE-GARCÍA., C. SANTIAGO-ALVÁREZ. 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.

RANJAN, R. 2006. Economic impacts of pink hibiscus mealybug in Florida and the United States. *Stoch Environmental Research Risk Assessment* 20: 353-362.

REDDY, G.V.P., MUNIAPPAN, R., CRUZ, Z.T., NAZ, F., BAMBA, J.P., TENORIO, J. 2009. Present Status of *Maconellicoccus hirsutus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in the Mariana Islands and Its Control by Two Fortuitously Introduced Natural Enemies. *Journal Economic Entomology* 102 (4): 1431-1439.

ROLTSCH, W.J., MEYERDIRK, D.E., WARKENTIN, R., ANDRESS, E.R., CARRERA, K. 2006. Classical biological control of the pink hibiscus mealybug, *Maconellicoccus hirsutus* (Green), in southern California. *Biological Control* 37: 155–166.

SAFAVI, S.A., KHARRAZI, A., RASOULIAN, G.R., BANDANI, A.R. 2010. Virulence of some isolates of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Journal Agriculture Science Technology* 12 (1): 13-21.

SAGARRA, L. A., AND C. VINCENT. 1999. Influence of host stage on oviposition, development, sex ratio, and survival of *Anagyrus kamali* Moursi (Hymenoptera: Encyrtidae), a parasitoid of the hibiscus mealybug, *Maconellicoccus hirsutus* Green (Homoptera: Pseudococcidae). *Biological Control* 15: 51-56.

SAMSON, R.A. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer-Verlag, Berlin. 187 p.

SANTORO, P.H., NEVES, P.M.O.J., ALEXANDRE, T.M., SARTORI, D., ALVES, L.F.A., FUNGARO, M.H.P. 2008. Selection of *Beauveria bassiana* isolates to control *Alphitobius diaperinus*. *Journal Invertebrate Pathology* 97 (2): 83-90.

SENASICA. 2009. Campañas Fitosanitarias. Cochinilla Rosada del Hibisco. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA),

SAGARPA. Disponible en: www.senasica.gob.mx. (Fecha de revisión: 16 enero 2011).

- SOARES, G.G., MARCHAL, M., FERRON, P. 1983. Susceptibility of *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae) larvae to *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviridae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) at two different temperatures. *Environmental Entomology* 12: 1886-1890.
- SOLTER, L.F., SIEGEL, J.P., PILARSKA, D.K. & HIGGS, M. C., 2002. The impact of mixed infection of three species of microsporidia isolated from the gypsy moth, *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 81: 103-113.
- ST. LEGER, R.J., CHARNLEY, A.K., COOPER, R.M. 1986. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture and cuticle. *Journal Invertebrate Pathology* 48: 85-95.
- TANADA AND H. K. KAYA. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press. Inc. USA. 666p.
- THOMAS, M.B., JENKINS, N.E. 1997. Effects of temperature on growth of *Metarhizium flavoviridae* and virulence to the variegated grasshopper, *Zonocerus variegates*. *Mycological Research* 101 (12): 1469-1474.
- TUNAZ, H., STANLEY, D. 2009. An immunological axis of biocontrol: infections in field-trapped insects. *Naturwissenschaften* 96: 1115-1119.
- UMA DEVI, K., PADMAVATHIA, J., UMA MAHESWARA RAOB, C., KHANC, A.A.P., MOHAND, M.C. 2008. A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales, Clavicipitaceae). *Biocontrol ScienceevTechnology* 18: 975-989.
- VIDAL, C., FARGUES, J. & LACEY, L. A. 1997. Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: Effect of temperature on vegetative growth. *Journal of Invertebrate Pathology* 70: 18-26.
- VU, V.H., HONG, I.S., KIM, K. 2007. Selection of entomopathogenic fungi for aphid control. *Journal Bioscience. Bioengineering* 104 (6): 498-505.
- WARGO, A.R., DE ROODE, J.C., HUIJBEN, S., DREW, D.R., READ, A.F., 2007. Transmission stage investment of malaria parasites in response to in-host competition. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 274: 2629-2638.
- WILLIAMS, D. J. 1958. The mealy-bugs (Pseudococcidae: Homoptera) described by W. M. Maskell, R. Newstead, T. D. A. Cockerell and E. E. Green. From the Ethiopian region. *Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology* 6 (8): 205-236.

YEO, H., PELL, J.K., ALDERSON, P.G., CLARK, S.J. & PYE B.J., 2003. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. *Pest Management Science* 59: 156-165.