



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO EN FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

SUSCEPTIBILIDAD HACIA *Neozygites floridana*
(ENTOMOPHTHORALES: NEOZYGITACEAE) EN LAS
MORFOESPECIES *Tetranychus cinnabarinus* Y *Tetranychus*
urticae (ACARI: TETRANYCHIDAE)

VIRIDIANA LIZETH GÁLVEZ PARTIDA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO. DE MÉXICO

2021

La presente tesis titulada: Susceptibilidad hacia *Neozygites floridana* (Entomophthorales: Neozygitaceae) en las morfoespecies *Tetranychus cinnabarinus* y *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), realizada por la alumna: Viridiana Lizeth Gálvez Partida 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. GABRIEL OTERO COLINA

ASESOR


DR. J. REFUGIO LOMELI FLORES

ASESOR


DR. ARIEL WILBERT GUZMÁN FRANCO

ASESORA


M.C. MARÍA VICTORIA DÍAZ MARTÍNEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, noviembre de 2021

**SUSCEPTIBILIDAD HACIA *Neozygites floridana* (ENTOMOPHTHORALES:
NEOZYGITACEAE) EN LAS MORFOESPECIES *Tetranychus cinnabarinus* Y
Tetranychus urticae (ACARI: TETRANYCHIDAE)**

Viridiana Lizeth Gálvez Partida, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2021

RESUMEN

Tetranychus urticae (Koch, 1836), ácaro de color verdoso con dos manchas, es una plaga cosmopolita que afecta a más de 900 especies de plantas, incluidas especies comerciales. *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval, 1867) ácaro fitófago caracterizado por su coloración rojiza y ocasionalmente es encontrado coexistiendo con *T. urticae*, motivo por el cual es considerado para algunos autores un sinónimo. Este debate científico se debe a la alta diversidad morfológica y genética de dichas morfoespecies. En experimentos de laboratorio, se compararon los ciclos de vida de ambas morfoespecies. En una segunda etapa del estudio se evaluó la susceptibilidad y supervivencia de ambas morfoespecies al ser infectados por el hongo patógeno *Neozygites floridana* (Weiser y Muma, 1980). Los ácaros fueron alimentados con hojas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L., 1753), en crías y experimentos que se desarrollaron en condiciones controladas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$ HR y 12:12 h L: O); un grupo de organismos fue expuesto a infección con *N. floridana* mientras que otro (testigo) no fue expuesto a la infección. Se corroboró la identificación de la forma verde con dos manchas como *T. urticae*, y la de la forma roja como *T. cinnabarinus*. Los estudios de ciclo de vida entre los ejemplares infectados y no infectados mostraron diferencias significativas en los tiempos de desarrollo: incubación-huevo, $F_{1,224} = 29.88$, $P < 0.0001$; desarrollo de larva a adulto, $F_{1,224} = 62.7271$, $P < 0.0001$; longevidad del adulto, $F_{1,224} = 2346.102$, $P < 0.0001$, así como diferencias en fecundidad media diaria ($\alpha = 0.05$). En cuanto al porcentaje de infección por *N. floridana*, se estimó 81.00% en *T. urticae*, y 55.43% en *T. cinnabarinus*. Se concluye que *T. cinnabarinus* es menos susceptible a la infección por *N. floridana* que *T. urticae*.

Palabras clave: control biológico, entomopatógenos, fecundidad, mortalidad.

**SUSCEPTIBILITY TO *Neozygites floridana* (ENTOMOPHTHORALES:
NEOZYGITACEAE) IN THE MORPHOSPECIES *Tetranychus cinnabarinus* And
Tetranychus urticae (ACARI: TETRANYCHIDAE)**

Viridiana Lizeth Gálvez Partida, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2021

ABSTRACT

Tetranychus urticae (Koch, 1836), a two-spotted greenish mite, is a cosmopolitan species that infests more than 900 plant species, including commercial species. *Tetranychus cinnabarinus* (Boudreaux, 1956) is characterized by its red coloration and is found coexisting in warm and temperate environments with *T. urticae*; by that reason, they are considered for some authors to be synonyms. This scientific debate is due to the high morphological and genetic diversity of these morphospecies. In laboratory experiments, the life cycles of both morphospecies were compared. In a second stage of the study, the level of susceptibility and survival of both morphospecies was evaluated when the mites were exposed to the infection with the entomopathogenic fungus *Neozygites floridana* (Weiser and Muma, 1980). The mites were fed with bean leaves (*Phaseolus vulgaris* L., 1753), the experiments were developed under controlled conditions (25 ± 2 ° C, $60 \pm 5\%$ RH and 12:12 h L: O); a group of organisms was exposed to infection with *N. floridana* whereas another (control) was not exposed to the infection. The identification of the green form with two spots was corroborated as *T. urticae*, and that of the red form as *T. cinnabarinus*. Life cycle studies between infected and uninfected organisms showed significant differences in development times: hatch-egg, $F_{1,224} = 29.88$, $P < 0.0001$; development from larva to adult, $F_{1,224} = 62.7271$, $P < 0.0001$; longevity of adults, $F_{1,224} = 2346.102$, $P < 0.0001$, as well as differences in fertility with values of $P < 0.0001$. Regarding the percentage of infection by *N. floridana*, 81% was estimated in *T. urticae*, and 55.43% in *T. cinnabarinus*. It is concluded that *T. cinnabarinus* is less susceptible to infection by *N. floridana* than *T. urticae*.

Key words: biological control, entomopathogens, Tetranychidae, mortality.

DEDICATORIA

*A la memoria de mi padre José Gálvez Antonico, gracias por su amor infinito, por ser mi luz y mí impulso.

* A mi madre Gloria Elena Partida Montañez, gracias por siempre creer en mí, por el amor infinito y apoyo incondicional.

* A mi hermana Celina Pamela Gálvez Partida, por su apoyo en todos los aspectos de mi vida.

* A Fernando Sandoval Murguía, por su amor, paciencia, comprensión y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A todos los mexicanos, que con sus aportaciones tributarias financiaron parte de mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca completa, lo cual me permitió continuar mi formación académica.

Al Colegio de Postgraduados y Posgrado en Fitosanidad, por brindarme la oportunidad de realizar la maestría en el campus Montecillo.

Al Dr. Gabriel Otero Colina, por ser mi consejero y mentor en mi formación académica.

Al Dr. Refugio Lomelí Flores, por formar parte de mi consejo y sus comentarios para fortalecer la investigación.

Al Dr. Ariel Guzmán Franco, por formar parte de mi consejo y sus consejos para realizar esta investigación

A Biobest México, en especial a la Mc. Victoria Díaz y al Ing. Antolín Díaz Voss, por permitirme formar parte de su empresa, por facilitarme los materiales, equipos, y ejemplares necesarios para realizar esta investigación.

Al Dr. Lauro Soto Rojas, por toda su ayuda y consejo en la redacción de la tesis y en el análisis estadístico de datos.

Al M.C. Jorge M. Valdez Carrasco por su ayuda en la toma de fotografías para esta investigación.

Al M.C. Rodolfo Olmos Zepeda, por su asesoría en el análisis de datos.

A mis amigos: Juli, Lucero, Luis, Silvia, Ale, Adri, Marino, Eli, entre otros que me acompañaron y ayudaron durante el proceso de la maestría.

Al personal administrativo Silvia, Deniss, por su ayuda en todos los trámites administrativos.

CONTENIDO

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
CONTENIDO	vi
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	5
2.1 Objetivo general	5
2.2 Objetivos específicos	5
III. REVISIÓN DE LITERATURA	6
3.1 Entomophthorales	6
3.2 Neozygitaceae	6
3.3 <i>Neozygites floridana</i> (Entomophthorales: Neozygitaceae)	6
3.4 Familia Tetranychidae.....	8
3.5 <i>Tetranychus urticae</i>	9
3.6 <i>Tetranychus cinnabarinus</i>	11
IV. MÉTODOS DE CONTROL.....	13
4.1 Control químico.....	13
4.2 Control biológico.....	13
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1 Colecta y almacenamiento del material biológico	15
5.2 Identificación de ácaros basada en su morfología.....	16
5.3. Identificación molecular del material biológico	17
5.3.1 Identificación molecular de <i>T. cinnabarinus</i> y <i>T. urticae</i>	17
5.3.2 identificación molecular de <i>Neozygites floridana</i>	18
5.4. Fundación de las colonias de los ácaros.....	19
5.5 Desarrollo y mortalidad de ácaros sanos y expuestos a la infección por <i>N. floridana</i>	19
5.6 Fecundidad de ácaros sanos y expuestos a la infección por <i>N. floridana</i>	21
5.7 Análisis estadístico.....	22
VI. RESULTADOS	23

6.1	Identificación de morfoespecies de ácaros con base en características morfológicas	23
6.1.1	Identificación de <i>N. floridana</i> con base a características morfológicas	24
6.2	Caracterización molecular de <i>T. cinnabarinus</i> , <i>T. urticae</i> y <i>N. floridana</i>	26
6.3	Desarrollo y mortalidad de <i>T. cinnabarinus</i> y <i>T. urticae</i> con y sin presencia de <i>N. floridana</i>	30
6.4	Fecundidad de <i>T. cinnabarinus</i> y <i>T. urticae</i> en presencia y ausencia de <i>N. floridana</i>	32
VII.	DISCUSIÓN	34
VIII.	CONCLUSIÓN	37
IX.	LITERATURA CITADA	38

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Identificación molecular de morfoespecies de <i>Tetranychus</i> por similitud con secuencias parciales del gen COI depositadas en GenBank.	27
Cuadro 2. Haplotipos de <i>T. cinnabarinus</i> determinados mediante el programa DNA Sequence Polymorphism v.6.12.03.8.....	28
Cuadro 3. Haplotipos de <i>T. urticae</i> determinados mediante el programa DNA Sequence Polymorphism v.6.12.03.8.....	28
Cuadro 4. Duración de estadios de <i>T. urticae</i> y <i>T. cinnabarinus</i> en presencia y ausencia de <i>N. floridana</i> (media \pm EE).....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 .Ácaros observados al estereoscopio para su identificación visual	16
Figura 2. Ácaros identificados visualmente como infectados por <i>N. floridana</i>	16
Figura 3. Cuerpos hifales observados dentro de cadáveres de ácaros de ambas morfoespecies. Vista en microscopio óptico de contraste de fases.....	20
Figura 4. Hembra de <i>T. cinnabarinus</i> infectada por <i>N. floridana</i> . Vista en microscópico óptico de contraste de fases.....	21
Figura 5. Edeagos de machos observados bajo microscopio óptico contraste de fases. 1000x.	23
Figura 6. A. Lóbulos dorsales de la hembra <i>T. cinnabarinus</i> vista frontal. B. Lóbulos dorsales de la hembra <i>T. urticae</i> vista frontal. Vistas en microscopio electrónico de barrido.	24
Figura 7. Estructuras observadas de <i>N. floridana</i> . A1. Conidios primarios.	25
Figura 8. A. Capilliconidios anclados en extremidades de <i>T. urticae</i> y <i>T. cinnabarinus</i>	25
Figura 9. Ácaro esporulado, infectado por <i>N. floridana</i>	26
Figura 10. Árbol filogenético de separación de ácaros, con el método Máxima <i>verosimilitud</i> <i>T. cinnabarinus</i> (forma roja) y <i>T. urticae</i> (forma verde) (ML), basado en el gen mitocondrial COI, usando el modelo Tamura-Nei con una distribución Gamma, valores de Bootstrap basados en 1000 réplicas.....	29
Figura 11. Porcentajes de infección entre <i>T. urticae</i> y <i>T. cinnabarinus</i> hacia <i>N. floridana</i> mediante la fórmula de Abbott corregida.	31
Figura 12. Curvas de mortalidad mediante Log-Rank, <i>T. urticae</i> y <i>T. cinnabarinus</i> , en ausencia y presencia de <i>N. floridana</i> , desde huevo hasta su muerte.....	32
Figura 13. Promedio de huevos por día. Las letras corresponden a comparaciones entre tratamientos dentro de cada día (Tukey $\alpha=0.05$)	33

I. INTRODUCCIÓN

El abuso de los plaguicidas ha ocasionado un desequilibrio en el balance natural entre las poblaciones de depredadores y sus presas en cultivos agrícolas (Badii y Abreu, 2006). Como consecuencia de esta intervención, algunas especies de ácaros incrementaron su importancia y se convirtieron en plagas altamente destructivas en la agricultura (Badii *et al.*, 2010). Los ácaros de la familia Tetranychidae representan uno de los grupos principales de organismos que se alimentan de una gran variedad de plantas vasculares en todo el mundo (Sun *et al.*, 2012). Afectan cultivos agrícolas, incluyendo plantas en invernaderos y cultivos de campo, que van desde árboles a herbáceas de bajo crecimiento (Martínez, 2016). Estos ácaros representan un riesgo de introducción y establecimiento como plagas para cualquier país que importa material vegetal, debido a que muchas especies de esta familia son altamente polífagas y tienen una alta tasa de desarrollo y fecundidad (Arguelles, 2006; Sun *et al.*, 2012).

Especies como *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) se reproducen por partenogénesis arrenotoca, donde una sola hembra puede establecer una población nueva, infestando de ese modo rápidamente a una planta (Van Leeuwen *et al.*, 2010; NAPPO, 2015). Aunado a esto, los tetraníquidos tienen eficientes mecanismos de dispersión por diferentes vehículos como el viento, su traslado por la planta a través de su seda o por dispersión pasiva en herramientas o prendas de vestir (NAPPO, 2015). Por otra parte, se ha demostrado que suelen desarrollar resistencia a los plaguicidas (Gbric *et al.*, 2011) mientras que algunos de sus depredadores, como los ácaros de la familia Phytoseiidae, son más susceptibles a éstos (NAPPO, 2015). Uno de los ácaros plaga de mayor importancia económica en la agricultura mexicana, así como en muchas otras partes en el mundo, es *T. urticae* (Arguelles, 2006). Su gama de hospederos excede 900 especies de plantas; en diversos agroecosistemas el combate químico juega un papel importante en el manejo de sus poblaciones (Martínez, 2016).

Tetranychus cinnabarinus (Boisduval, 1867) es una plaga de importancia económica y de amplia gama de hospedantes (Xien *et al.*, 2009; Peralta y Tello, 2011). La distinción morfológica y genética entre *T. urticae* y *T. cinnabarinus* ha sido objeto de muchos estudios y discusiones acerca de si son o no especies distintas. Ambas formas tienen una distribución mundial, aunque *T. urticae* es encontrada predominantemente en climas templados, mientras que *T. cinnabarinus* habita sobre todo en climas cálidos y tropicales. Ambas formas son altamente polífagas y han sido encontradas

en cultivos en invernadero en ambientes templados, así como en plantas en ambientes naturales (Dupont, 1979; Sun *et al.*, 2012). Algunas características usadas por los investigadores para diferenciar entre *T. cinnabarinus* y *T. urticae* son la forma de los lóbulos integumentarios dorsales, la forma del edeago, la quetotaxia, la habilidad de entrar en diapausa, la adaptación hacia plantas hospederas, diversos rasgos fisiológicos y de genética poblacional; sin embargo, Auger *et al.* (2013) no lograron confirmar la posición taxonómica de *T. cinnabarinus* como especie distinta de *T. urticae*. La posición taxonómica tomada por Bolland *et al.* (1998) no reconoce a *T. cinnabarinus* como una especie distinta de *T. urticae*. Por otra parte, investigaciones con herramientas de biología molecular no han arrojado distinciones genéticamente significantes entre ambos tetraníquidos (Mendoza *et al.*, 2011); *T. cinnabarinus* es considerada como un fenotipo de *T. urticae* y ambas formas pueden coexistir en un mismo cultivo, provocando importantes pérdidas económicas (Sun *et al.*, 2012).

Para el combate de ácaros tetraníquidos en México, se utiliza una gran variedad de acaricidas (Márquez-Chávez *et al.*, 2019) con diferentes estructuras químicas, incluidas las neurotoxinas, insecticidas como organofosforados, carbamatos, piretroides y acaricidas específicos como los inhibidores de transporte de electrones (CTE) y las avermectinas (Van Leeuwen *et al.*, 2010). Su notoria y rápida selección de genes de resistencia desarrollada por los tetraníquidos hacia acaricidas e insecticidas está fundamentada en su reproducción arrenotoca, alta fecundidad, corto ciclo de vida y endogamia (Van Leeuwen *et al.*, 2009). El abuso de abamectina para el combate de tetraníquidos ha ocasionado en una resistencia a este plaguicida en numerosos cultivos alrededor del mundo (Stumpf y Nauen, 2001). Por lo que se han buscado alternativas que permitan un manejo más eficiente de sus poblaciones, incluyendo el control biológico.

El control biológico es una de las técnicas utilizadas en el manejo integrado de plagas, donde la interacción plaga-enemigo natural es el pilar para el conocimiento de las demás interacciones que ocurren dentro de un sistema tritrófico donde intervienen la planta, la plaga y el enemigo natural, y donde se busca optimizar las tácticas de control (Rodríguez *et al.*, 2013). El control biológico es ampliamente utilizado en numerosos países alrededor del mundo, y en América Latina posee un desarrollo creciente que abre la posibilidad a empresas productoras de ácaros e insectos benéficos (Daza *et al.*, 2010).

Dentro de la cría masiva de insectos y ácaros benéficos destaca la producción de *Phytoseiulus persimilis* (Athias-Henriot, 1957), ácaro de la familia Phytoseiidae, principal depredador de tetraníquidos (Daza *et al.*, 2010). Dentro del sistema de producción masiva a escala comercial, los ácaros fitoseídos son alimentados con ácaros tetraníquidos, los cuales a su vez son alimentados con plantas, principalmente de *Phaseolus vulgaris* (Linneo, 1753), creando así un sistema tritrófico, el cual requiere de una sincronía entre las diferentes partes del proceso (Rodríguez *et al.*, 2013; Morales *et al.*, 2014). Sin embargo, lograr esta sincronía no es sencillo, se requiere un sistema de reproducción masiva económica y técnicamente viable (Rodríguez *et al.*, 2013). La utilización de los fitoseídos depredadores en el campo agrícola está limitada por la escasa disponibilidad de ellos en el mercado; a pesar de las continuas mejoras en los métodos de cría masiva, dos de los principales problemas son la alta demanda de tetraníquidos dentro del sistema de cría y la vulnerabilidad de éstos hacia patógenos como *Neozygites floridana* (Weiser y Muma, 1980) (Rodríguez *et al.*, 2013).

El orden de los Entomophthorales (Zygomycota: Entomophthoromycotina) constituye uno de los grupos más grandes de patógenos de insectos y ácaros (Klingen *et al.*, 2009). El género *Neozygites*, ubicado en este orden, incluye 15 especies, de las cuales cuatro han sido citadas infectando ácaros (Delalibera Jr. *et al.*, 2004). La especie *N. floridana* ha sido citada infectando al menos nueve especies diferentes de ácaros tetraníquidos (Scorsetti y Larstra, 2007). Dentro de la biología de *N. floridana* se destaca su corto ciclo de infección y alta tasa reproductiva, que como consecuencia propician fuertes epizootias en las poblaciones de tetraníquidos (Barta y Cagán, 2006). El ciclo de *N. floridana* en especies del género *Tetranychus* está condicionado a una alta humedad relativa, donde basta con un cadáver con esporulación de dicho hongo para que comience un ciclo de infección (Castro, 2013). El hongo penetra la cutícula y produce esporas, las cuales son llamadas conidios primarios (Scorsetti *et al.*, 2007). Dichos conidios germinan en capilliconidios que infectan a nuevos tetraníquidos, adhiriéndose a sus patas u otras partes del cuerpo; los capilliconidios germinan y penetran la cutícula del hospedero, desarrollando en su interior el cuerpo hifal, el cual iniciará un nuevo ciclo (Scorsetti *et al.*, 2007; Trandem *et al.*, 2015).

Observaciones preliminares realizadas por la autora de este trabajo mostraron que la morfoespecie de cuerpo rojizo, identificada como *T. cinnabarinus*, mostró una menor susceptibilidad a la infección por *N. floridana* que la morfoespecie de color verde-amarillento y

con dos manchas, identificada visualmente como *T. urticae*. La presente investigación se diseñó para evaluar la susceptibilidad de las dos morfoespecies a *N. floridana*; esta determinación es indispensable para identificar a la especie más factible para ser utilizada como alimento de *P. persimilis* en sistemas de cría masiva para su uso en control biológico.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar la susceptibilidad de *T. urticae* y *T. cinnabarinus* hacia *N. floridana*, medida a través de la mortalidad, la fecundidad y del tiempo de desarrollo de estos ácaros, así como determinar la identidad morfológica y molecular de los organismos utilizados en este proyecto.

2.2 Objetivos específicos

Identificar morfológica y molecularmente las morfoespecies de tetraníquidos pretendidas para usar en la investigación, designadas como *T. urticae* y *T. cinnabarinus*.

Identificar morfológica y molecularmente la especie de *Neozygites* utilizada para este experimento.

Inducir la esporulación de *Neozygites floridana*. en ácaros sanos para determinar la susceptibilidad de *T. cinnabarinus* y *T. urticae* a la infección por este hongo.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Entomophthorales

El orden Entomophthorales (Fungi: Zygomycota) se compone por cuatro familias, Ancylistaceae, Completoriaceae, Entomophthoraceae y Meristacraceae (Humber, 2012). Consiste en 236 especies, todas patógenas de artrópodos (Keller y Petrini, 2005). La mayoría de las especies clasificadas en estas familias son parásitos obligados; por lo tanto, su reproducción y crecimiento en medios de cultivo son complicados, rara vez se logra su crecimiento y esporulación. Algunas especies que se han logrado aislar en medios de cultivo se han desarrollado en cultivos complejos, con la adición de productos orgánicos específicos para cada especie a tratar (Kirk, 1999).

Los hongos Entomophthorales son cosmopolitas; sin embargo, parecen tener mayor número de especies en climas templados a cálidos (Keller, 2008).

3.2 Neozygitaceae

Recientemente la familia Neozygitaceae fue excluida del orden Entomophthorales, formando parte del orden Neozygitales y de una nueva clase Neozygomycetes (Humber, 2021); sin embargo, en este trabajo se tomó en cuenta la clasificación tradicional, la cual está conformada por dos géneros, *Apterivorax* y *Neozygites* (Keller, 2008). Hongos patógenos del género *Neozygites* han sido reportados causando epizootias en poblaciones de *Mononychellus tanajoa* (Bondar, 1938) en Sudamérica (Agboton *et al.*, 2009). Dentro del género *Neozygites* destaca la especie *N. floridana*, considerada como el mayor patógeno de *Tetranychus* (Da Silveira *et al.*, 2013) y se asocia con una reducción significativa de poblaciones de este género (Barta y Cagan, 2006). Sin embargo, ciertos fenotipos o características fisiológicas pueden predisponer a los organismos a ser más propensos a infecciones (Susilo *et al.*, 1994).

3.3 *Neozygites floridana* (Entomophthorales: Neozygitaceae)

El hongo patógeno *N. floridana* se encuentra asociado a poblaciones de *Tetranychus* y es el principal factor causante de la declinación de poblaciones de ácaros tetraníquidos (Klingen *et al.*, 2009). Delalibera *et al.* (2004) mencionan a esta especie como un hongo patógeno obligado de ácaros. Estos autores también hacen referencia a que la primera observación de esta especie fue en 1966 por Weiser y Muma en Lake Alfred, Florida, Estados Unidos de América, donde se le

encontró como patógeno en el ácaro de los cítricos *Eutetranychus banksi* (McGregor, 1914). Desde entonces, este hongo ha sido reportado infectando al menos 18 especies de ácaros, todos pertenecientes a la familia Tetranychidae (Ribeiro *et al.*, 2009). Roggia *et al.* (2009) indican que aún con esta lista, la gama de hospederos de *N. floridana* no puede ser definida. Esta especie fúngica puede formar esporas de resistencia que sobreviven en condiciones adversas; se han encontrado esporas de resistencia en el suelo, a lo largo de todas las estaciones del año (Da Silveira *et al.*, 2013).

Las mayores infecciones en tetraníquidos por *N. floridana* se presentan en los temporales de lluvias y ocasionan un alto porcentaje de mortalidad en poblaciones activas de *Tetranychus* (Barta y Cagan, 2006). Estas condiciones con alta humedad relativa inducen brotes epizooticos de este hongo (Barta y Cagan, 2006.), debido a que favorecen la germinación de las esporas de resistencia que sobreviven en condiciones adversas en el suelo, a lo largo de todas las estaciones del año (Da Silveira *et al.*, 2013).

Las infecciones de *N. floridana* acaban completamente con poblaciones de *Tetranychus* en un promedio de 3.38 días a 25 °C, y en 11.02 días a 15°C (Smitley *et al.*, 1986; Castro *et al.*, 2018). La patogenicidad de este hongo se debe en gran medida a una serie de factores que participan en diferentes mecanismos que afectan al huésped, tales como el crecimiento vegetativo, la activación y germinación de los conidios, la liberación de metabolitos, la penetración a través de la cutícula, la supervivencia y el crecimiento dentro del hospedero, lo cual resulta en una susceptibilidad mayor en condiciones de cría masiva, donde las condiciones para la reproducción de *P. persimilis* son propicias para la germinación y esporulación de *N. floridana* en ácaros *Tetranychus* (Smitley *et al.*, 1986).

Se han realizado trabajos para medir el impacto de las epizootias causadas por *N. floridana* en ácaros como *Tetranychus evansi* Baker y Pritchard, 1960, en donde se encontraron afectaciones de más del 50% en las poblaciones evaluadas, aun cuando la densidad de la población de este ácaro era baja (Da Silveira *et al.*, 2009; Agboton *et al.*, 2009). Sin embargo, en la literatura no se encontraron trabajos donde se haya evaluado específicamente la susceptibilidad de *T. cinnabarinus* y *T. urticae* hacia *N. floridana*.

Neozygites floridana es un patógeno específico de tetraníquidos, por lo que los fitoseídos no se ven afectados físicamente por este patógeno; sin embargo, la baja en la población de tetraníquidos es un factor limitativo en la producción masiva de los fitoseídos (Ribeiro *et al.*, 2009). La dificultad de mantener una producción continua de *P. persimilis* promueve que los agricultores prefieran combatir a los ácaros plaga con productos químicos, ya que para dar continuidad al control biológico con enemigos naturales es necesario contar con la disponibilidad inmediata de los organismos benéficos (De la Peña, 2011; Daza *et al.*, 2010). Actualmente *P. persimilis* se puede importar a México de países como Estados Unidos y Holanda, pero su efectividad se ve disminuida debido al efecto del viaje sobre la calidad y supervivencia de los individuos, además de que el costo para adquirir los organismos benéficos reduce la competitividad respecto a plaguicidas químicos (Daza *et al.*, 2010).

La temperatura y la humedad relativa son dos factores determinantes en la esporulación de *N. floridana* (Delalibera *et al.*, 2006). Sin embargo, el macroclima no siempre es el factor determinante para la esporulación y germinación de este patógeno, ya que el proceso ocurre en la superficie de la hoja donde la humedad relativa es alta aún en periodos con baja humedad atmosférica (Wekesa *et al.*, 2010). Los brotes epizooticos y su desarrollo, así como la complejidad de las interacciones entre diferentes niveles tróficos, hacen de esta área de estudio todo un reto (Berdinesen, 2012). El uso de *N. floridana* como control biológico inoculativo o inundativo es todo un reto, debido a que las especies de este género son parásitas obligadas de su huésped y es muy complicado reproducirlas en medios artificiales (Delalibera *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2018).

En algunas ocasiones la identificación de los hongos patógenos por medio de microscopia y criterios fenotípicos puede llegar a ser subjetiva, sobre todo en el caso de especies similares morfológicamente; en estos casos se recomienda usar técnicas moleculares como PCR, en donde se emplean iniciadores (primers) universales de hongos (5'-CTGGTTGATTCTGCCAGT-3'; Gargas y DePriest, 1996) y (5'-AATGATCCTTCCGCAGGT-3'; DePriest, 1993; Delalibera y Humber, 2004; Montalva *et al.*, 2014).

3.4 Familia Tetranychidae

Todos los ácaros pertenecientes a la familia Tetranychidae son fitófagos, componen el grupo más importante de ácaros plaga dentro del sector agrícola (Badii, 2010). Algunos ácaros de

esta familia son considerados plagas importantes en cultivos de alrededor del mundo (Fathipour y Maleknia, 2016), donde dañan cultivos de campo abierto, frutales, hortalizas y ornamentales (Van de Vrie *et al.*, 1972). Los daños ocasionados por estos ácaros son manchado y caída de las hojas y frutos, decoloración en frutos, reducción en rendimiento y muerte de las plantas (Van de Vrie *et al.*, 1972). Muchos de estos ácaros pueden ser también encontrados en manchones de malezas, desde donde pueden ser dispersados por el aire, por transporte pasivo a través de otros organismos y por el movimiento de ellos mismos a través de telarañas (Azandeme-Hounmalon *et al.*, 2014).

Dentro de esta familia, la especie más notoria es *T. urticae*, globalmente distribuido; es el principal ácaro plaga de cultivos ornamentales, frutales y vegetales en el mundo; se estima que puede infestar alrededor 900 especies de plantas pertenecientes a 70 géneros (Sedaratian-Jahromi *et al.*, 2011).

Las especies del género *Tetranychus* se caracterizan por presentar en el tarso de la pata I dos pares de setas dúplex, relativamente distantes un par de otro, el tarso de la pata II con un par de setas dúplex, el pretarso de la hembra se caracteriza por presentar un empodio central modificado en dos o tres pares de pelos, también llamados pelos proximoventrales, y puede haber o no una espuela dorsal. El empodio del macho puede ser uno o dos en forma de garra, con dos apéndices laterales (uñas), cada uno modificado en un par de pelos con forma de T. El cuerpo de la hembra tiene un par de setas h (la seta H1 ausente) y dos pares de setas ps, un peritrema simple y curvado distalmente (Bolland y Fletchmann, 1998). Actualmente se han descrito 147 especies de *Tetranychus* en el mundo (Migeon y Dorkeld, 2013).

3.5 *Tetranychus urticae*

Tetranychus urticae en México es el principal ácaro plaga, afecta entre otros cultivos a plantas ornamentales, las cuales representan cerca de 13, 188 ha cultivadas (Robles-Bermúdez *et al.*, 2012). Reduce la calidad de producción, aumentando los costos de manejo y los riesgos de salud pública y ambiental, ya que obliga a usar plaguicidas químicos para su combate (Aguilar-Mendel *et al.*, 2011).

Para este ácaro herbívoro generalista, tanto de cultivos alimenticios como de plantas ornamentales, la gama de hospederos es muy amplia, entre la que destacan los cultivos de algodón, frijol, fresa, cítricos, clavel, almendra, rosa y nuez, además de que en invernaderos ataca a pepino,

tomate, berenjena y chile, entre otros, inclusive vegetales que producen compuestos tóxicos (Grbić *et al.*, 2011; Migeon y Dorkeld, 2013). El clima seco y el calor son detonantes para incrementar sus poblaciones; el daño que producen en las plantas se identifica como una clorosis en las hojas (Li *et al.*, 2009). Su ciclo de vida corto y su alto potencial reproductivo potencializan la predisposición de este ácaro hacia desarrollar resistencia a múltiples productos químicos (Grbić *et al.*, 2011; Onstad y Knolhoff, 2014).

De acuerdo con la NAPPO (2015), el desarrollo biológico de este ácaro es favorecido por temperaturas de aproximadamente 30 °C y baja humedad relativa. El lapso de desarrollo desde huevo hasta adulto es de aproximadamente 8-12 días, se estima que cada hembra produce aproximadamente 114 huevos en su vida, con picos máximos de fecundidad de aproximadamente 14 huevos por día. Los machos se desarrollan más rápido que las hembras, la proporción sexual es de 2:1 a 3:1 a favor de las hembras (Badii *et al.*, 2010).

En ambientes no óptimos para su desarrollo, *T. urticae* puede entrar en diapausa, estado fisiológico de inactividad, la cual es inducida por el fotoperiodo, la temperatura y el alimento, como mecanismo para escapar del tiempo adverso (Badii *et al.*, 2010; NAPPO, 2015). Su distribución es prácticamente cosmopolita, en la región Afrotropical ha sido detectado en países como Angola, Mozambique, Etiopía, Zambia, Sudáfrica y Sudán; en la región Australasiática, en Australia, Nueva Zelanda, Fiji y Hawái, entre otros; en la región Neártica, en México, Canadá y Estados Unidos; en la región Neotropical, en Argentina, Brasil, Ecuador, Guatemala y Puerto Rico, entre otros; en la región Oriental, en Bangladesh, China, Indonesia, India y Taiwán; en la región Paleártica, en Argelia, Afganistán Hungría, Israel y Reino Unido (Migeon y Dorkeld, 2013).

El genoma de *T. urticae* muestra respuestas únicas a cambios ambientales, además se encontró la adición de genes por transferencia lateral en respuesta a cambios ambientales (Grbić *et al.*, 2011). Debido al alto nivel de polimorfismo en especies de la familia Tetranychidae, los métodos de identificación molecular como el uso de marcadores moleculares han crecido en popularidad (Navajas, 1998; Grbric *et al.*, 2011). El genoma de *T. urticae* fue secuenciado en su totalidad por Grbric *et al.* (2011), quienes determinaron su tamaño total de 90 megabases, además de resaltar caracteres únicos en el genoma de estos ácaros, producidos por cambios ambientales y transferencia lateral genética. El gen COI (citocromo oxidasa subunidad I) es el marcador

molecular mayormente empleado en la identificación de variaciones moleculares mediante PCR (Márquez-Chávez *et al.*, 2019).

En cuanto a la morfología de *T. urticae*, se encuentra en primer lugar la coloración, la cual en hembras activas va de amarillento a verde hoja (Boudreaux, 1956, Auger *et al.*, 2009). Boudreaux (1956) reconoce a esta especie por la disposición de las manchas en la parte dorsal del histerosoma femenino, estas manchas se sitúan a los lados. Otra característica distintiva en *T. urticae* son los lóbulos dorsales, estructuras pequeñas, alineadas en estrías en forma de huellas digitales en el integumento de los ácaros; en *T. urticae* la forma de estos lóbulos es ancha, oblonga, semi-oblonga, redondeada, estrechada o en algunas ocasiones triangular (Auger *et al.*, 2009) pero nunca atípicamente puntiaguda (Brandenburg y Kennedy, 1981; Auger *et al.*, 2009). Por otra parte, puede llegar a ser bastante complicado identificar a *T. urticae* de *T. cinnabarinus* únicamente usando métodos morfológicos, debido al alto nivel de polimorfismo y la variación intraespecífica, los cuales a su vez se deben a los diferentes hábitats y hospederos donde se pueden encontrar ambos ácaros (Xien *et al.*, 2009).

3.6 *Tetranychus cinnabarinus*

Boudreaux (1956) señaló que la principal diferencia morfológica para distinguir entre *T. cinnabarinus* y *T. urticae* es la diferencia entre los patrones de las formas de los lóbulos del integumento dorsal (estrías) de las hembras; *T. urticae* presenta lóbulos semioblongos, mientras que en *T. cinnabarinus* son semicirculares o triangulares. Además, esta última especie tiene una coloración roja o "une belle couleur rouge aurore" (Dupont, 1979; Auger *et al.*, 2013). Boudreaux (1956) también indicó que puede existir hibridación, pero dichos híbridos son estériles. Sin embargo, estudios recientes de Auger *et al.* (2013) señalan a través de experimentos de hibridación que los ácaros híbridos de las dos formas no son estériles. Además, las diferencias señaladas respecto a los lóbulos han sido objeto de debates, debido a la falta de persistencia en la forma de los lóbulos (Dupont 1979). Por este motivo, autores como Auger *et al.* (2013) señalan que *T. cinnabarinus* debe ser considerado como un sinónimo dentro de la polimórfica especie *T. urticae*.

Takafuji *et al.* (1991) y Sun *et al.* (2012) consideran que *T. urticae* posee dos formas o fenotipos; una verde, que habita en sitios con temperaturas templadas y frías (*T. urticae*), y una forma roja (*T. cinnabarinus*), que prevalece en temperaturas cálidas y tropicales. Datos

moleculares sugieren que *T. urticae* es un fenotipo y *T. cinnabarinus* es otro fenotipo; es decir, dos morfotipos en una especie (Xie *et al.*, 2006). Sin embargo, la controversia por si son o no dos especies distintas continúa con estudios moleculares, donde Navajas (1998), Sun *et al.* (2012) y Auger *et al.* (2013) señalan que ambas formas son sinónimos. Por otra parte, en algunos estudios no se logran separar completamente las especies al compartir características en común (Xie *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2008), mientras que Li *et al.* (2009) validan la separación de ambas especies por medio de marcadores microsatelitales, ya que encontraron diferencias genéticas entre *T. urticae* y *T. cinnabarinus*. Dichas diferencias fueron relacionadas con la distancia geográfica entre los ácaros (Auger *et al.*, 2013).

Finalmente, ambas formas tienen una amplia distribución y pueden ser encontradas afectando plantas en invernaderos, árboles y herbáceas (Peralta y Tello, 2011). Ambas formas coexisten en algunos cultivos, *T. urticae* ha sido reportada en más de 900 especies vegetales, mientras que *T. cinnabarinus* ha sido reportada en aproximadamente 120 cultivos de importancia económica (Xien *et al.*, 2009; Peralta y Tello, 2011). Sun *et al.* (2012) reportan a *T. cinnabarinus* como la especie nativa de algunas regiones en China y a *T. urticae* como la especie invasora; esta especie se destaca por su rápido desarrollo y alta capacidad reproductiva (Dupont, 1979; Li *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2012).

IV. MÉTODOS DE CONTROL

4.1 Control químico

Los acaricidas juegan un papel fundamental en el control de los ácaros tetraníquidos (Van de vrie *et al.*, 1972; Aguilar-Mendel *et al.*, 2011). Sin embargo, la rotación de los acaricidas ha sido mínima desde hace aproximadamente 25 años, lo que ha generado graves problemas de resistencia en los ácaros. Se estima que hay resistencia a 90 acaricidas a nivel mundial (Cerna *et al.*, 2009; Aguilar-Mendel *et al.*, 2011).

4.2 Control biológico.

Generalmente en cultivos no comerciales, donde no se utilizan plaguicidas ni fertilizaciones excesivas, los ácaros tetraníquidos son controlados por un amplio complejo de especies depredadoras (Croft y Hull, 1983). Los programas de manejo integrado de ácaros se basan en la aplicación de productos químicos selectivos contra la plaga que se intenta controlar y al mismo tiempo la liberación de agentes de control biológico naturales, depredadores como los ácaros de las familias Phytoseiidae y Stigmaeidae, escarabajos coccinélidos del género *Stethorus*, Hemípteros y Neurópteros de las familias Chrysopidae y Hemerobiidae, entre otros (Aliniaze y Croft, 1990). El uso de agentes de control biológico permite disminuir la intensidad de aplicaciones de plaguicidas, con la consecuente reducción en el desarrollo de resistencia a dichos productos (Croft *et al.*, 1990).

El ciclo de vida corto, alta fecundidad y habilidad de crear resistencia hacia acaricidas han hecho que el control de ácaros únicamente con productos químicos sea extremadamente difícil; además, cabe mencionar los efectos de los residuos tóxicos de productos químicos en humanos y el ambiente, lo que ha resaltado la necesidad de emplear técnicas seguras y amigables con el ambiente para el manejo de estos ácaros plaga (Sedaratian-Jahrom *et al.*, 2009). Por lo anterior, se ha gestado un creciente interés en alternativas de combate para estas plagas, como la resistencia de cultivos, el control biológico y la integración de métodos que permitan un manejo eficiente (Fathipour y Sedaratian, 2013).

El control biológico por aumento se ha convertido en una práctica fundamental en el manejo integrado de plagas (IPM, por sus siglas en inglés) (Pilkington *et al.*, 2010). Los ácaros

depredadores, generalmente aquellos pertenecientes a la familia Phytoseiidae, juegan un papel importante entre los agentes de control biológico utilizados para el manejo de los ácaros fitófagos (Rodríguez *et al.*, 2013; Knapp *et al.*, 2018).

El mercado para los artrópodos utilizados como agentes de control biológico se ha incrementado fuertemente a través del tiempo (Van lenteren, 2012). La comercialización de estos agentes ha pasado de generar ingresos por \$30 millones de dólares en 1997 a generar un estimado de \$600 millones de dólares en el 2014 a nivel mundial (Van lenteren, 2012). El interés por la producción y aplicación práctica de estos depredadores se ve reflejado en numerosos estudios (Rodríguez *et al.*, 2013). Se tiene el registro de aproximadamente 20 especies de fitoseídos disponibles comercialmente (Zhang, 2003).

Actualmente los métodos de producción masiva de fitoseídos como *P. persimilis* se llevan a cabo dentro de invernaderos, donde se cultivan plantas de frijol *Phaseolus* sp. como alimento para la producción de tetraníquidos y posterior inoculación con los ácaros depredadores. Para este proceso se requieren colonias de ácaros tetraníquidos, sanas y libres de depredadores; hojas con ácaros tetraníquidos de estas colonias son utilizadas para infestar otras plantas de frijol en diferentes invernaderos, infestando así series semanales de ácaros tetraníquidos e inoculando con ácaros depredadores, con lo que se asegura que los ácaros depredadores dispongan siempre de alimento para su óptimo desarrollo y reproducción. A las 2-3 semanas, cuando la densidad de población de los depredadores es mayor, se procede a cosechar el invernadero y coleccionar la mayor cantidad de ácaros depredadores posible. Para este proceso, se requiere perfecta sincronía entre presa, depredador y hospedero. La cantidad y calidad del depredador comercializado (*P. persimilis*) depende totalmente de la cantidad y calidad de su alimento (tetraníquidos) (Morales *et al.*, 2014).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Colecta y almacenamiento del material biológico

Las morfoespecies de ácaros se colectaron en plantas de frambuesa (*Rubus idaeus*) cultivadas en macrotúneles en el municipio de San Isidro Mazatepec, Tala, Jalisco. Se hicieron tres muestreos durante los meses de febrero, marzo y abril de 2020. Los ejemplares colectados vivos se separaron en dos morfoespecies visualmente reconocidas como roja y verde para fundar colonias (Figura 1). Las muestras vegetales que contenían a los ácaros se transportaron al laboratorio dentro de una hielera, equipada con láminas médicas (cajas de plástico flexible rellenas con gel, el cual se congela y se reutiliza) en su interior, envueltas en papel periódico para evitar el exceso de humedad.

Durante enero y febrero de 2020, se colectaron cadáveres de ácaros tetraníquidos los cuales presentaban signos de infección por hongo patógeno *N. floridana* (Figura 2)-, La colecta se hizo dentro de los invernaderos de producción del ácaro benéfico *P. persimilis*, pertenecientes a la empresa Biobest México, S. A de C.V. Los cadáveres con esporas de *N. floridana*. Fueron colectados con un pincel fino esterilizado y se colocaron en tubos Eppendorf para su transporte y observación en laboratorio. Se hicieron preparaciones con lactofenol para observar las estructuras características de *Neozygites*, descritas en Westrum *et al.* (2014). Adicionalmente se colectaron cadáveres en tubos Eppendorf, con cápsulas de sílica, los tubos fueron cerrados herméticamente con Parafilm ® y se colocaron dentro de recipientes plásticos con capsulas de sílica. Estos contenedores se cubrieron con láminas de aluminio y se refrigeraron a 5°C hasta su experimentación.



Figura 1 .Ácaros observados al estereoscopio para su identificación visual
 A. Hembra adulta de *T. cinnabarinus*. B. Deutonymfa de *T. urticae*.

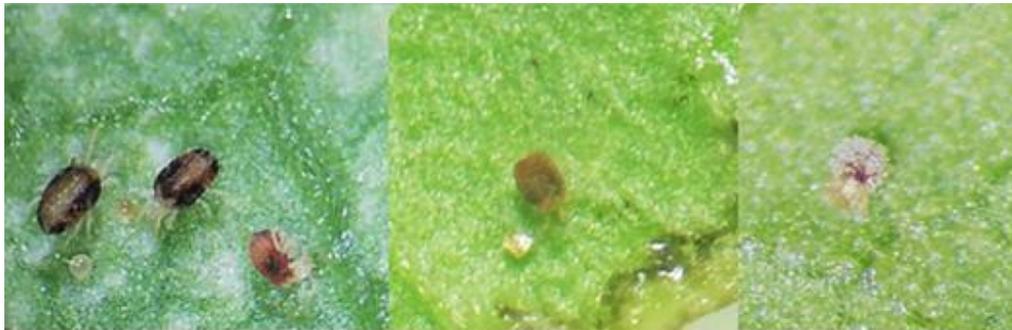


Figura 2. Ácaros identificados visualmente como infectados por *N. floridana*

5.2 Identificación de ácaros basada en su morfología

Con un pincel húmedo se tomaron entre 80 y 100 ejemplares de los ácaros (de cada morfoespecie sanos e infectados) y se fijaron en alcohol etílico 70% grado biología molecular. Aproximadamente 60 ejemplares adultos de las dos morfoespecies citadas, incluyendo machos, se montaron entre porta y cubreobjetos con medio de montaje de Hoyer, siguiendo el método de Krantz y Walter (2009). Adicionalmente, 20 ejemplares se procesaron para su observación en microscopio electrónico de barrido, montado en portamuestras de latón, de acuerdo con el procedimiento descrito por Bozzola y Russel (1999). Finalmente 40 ejemplares se mantuvieron en

alcohol grado biología molecular para ser procesados para extracción de ADN y PCR, como se describe más adelante.

Los ejemplares montados entre porta y cubreobjetos se observaron con un microscopio de contraste de fases Carl Zeiss Primostar, mientras que los ejemplares montados en portamuestras de latón se observaron con un microscopio electrónico Jeol JSM 6390. Para su identificación se tomaron como referencia las claves de Bolland y Flechtmann (1998), así como las redescpciones de *T. cinnabarinus* y *T. urticae* de Tuttle *et al.* (1976).

5.3. Identificación molecular del material biológico

5.3.1 Identificación molecular de *T. cinnabarinus* y *T. urticae*

Para la extracción de ADN de los ácaros utilizados en este trabajo, se utilizó el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN, Germantown, MD, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La prueba de PCR corrió con los primers COIF: 5'-AAGAGGAGGAGGAGACCCAA-3' y XR: 5'-AAACCTCTAAAAATAGCGAATACAGC-3', que amplifican un fragmento del gen COI subunidad I (Folmer *et al.*, 1994; Márquez-Chávez *et al.*, 2019). El volumen de reacción de la PCR fue de 30 µL con 3 µL de buffer 10 X, concentración de dNTP's de 2 mM, cada primer con 20 pM, TaqDNA de 0.5 U y 5 µL de ADN. El programa térmico corrido en un termociclador Thermo Scientific Type 5020 (modelo ITCA0096) fue de un ciclo de 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C, 1 min; 50°C, 1 min; 72°C, 2 min; y un último ciclo de extensión final a 72°C, 10 min. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio (10mg mL⁻¹) en amortiguador TAE 1X.

Los productos de la PCR fueron enviados para secuenciación a la compañía Macrogen Inc. en Corea del Sur. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa MEGA versión 10.0.5 para la obtención de las secuencias consenso y éstas se alinearon (BLAST) con secuencias depositadas en el GenBank para la identificación de especies por similitud en las respectivas secuencias de nucleótidos.

La separación de grupos se realizó con el método de máxima verosimilitud y el modelo de Tamura-Nei utilizando un Bootstrap de 1000 repeticiones. Se presenta el árbol con la mayor probabilidad logarítmica (-1135,54). Los árboles iniciales se obtuvieron aplicando el método

BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el modelo Tamura-Nei. Se aplicó una distribución gamma discreta para modelar las diferencias de tasa de evolución entre los sitios [cinco categorías (+ G, parámetro = 0,2106)].

5.3.2 identificación molecular de *Neozygites floridana*.

Se tomaron grupos de 10 cadáveres de ácaros *Tetranychus* sp. Infectados por hongos identificados tentativamente como *N. floridana*. Se maceraron en 350 µl de amortiguador de lisis (triton 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-Cl pH 8 10 mM, EDTA 1 mM), se agregaron 500 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agitaron en vortex por 30 min, se centrifugaron para la separación de fases acuosa y oleosa (1200 rpm, 4°C por 5 min), se colectaron 500 µl de la fase acuosa y se transfirieron a tubos nuevos, se agregaron 50 µl de acetato de sodio pH 5.2 y 1 ml de etanol absoluto a -20°C, se incubaron en hielo por 30 min, se centrifugaron (1200 rpm, 4°C, por 5 min), se desechó el sobrenadante por decantación, se agregó 1 ml de etanol 70% a -20°C, se agitaron los tubos por rotación, se incubaron en hielo por 15 min, se centrifugaron (12000 rpm, 4°C, por 15 min), se desechó el sobrenadante por decantación, se dejaron secar al aire y se resuspendió el ADN en 100 µl de amortiguador TE (0.1 mM EDTA).

Se corrió PCR de los extractos de DNA total usando el kit Dynazyme EXT DNA Polymerase (Thermo scientific) y los primers 5'-CTGGTTGATTCTGCCAGT-3' 5'-AATGATCCTTCCGCAGGT-3', que amplifican un segmento de ADN ribosomal, con la siguiente mezcla de reacción: 2x Dynazyme PCR master mix, 10 ml, iniciador sentido 0.5 ml, iniciador antisentido 0.5 ml, agua ultrapura 4 ml, ADN molde 5 ml. Volumen final 25 µl. El programa de PCR fue de 94°, 3 min; 35 ciclos de 94°, 30 s; 52°, 45 s; y 72°, 60 s; con un ciclo de extensión final a 72° por 5 min, más 4° por tiempo indefinido. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio (10 mg mL⁻¹) en amortiguador TAE 1X. Los resultados de la PCR fueron enviados a secuenciación a Macrogen Inc. (Corea del sur); las secuencias fueron procesadas para su depuración mediante el programa BioEdit v.7.2.5 (1997-2013), y se alinearon mediante el programa Mega X v.10.1.8 (1995-2018) con la utilización de secuencias depositadas en el GenBank.

5.4. Fundación de las colonias de los ácaros

Una vez que se colectaron las morfoespecies de ácaros de interés, se procedió a fundar colonias, para lo cual se utilizó frijol (*P. vulgaris*) de la variedad denominada “Peruano” o “Normal”, cultivado en macetas negras de aproximadamente 20 x 20 cm, en condiciones de invernadero. Estas colonias se mantuvieron en cuartos climatizados separados, a 25-33 °C, humedad relativa de 50-70% y fotoperiodo de 12:12 h luz/obscuridad. Las plantas fueron reemplazadas después de dos a tres semanas de infestación con los tetraníquidos, por lo que cada semana se sembraron nuevas macetas con frijol.

5.5 Desarrollo y mortalidad de ácaros sanos y expuestos a la infección por *N.*

floridana

Para evaluar el tiempo de desarrollo y estimar la mortalidad de *T. urticae* y *T. cinnabarinus*, se elaboraron 60 arenas experimentales por cada morfoespecie. Las arenas experimentales consistían en frascos de acrílico de 2.5 cm de diámetro y 3 cm de altura cuya tapa fue perforada en forma de cuadrado de aproximadamente 0.5 cm x 0.5 cm, y el orificio fue cubierto con malla de serigrafía para evitar el escape de los ácaros. Cada frasco contenía una capa de algodón humedecido con 10-12 gotas de agua; sobre el algodón se colocó un disco de hoja de *P. vulgaris* de 2.5 cm de diámetro con la cara abaxial hacia arriba (justo el diámetro del frasco para evitar que los ácaros cayeran al algodón).

Las condiciones controladas para las arenas experimentales fueron: $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$ HR y 12:12 h L: O, el material experimental se mantuvo en un cuarto climatizado. Se evaluó un total de 120 arenas experimentales durante el desarrollo de los ácaros sanos. Una hembra en etapa de deutoninfa quiescente (próxima a mudar para convertirse en adulta) y dos machos adultos fueron colocados por arena experimental, para asegurar la cópula una vez que la hembra llegara a adulta. A las 24 h se retiraron los adultos, dejando únicamente los huevecillos, los cuales fueron contabilizados y monitoreados cada 24 h para documentar su paso por los estados de su desarrollo, así como la mortalidad a lo largo del tiempo. El seguimiento a los huevecillos continuó hasta la muerte de los ácaros que emergieron de ellos. Los discos foliares alimento para los ácaros, fueron reemplazados cada 2-3 días, así como el algodón para evitar contaminaciones.

Al igual que en la etapa anterior, se elaboraron 60 arenas experimentales por morfoespecie, en las que se siguió el desarrollo y la mortalidad de ejemplares de *T. urticae* y *T. cinnabarinus* expuestos a la infección por *N. floridana* (Encabezado 6.2). Los ácaros se manipularon de la misma forma, excepto que a un lado de cada hembra quiescente se colocó un cadáver esporulado de *N. floridana*, el cual previamente había sido colocado durante 3 h en una cámara húmeda $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $95 \pm 5\%$ HR y 12:12 h L: O para promover su esporulación (Da Silveira, 2013). A las 24 h fueron retirados la hembra, los machos y el cadáver, y los huevecillos presentes fueron monitoreados hasta su etapa adulta y muerte. Para cada ácaro muerto se hizo un montaje con lactofenol como medio de montaje para observar si estaba infectado por *N. floridana* (Figuras 3 y 4), lo que se interpretó como causa de su muerte. Si los cadáveres no presentaban signos del hongo, se consideró como muerte por causa desconocida.

Los estadios analizados para cada morfoespecie fueron: incubación de huevo, duración del estadio de larva-adulto, longevidad de adulto. En caso de los ácaros expuestos a la infección por *N. floridana* se comparó la longevidad de los adultos entre los que estaban infectados por *N. floridana*, lo que se determinó por la presencia de esporas, y los que murieron por otras causas, no determinadas.

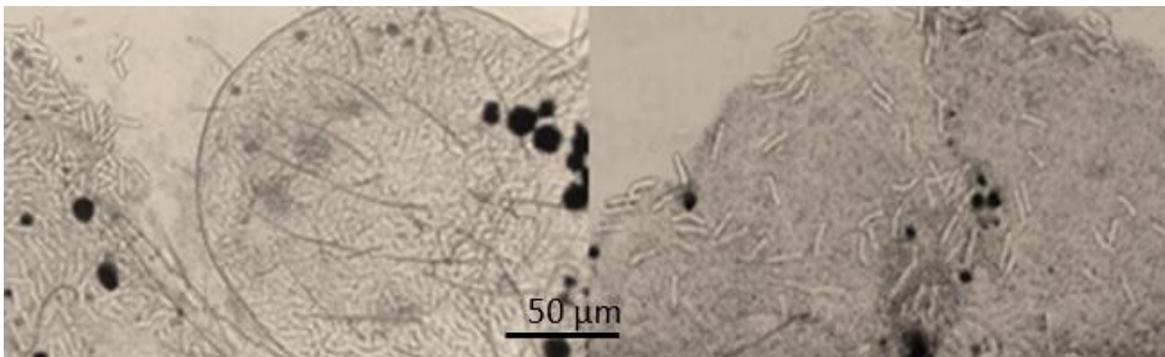


Figura 3. Cuerpos hifales observados dentro de cadáveres de ácaros de ambas morfoespecies. Vista en microscopio óptico de contraste de fases.

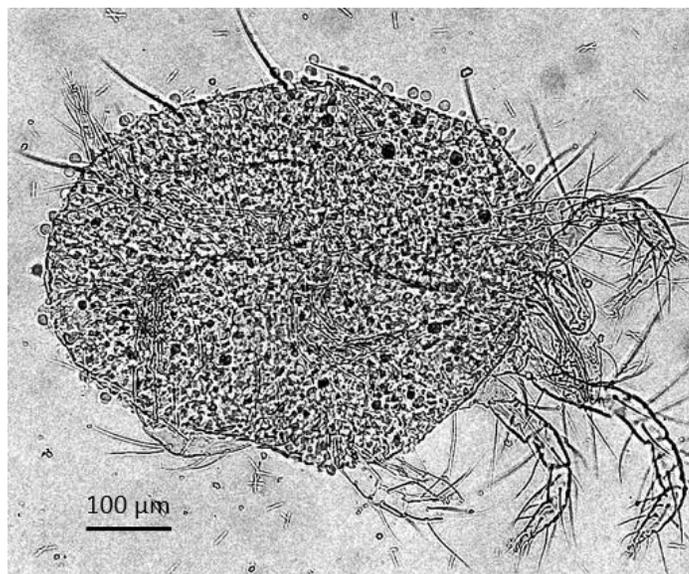


Figura 4. Hembra de *T. cinnabarinus* infectada por *N. floridana*. Vista en microscópico óptico de contraste de fases.

5.6 Fecundidad de ácaros sanos y expuestos a la infección por *N. floridana*

Se prepararon 60 arenas experimentales para cada morfoespecie, con el fin evaluar las diferencias en fecundidad entre morfoespecies. Las arenas fueron iguales a las que se usaron en los experimentos previamente descritos. Las condiciones de incubación fueron de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$ HR y 12:12 h L: O.

En este experimento se emplearon hembras quiescentes en estadio de deutoninfa (con el fin de aproximar a las hembras a tener una edad conocida, de un día de vida adulta) con dos machos por hembra para permitir la cópula. Durante toda la vida de cada hembra-, se contaron los huevecillos que puso cada 24 horas y enseguida éstos se eliminaron con la ayuda de un pincel fino. La hoja que servía de alimento para las hembras y los machos fue reemplazada cada tercer día.

Para estimar la fecundidad de las morfoespecies en presencia de *N. floridana*, el procedimiento fue igual al descrito en el párrafo anterior, 60 arenas experimentales por morfoespecie. En esta ocasión, se colocó un cadáver infectado por *N. floridana* justo al lado de la hembra y los machos (el cadáver había sido previamente humedecido en una cámara húmeda para

asegurar la esporulación), se retiró a las 24 h y diariamente se contaron los huevos que la hembra puso hasta que ésta murió.

5.7 Análisis estadístico

Para comparar el tiempo de desarrollo entre *T. cinnabarinus* y *T. urticae*, con y sin exposición a la infección por *N. floridana*, se realizó un análisis de la varianza con el cual se estimó la significancia de ambos factores y su interacción. Previamente se corroboraron los supuestos para aplicar análisis de varianza. La variable respuesta fue el tiempo entre un estadio de desarrollo y otro. Para evaluar las diferencias entre grupos se utilizó la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). De la misma manera, se analizó la longevidad de las hembras madres utilizadas en cada arena experimental.

Se trazaron las curvas de mortalidad de los ácaros, se les comparó entre especies con y sin la exposición a *N. floridana*, mediante la prueba no paramétrica Log-Rank. El porcentaje de ácaros muertos por *N. floridana* fue corregido mediante la fórmula de Abbott.

Para evaluar la fecundidad de las morfoespecies, hasta la muerte de las hembras, tanto en presencia como en ausencia de *N. floridana* (encabezado 4.6), se realizó un análisis de varianza y prueba de Tukey para cada día, en el que previamente los supuestos fueron propiamente validados. El análisis estadístico se realizó mediante el lenguaje de programación R versión v 4.0.5.

VI. RESULTADOS

6.1 Identificación de morfoespecies de ácaros con base en características morfológicas

De acuerdo con Tuttle *et al.* (1976), una de las principales características morfológicas para distinguir a *T. cinnabarinus* de *T. urticae* es la forma del edeago, donde en *T. cinnabarinus* la cabeza del edeago es ligeramente redondeada, mientras que en *T. urticae* es ligeramente más puntiaguda (Figura 5). No se pudieron observar diferencias evidentes y constantes en la forma de los edeagos de estas morfoespecies, lo cual se atribuye al alto polimorfismo que existe (Auger *et al.*, 2013), así como a que por su pequeño tamaño el edeago se encuentra en el límite de la resolución de la microscopía óptica de contraste de fases.

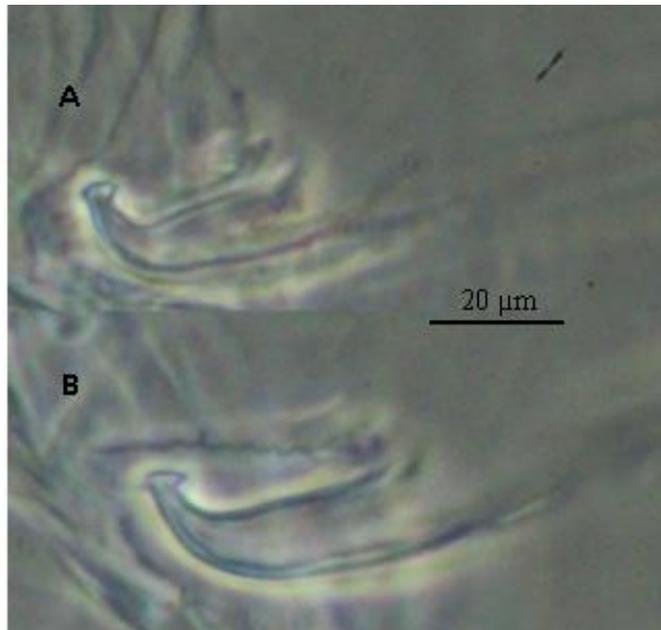


Figura 5. Edeagos de machos observados bajo microscopio óptico contraste de fases. 1000x.
A. Edeago de *T. cinnabarinus*. B. Edeago de *T. urticae*.

Otra característica distintiva entre *T. cinnabarinus* y *T. urticae* es la forma de los lóbulos o microtubérculos de las estrías del dorso de las hembras. En la primera morfoespecie son más altos que anchos; es decir, “forma de punta” (Figura 6A), mientras que en la segunda especie son redondeados (Figura 6B). En esta característica las dos morfoespecies estudiadas fueron claramente diferentes y coincidieron con las respectivas redescripciones de Tuttle *et al.* (1976).

Con esta base, la morfoespecie roja se confirma como *T. cinnabarinus*, mientras que la morfoespecie verdosa con dos manchas se confirma como *T. urticae*, si bien no se definen como especies separadas.

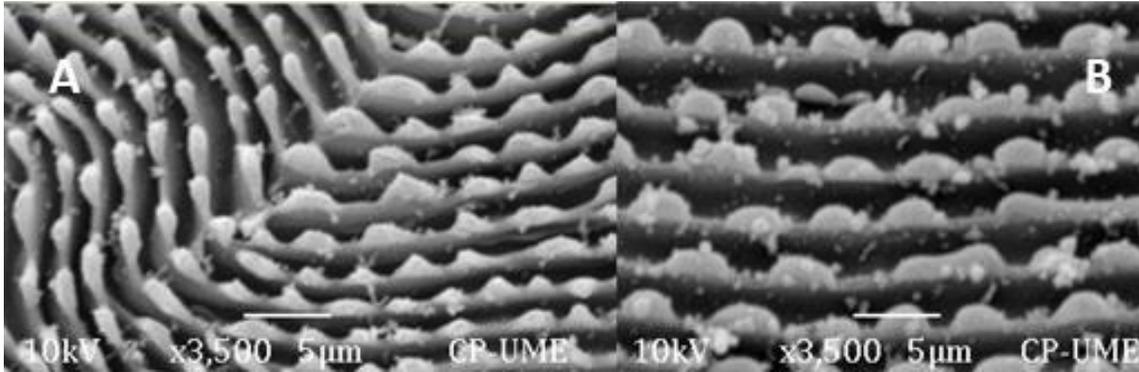


Figura 6. A. Lóbulos dorsales de la hembra *T. cinnabarinus* vista frontal. B. Lóbulos dorsales de la hembra *T. urticae* vista frontal. Vistas en microscopio electrónico de barrido.

6.1.1 Identificación de *N. floridana* con base a características morfológicas

De acuerdo con Keller (1997), las estructuras principales para la identificación de *N. floridana* incluyen cuerpos hifales redondeados, o redondeados en algún extremo, conidióforos no ramificados, conidios primarios oblongos o esféricos con 3-8 núcleos, capilliconidios con tubos capilares, zigosporas de forma elipsoide o esférica, binucleada, de coloración café oscuro llegando a negro, raramente se pueden encontrar azigosporas; cistidios y rizoides ausentes.

Estas características en las estructuras mencionadas por Keller coinciden con las presentadas en Mycobank (2005) para la descripción de la especie *N. floridana*, así como con las estructuras observadas para este trabajo, por lo cual, con base en criterios morfológicos, el material colectado se identifica como *N. floridana* (Figuras 7, 8 y 9).

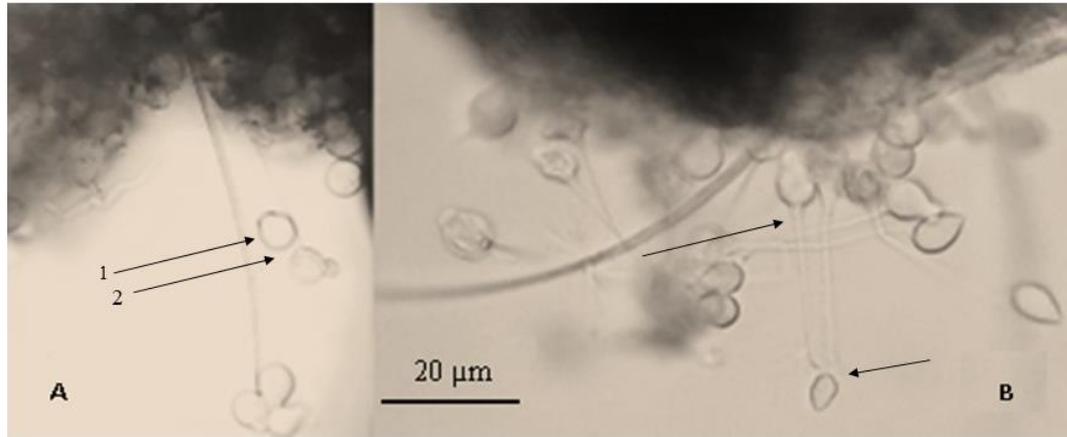


Figura 7. Estructuras observadas de *N. floridana*. A1. Conidios primarios. A2. Conidios secundarios. B. Formación de capilliconidios y tubos capilares.

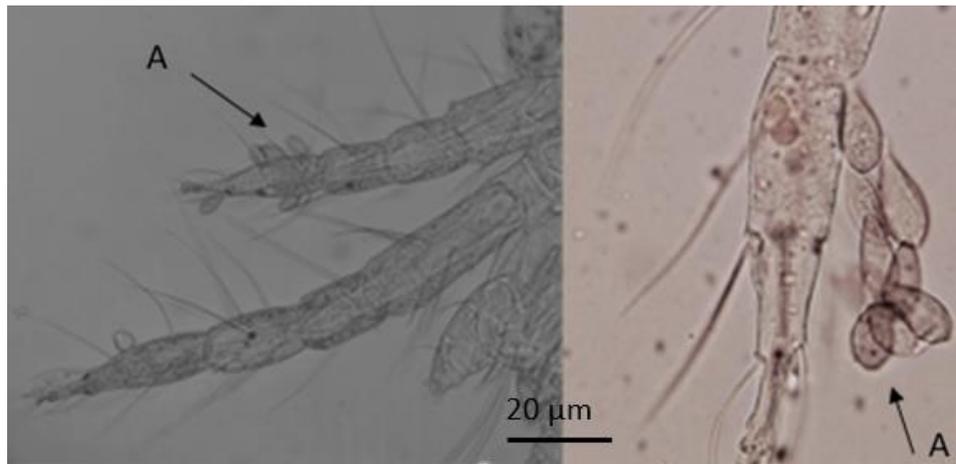


Figura 8. A. Capilliconidios anclados en extremidades de *T. urticae* y *T. cinnabarinus*.

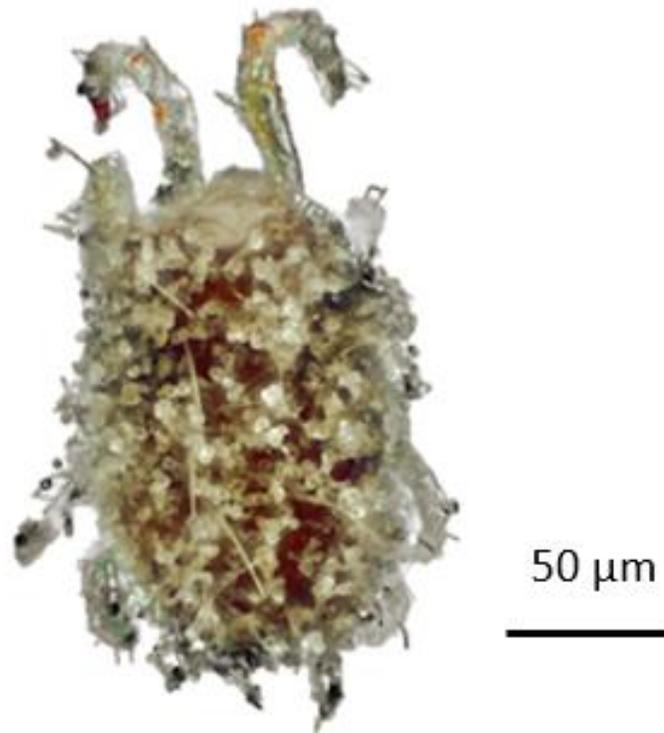


Figura 9. Ácaro esporulado, infectado por *N. floridana*

6.2 Caracterización molecular de *T. cinnabarinus*, *T. urticae* y *N. floridana*.

Las dos morfoespecies de ácaros analizadas tuvieron elevados porcentajes de similitud con secuencias de nucleótidos depositadas en el GenBank e identificadas como *T. urticae* (Cuadro 1).

Para el análisis de haplotipos se usaron secuencias representativas de cada morfoespecie de ácaros. Para *T. cinnabarinus*, el programa detectó tres haplotipos (Cuadro 2), mientras que en el caso de *T. urticae* se encontraron seis haplotipos (Cuadro 3).

Se dibujó un árbol filogenético a escala, con las longitudes de las ramas medidas en número de sustituciones por sitio, el cual fue construido con los resultados obtenidos de la secuencia de alineación, con valores de bootstrap mayores al 50% basado en 1000 réplicas; dichos valores son indicados en los nódulos de la Figura 10. Este análisis involucró 15 secuencias de nucleótidos, con un total de 926 posiciones.

Cuadro 1. Identificación molecular de morfoespecies de *Tetranychus* por similitud con secuencias parciales del gen COI depositadas en GenBank.

Morfoespecie	Secuencia con máxima similitud	Cobertura	Porcentaje de identidad	Clave de acceso GenBank
<i>T. cinnabarinus</i> (forma roja)	<i>T. urticae</i> linaje 2	100	100	gi 1698884830 MK508713.1
	<i>T. urticae</i>	100	100	gi 459213577 AB736081.1
	<i>Tetranychus urticae</i> aislamiento TNAU000314- 000323	100	100	gi 951591385 KR870317.1
<i>T. urticae</i> (forma verde con dos manchas)	<i>T. urticae</i> aislamiento TU02	100	100	gi 739057856 KM596708.1

Para realizar las comparaciones por grupos se utilizaron las secuencias COI AB736076 (*T. urticae*, forma verde) y AB736079 (*T. urticae*, forma roja) utilizadas por Matsuda *et al.* (2014). La secuencia de la morfoespecie verde, designada aquí como *T. urticae*, se agrupó con la secuencia citada arriba; AB736076, mientras que la secuencia de la morfoespecie roja, identificada aquí como *T. cinnabarinus*, se agrupó con la secuencia de la especie citada como de color rojo; AB736079.

Cuadro 2. Haplotipos de *T. cinnabarinus* determinados mediante el programa DNA Sequence Polymorphism v.6.12.03.8

Secuencia	Enzima	Sitio	Corte	Posición 5´ext-3´ext
Hap1:1 (8B)	ASeI	ATTAAT	1	412/414
Hap2:1 (7B)	ApoI	RAATTY	5	276/280,304/308,399/403,420/424,430/434
Hap 3:2 (2B;1B)	ASeI	ATTAAT	1	414/416
	ApoI	RAATTY	3	276/280,304/308,397/401

Cuadro 3. Haplotipos de *T. urticae* determinados mediante el programa DNA Sequence Polymorphism v.6.12.03.8

Secuencia	Enzima	Sitio	Corte	Posición 5´ext-3´ext
Hap 1:1(18C)	ASeI	ATTAAT	1	429/431
	ApoI	RAATTY	3	290/294,318/322,412/416
Hap2:1 (16C)	ASeI	ATTAAT	1	413/415
	ApoI	RAATTY	3	275/279,303/307,396/400
Hap3:4(6C) (14C;13C;10C,3C)	ApoI	RAATTY	3	279/283,307/311,400/404
	ASeI	ATTAAT	1	417/419
5C Hap 5:1 (5C)	ApoI	RAATTY	3	280/284,308/312,400/404
Hap 6:1(1C)	ASeI	ATTAAT	1	416/418

Por otra parte, se encontró un solo haplotipo de *Neozygites*, el cual tuvo 99.84% de similitud con la secuencia identificada como extraída de *N. floridana*. Aislamiento ARSEF 662 (clave de acceso gi|22535856|AF296759.1), así como 99.84% de similitud con la secuencia identificada como extraída de *N. floridana* del aislamiento ARSEF 5376 (clave de acceso gi|37927330|AY233984.1). Con lo anterior se corrobora la identificación de los hongos colectados y analizados como *N. floridana*.

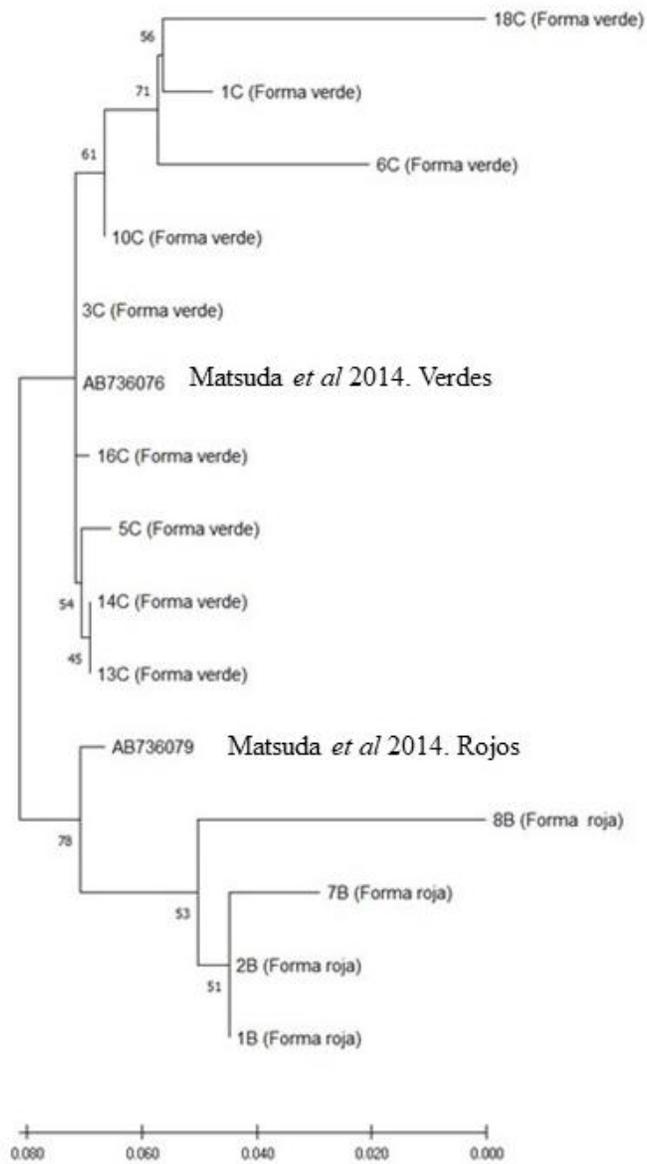


Figura 10. Árbol filogenético de separación de ácaros, con el método Máxima *verosimilitud* *T. cinnabarinus* (forma roja) y *T. urticae* (forma verde) (ML), basado en el gen mitocondrial COI, usando el modelo Tamura-Nei con una distribución Gamma, valores de Bootstrap basados en 1000 réplicas.

6.3 Desarrollo y mortalidad de *T. cinnabarinus* y *T. urticae* con y sin presencia de *N. floridana*.

Como resultado del análisis estadístico entre morfoespecies, no se encontraron diferencias significativas en periodo de incubación huevo ($F_{1,224}=0.0407$, $P=0.8403$) y desarrollo larva-adulto ($F_{1,224}=3.2252$, $P=0.0738$); en cambio para la longevidad del adulto se encontraron diferencias significativas ($F_{1,224}=52.186$, $P<0.0001$). Por otra parte, los tiempos de desarrollo evaluados en presencia y ausencia de *N. floridana* mostraron diferencias significativas en todos los estadios evaluados: periodo de incubación huevo ($F_{1,224}=29.88$, $P<0.0001$), desarrollo larva-adulto ($F_{1,224}=62.7271$, $P<0.0001$) y Longevidad-adulto ($F_{1,224}=2346.102$, $P<0.0001$). No se observó interacción significativa entre la exposición (o no) por *N. floridana* y las morfoespecies en el periodo de incubación huevo ($F_{1,224}=0.4850$, $P=0.4869$); en contraste, sí se registró interacción significativa en el desarrollo de larva-adulto ($F_{1,224}=17.9547$, $P<0.0001$); y longevidad de los adultos ($F_{1,224}=10.052$, $P<0.001$).

La exposición de los ácaros al patógeno incrementó el porcentaje de mortalidad, este efecto fue más evidente para la morfoespecie *T. urticae*, tal como se muestra en la Figura 11.

Cuadro 4. Duración de estadios de *T. urticae* y *T. cinnabarinus* en presencia y ausencia de *N. floridana* (media \pm EE).

	Incubación de huevo (días)	Desarrollo larva-adulto (días)	Longevidad de adultos (días)
COMPARACIONES			
<i>T.urticae</i>	4.56 \pm 0.196 a	6.80 \pm 0.252 a	17.04 \pm 1.413 b
T.u N	3.69 \pm 0.067 b	4.01 \pm 0.083 c	0.81 \pm 0.234 d
<i>T.cinnabarinus</i>	4.49 \pm 0.093 a	5.42 \pm 0.137 b	20.77 \pm 0.433 a
T.c N	3.82 \pm 0.165 b	4.57 \pm 0.349 c	2.26 \pm 0.318 c

*T.uN= *Tetranychus urticae*+ *Neozygites*, T.cN= *Tetranychus cinnabarinus* + *Neozygites*. Valores dentro de columnas, seguidos por la misma letra, no son estadísticamente diferentes. Tukey $\alpha=0.05$.

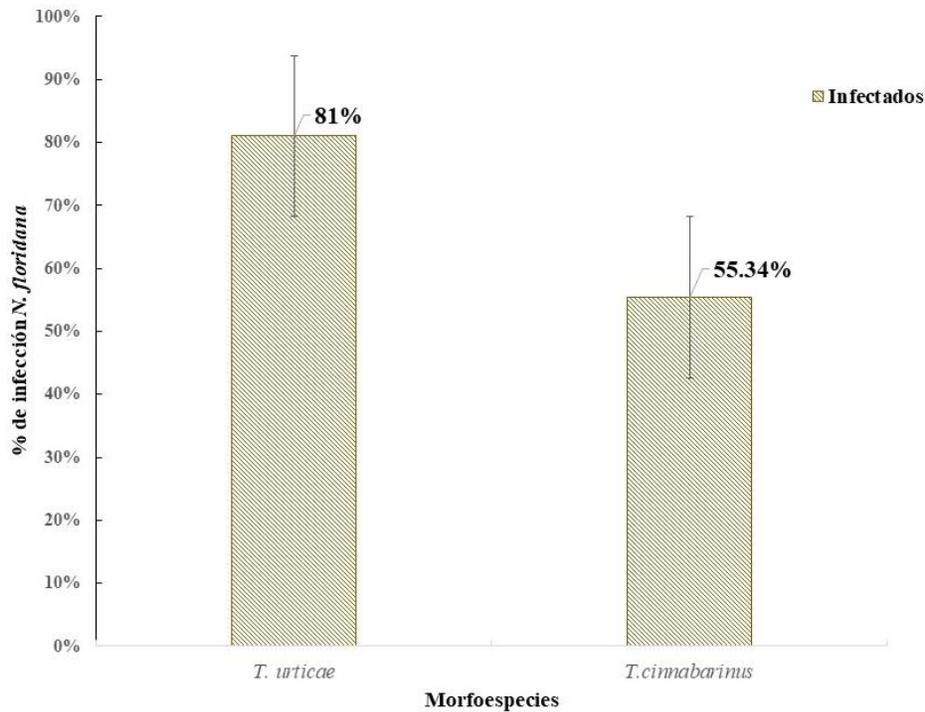


Figura 11. Porcentajes de infección entre *T. urticae* y *T. cinnabarinus* hacia *N. floridana* mediante la fórmula de Abbott corregida.

Los resultados de las curvas de supervivencia muestran diferencias significativas entre las morfoespecies comparadas tanto en presencia como ausencia de *N. floridana*. La comparación de las curvas de supervivencia entre morfoespecies sin la presencia de *N. floridana* mostró diferencia significativa: Tc-Tu ($\chi_1^2=38.70$, $P=0.0002$). Por otra parte, las curvas analizadas donde una morfoespecie fue expuesta al patógeno y otra morfoespecie no fue expuesta a *N. floridana* muestran diferencias significativas con los siguientes valores: Tc-TcN ($\chi_1^2=86.82$, $P=0.0002$), Tu-TuN ($\chi_1^2=68.95$, $P=0.0008$), Tc-TuN ($\chi_1^2=85.70$, $P=0.0002$), Tu-TcN ($\chi_1^2= 871.06$, $P=0.0008$). Para finalizar, las curvas de ambas morfoespecies expuestas a *N. floridana* fueron comparadas, resultando los siguientes valores TcN-TuN ($\chi_1^2=18.36$, $P=0.006$) (Figura 12). Los valores porcentuales más altos de supervivencia de individuos se observaron en *T. cinnabarinus* cuando se compararon los tratamientos con o sin exposición a *N. floridana*.

CURVAS DE MORTALIDAD

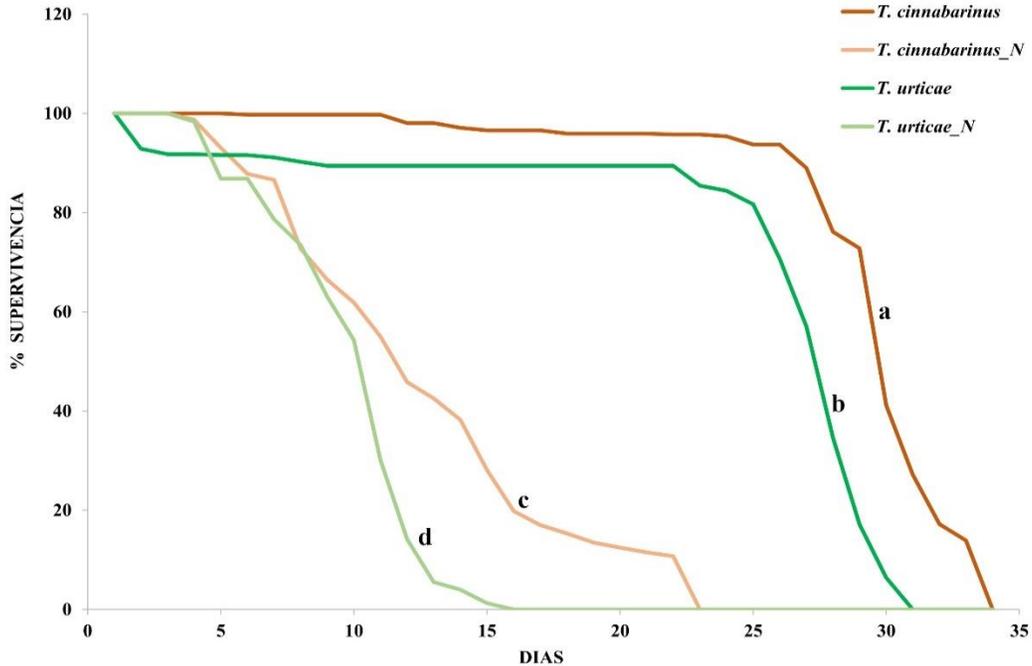


Figura 12. Curvas de mortalidad mediante Log-Rank, *T. urticae* y *T. cinnabarinus*, en ausencia y presencia de *N. floridana*, desde huevo hasta su muerte.

6.4 Fecundidad de *T. cinnabarinus* y *T. urticae* en presencia y ausencia de *N. floridana*

La fecundidad promedio de las hembras de ambas morfoespecies, en presencia y ausencia de *N. floridana*, muestran diferencias significativas entre los huevos promedio por día ($P < 0.0001$). Los promedios graficados en la (Figura 13) muestran que *T. cinnabarinus* presentó la mayor fecundidad promedio por día; así mismo, se puede apreciar en el día 5 que la fecundidad promedio de *T. urticae* en presencia de *N. floridana* se redujo a cero, mientras que para *T. cinnabarinus* bajo la misma condición, la fecundidad promedio se mantuvo, entre 2.5 huevos por día (Tukey $\alpha = 0.05$). Como resultado las pruebas estadísticas, se confirma que la fecundidad promedio entre hembras con y sin presencia de *N. floridana* es mayor para la (forma roja) *T. cinnabarinus*.

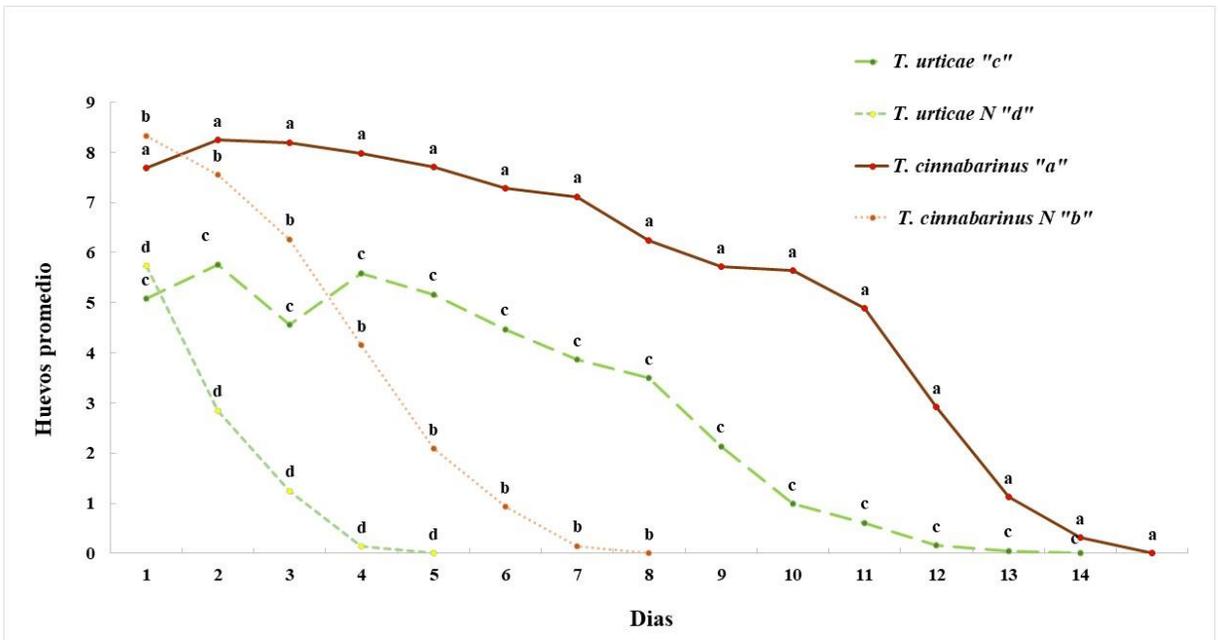


Figura 13. Promedio de huevos por día. Las letras corresponden a comparaciones entre tratamientos dentro de cada día (Tukey $\alpha=0.05$)

VII. DISCUSIÓN

Se analizaron y fotografiaron los edeagos de machos de las dos morfoespecies; sin embargo, no mostraron diferencias morfológicas evidentes (Figura 5). En las fotografías de los lóbulos dorsales que se encuentran en el integumento de hembras, sí se observaron diferencias entre los lóbulos dorsales de *T. cinnabarinus* al ser más agudos en su parte apical, mientras que los lóbulos de *T. urticae* eran más redondeados apicalmente. Estas diferencias entre los lóbulos dorsales de las hembras han sido estudiadas previamente por varios autores, como Auger *et al.* (2013), quienes hacen una revisión exhaustiva de las características morfológicas utilizadas para separar *T. cinnabarinus* de *T. urticae*. Aunque las fotografías al microscopio electrónico de barrido muestren una clara evidencia de los patrones entre morfoespecies (figura 6), para autores como Auger *et al.* (2013), esta característica, así como la comparación de edeagos, no son consideradas contundentes para la identificación, debido a la variación en los tamaños de los lóbulos de la misma morfoespecie.

Las diferencias genéticas encontradas en las regiones de ADN codificadas con el marcador molecular COI permiten agrupar a las dos morfoespecies como distintas entre sí. En este trabajo se observaron tres haplotipos a la morfoespecie *T. urticae* y seis haplotipos a la morfoespecie *T. cinnabarinus*; estos resultados concuerdan con las diferencias genéticas encontradas por Li *et al.* (2009) quienes, utilizando microsátélites como marcadores moleculares, encontraron diferencias moleculares entre *T. cinnabarinus* y *T. urticae*. Sin embargo, para Auger *et al.* (2013), estos estudios no sustentan la distinción monofilética de las dos morfoespecies. Por su parte, sólo se detectó un haplotipo de *N. floridana*, lo cual es consistente con el hecho de que se hizo una sola colecta de esta especie.

Como resultado de la experimentación, no se elaboraron tablas de vida para esta investigación, debido a que la investigación se desarrolló en dos experimentos independientes. Los datos obtenidos sobre la duración en el desarrollo de *T. urticae*, así como la proporción sexual de hembras (Tu 3:1, Tc 4:1) y fecundidad, coinciden con los estimados por Badii *et al.* (2010) y Peralta y Tello (2011), con ácaros no expuestos a infección por *N. floridana* y en trabajos independientes. Si bien para estos autores no existen diferencias marcadas respecto al desarrollo, y proporción sexual entre morfoespecies, en el presente trabajo sí se encontraron diferencias en cuanto a la longevidad de *T. cinnabarinus* y *T. urticae*, en donde las hembras adultas de *T.*

cinnabarinus resultaron ser más longevas con un promedio de 20.77 días de vida desde adulto hasta su muerte, mientras que *T. urticae* sobrevivió 17.04 días (Cuadro 4). Misma información que se corrobora con las curvas de mortalidad (Figura 12), así mismo se encontraron diferencias en las proporciones sexuales de la descendencia de hembras infectadas por *N. floridana* (TcN 8:1, TuN 3:1), lo cual explica la alta tasa de fecundidad en hembras de *T. cinnabarinus*.

Cuando se expuso a las dos morfoespecies a la infección por *N. floridana*, se observó una reducción significativa en el tiempo de incubación de los huevos respecto a aquellos no expuestos a la infección (Cuadro 4), asimismo con el tiempo de desarrollo desde larva hasta adulto y una reducción significativa en la longevidad de los adultos expuestos a *N. floridana*. No hay antecedentes sobre un mecanismo que explique por qué la exposición al patógeno de interés acelera la incubación y el desarrollo de los ácaros; se especula que los ejemplares expuestos a dicho hongo sufren una reacción de SOS, acelerando su desarrollo para alcanzar a reproducirse antes de morir o bien el aumento de alimento debido a aquellos individuos muertos, mejorando su fitness ecológico. Por su parte, la reducción en la longevidad de los adultos se atribuye simplemente al efecto letal de *N. floridana*.

Las curvas de mortalidad muestran diferencias significativas (Log Rank, P = 0.05) entre los ácaros infectados por exposición directa a *N. floridana* y ambas morfoespecies cuando no fueron expuestas, (Figura 12). La frecuencia de infección por *N. floridana* encontrada en las dos morfoespecies coloca a *T. urticae* como más susceptible a muerte por infección de *N. floridana*.

La explicación a estos porcentajes de mortalidad puede ser justificada por la presencia de carotenoides en los ácaros tetraníquidos; según Grbíc *et al.* (2011), dichos carotenoides están ligados a genes homólogos de hongos Zygomycetes, por transferencia lateral. Si bien muchos trabajos sobre los carotenoides en el reino animal han sido enfocados a la adquisición de éstos, por la metabolización a través del alimento, actualmente se ha comenzado a investigar sobre los genes que están involucrados en el transporte, proceso y deposición de carotenoides como parte de un proceso evolutivo (Toews *et al.*, 2017). Altincicek *et al.* (2012) encontraron diferencias significativas entre la concentración de carotenoides contenidos en las dos morfoespecies motivo del presente estudio, *T. cinnabarinus* (forma roja) posee mayor concentración de carotenoides que *T. urticae* (forma verde), y esto puede ser este el motivo por el cual la susceptibilidad de *T.*

cinnabarinus es menor hacia *N. floridana*. De igual manera, los cambios en el genoma de *T. cinnabarinus* y *T. urticae* pueden conducir a un proceso de diferenciación.

De acuerdo con estos resultados obtenidos, se concluye que *T. cinnabarinus* presenta un mayor potencial reproductivo debido a su longevidad y fecundidad promedio ante la presencia del patógeno *N. floridana*, lo cual se traduce en mayor número de descendientes, mayor adaptabilidad y persistencia en cultivos. En los resultados obtenidos del análisis de varianza factorial, ni las morfoespecies ni la presencia y ausencia de *N. floridana* influyen el desarrollo de los estadios de incubación de huevo y desarrollo de larva, pero sí influyen en la longevidad de los adultos, donde la longevidad de las hembras de *T. urticae* resulta ser menor que en el caso de *T. cinnabarinus*. Esto puede ser explicado debido que los machos son atraídos por hembras infectadas con *N. floridana*, dispersando las esporas en hembras sanas al momento de buscar aparearse y con ello incrementando la posibilidad de infección en hembras adultas (Trandem *et al.*, 2015). Así mismo, La longevidad en las hembras de *T. cinnabarinus* es un factor que explica la alta tasa de fecundidad presentada en este trabajo. La presencia o ausencia de *N. floridana* fue significativamente diferente en todos los estadios de desarrollo, entre las morfoespecies, dicha condición es evidente en el (Cuadro 4) donde las comparaciones entre las medias de los estadios cambian drásticamente ante la condicionante del patógeno. La interacción entre las morfoespecies en presencia y ausencia de *N. floridana* no influye en el desarrollo de los estadios de incubación de huevo, pero sí en el desarrollo de larva, y la longevidad de los adultos entre morfoespecies; en donde la interacción entre la morfoespecie y la presencia de *N. floridana* disminuye la longevidad de *T. urticae* contrastado con *T. cinnabarinus*.

Para finalizar, después de analizar todo este conjunto de características, morfológicas y biológicas, se establece que existe un nivel de fecundidad, supervivencia y desarrollo más elevado en los ácaros aquí mencionados como *T. cinnabarinus*, los cuales, dentro de un sistema de cría masiva, pueden ser empleados como alimento funcional para depredadores como *P. persimilis*, por lo que este estudio apoya de manera directa a solucionar la problemática antes señalada, en la mejora de la alimentación para la producción de ácaros depredadores.

VIII. CONCLUSIÓN

Las diferencias morfológicas en los lóbulos dorsales de las hembras entre *T. cinnabarinus* y *T. urticae*, las cuales concuerdan con las descripciones características de cada “especie”, así como diferencias moleculares entre las mismas, se inclinan a descartar la sinonimia entre *T. cinnabarinus* y *T. urticae*.

Se encontraron diferencias significativas entre el desarrollo y fecundidad de *T. cinnabarinus* y *T. urticae*, así, como en la probabilidad de muerte por infección por *N. floridana*, donde *T. cinnabarinus* presentó una menor susceptibilidad a este hongo. Estos resultados apoyan de manera directa en la producción de ácaros depredadores, por lo que se propone la utilización de *T. cinnabarinus* como alimento dentro de la cría masiva de ácaros depredadores, principalmente a *P. persimilis*. Sin embargo, se establece la necesidad de nuevos estudios sobre los segmentos genéticos utilizados, debido al nivel de polimorfismo presente en estos ácaros y su amplia adaptación, mutación y resistencia a insecticidas y cambios ambiental.

IX. LITERATURA CITADA

- Agboton B., Hanna R., Hountondji F., Tiedemann A., 2009. Pathogenicity and host specificity of Brazilian and African isolates of the acaropathogenic fungus *Neozygites tanajoae* to mite species associated with cassava. *Journal of Applied Entomology*. 133: 651-658.
- Aguilar-Mendel S., Díaz-Gómez O., Rodríguez- Maciel J., González-Camacho J. E., García-Velazco R., Martínez-Carrillo J., Resendíz-García B. 2011. Resistencia de *Tetranychus urticae* Koch a acaricidas usados en la producción de rosal de invernadero en México. USA. *Southwestern Entomologist*. 36(3):363-371
- Aliniaze M., Croft B. 1999. Chapter 28. Biological control in deciduos fruit crops. Editors: Bellows, T. & Fisher, T. *Handbook of Biological Control*. Academic Press.
- Altincicek B., Kovacs J., Gerardo N. 2012. Horizontally transferred fungal carotenoid genes in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *4 Biology Letters*. 8: 253-257.
- Arguelles A., Plazas N., Táutiva L., Cantor F., Bustos A., Rodríguez D. 2006. Evaluación de un método a campo abierto para la producción de *Tetranychus urticae* - Koch (Acari: Tetranychidae), como suministro de presas para *Phytoseiulus persimilis* – Athias. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. 1(2): 117-122.
- Auger P., Migeon, A., Ueckermann E., Tiedt L., Navajas M. 2013. Evidence for synonymy between *Tetranychus urticae* and *Tetranychus cinnabarinus* (Acari, Prostigmata, Tetranychidae): Review and new data. *Acarologia*. 53: 383–415.
- Badii M., Flores J., Cerna E. 2010. Regulación poblacional de ácaros plaga de impacto agrícola. *International Journal of Good Conscience*. 5: 270-302.
- Badii M., Abreu J. 2006. Control biológico una forma sustentable de control de plagas. *Daena International Journal of Good Conscience*. 1(1): 82-89.
- Barta M., Cagán, L. 2006. Aphid-Pathogenic Entomophthorales (Their taxonomy, biology and ecology). *Biologia*. 61(21): 543-616.
- Berdinesen R. 2012. Epidemic development of *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Neozygiteaceae) in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) populations with and without the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). Master theses. Norwegian University of life science.
- Bolland, H., Gutiérrez J., Fletchmann C. 1998. World catalogue of the spider mite family (Acari: Tetranychidae). Brill Academic Publishers, Leiden.
- Boudreaux H. 1956. Revision of the two-spotted spider mite (Acarina, Tetranychidae) complex, *Tetranychus telarius* (Linnaeus). *Annals of the entomological society of America*. 49: 43-48.
- Boudreaux H., Dosse G. 1963. The usefulness of the taxonomic characters in females of the genus *Tetranychus* Dufour (Acari: Tetranychidae). *Acarologia*. 5: 13-33.

- Bozzola J., Russell L. 1999. Electron Microscopy: Principles and techniques for biologist. Jones and Bartlett, Boston.
- Brandenburg R., Kennedy G. 1981. Differences in dorsal integumentary lobe densities between *Tetranychus urticae* Koch and *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acarina: Tetranychidae) from northeastern North Carolina. International Journal of Acarology. 7(1-4): 231-234.
- Castro T., Wekesa V., Moral R., Demetrio G., Delalibera I., Klingen I. 2013. The effects of photoperiod and light intensity on the sporulation of Brazilian and Norwegian isolates of *Neozygites floridana*. Journal of Invertebrate Pathology. 114:230-233
- Cerna E., Ochoa-Fuentes Y., Aguirre-Urbe L., Badii M., Gallegos M., Flores J. 2009. Resistance levels in populations of *Tetranychus urticae* in strawberry crops. Revista Colombiana de Entomología. 35: 52-56.
- Croft B., Hull L. 1983. The orchard as an ecosystem. Integrated Management of Insect Pests of Pome and Stone Fruits. Wiley. New York, NY.
- Croft B., 1990. Arthropod Biological Control Agents and Pesticides. Wiley. New York, NY.
- Da Silveira-Duarte V., Westrum K., Lopes Ribeiro A., Guedes-Corrêa G., Junior M., Klingen I., Delalibera I. 2013. Abiotic and biotic factors affecting resting spore formation in the mite Pathogen *Neozygites floridana*. International Journal of Microbiology. 2013: 276168.
- Da Silveira Duarte V., Silva, R., Wekesa, V., Rizzato, F., Dias C., Delalibera It. 2009. Impact of natural epizootics of the fungal pathogen *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) on population dynamics of *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) in tomato and nightshade. Biological Control. 51:81-90.
- Smitley D., Brooks W., Kennedy G. 1986. Environmental effects on production of primary and secondary conidia, infection, and pathogenesis of *Neozygites floridana*, a pathogen of the twospotted spider mite, *Tetranychus urticae*. Journal of Invertebrate Pathology. 47 (3): 325-332.
- Daza V., Cantor R., Rodríguez C., Bustos A., Cure J. 2010. Criterios para la producción de *Phytoseiulus persimilis* (Parasitiformes: Phytoseiidae) bajo condiciones de invernadero. Acta Biológica Colombiana. 15(1):37-46.
- De La Peña A., Niño P., Bustos A., Cantor F., Rodríguez D. 2011. Efecto de diferentes tiempos de almacenamiento en frío sobre algunos parámetros de *Phytoseiulus persimilis* (Athias Henriot) y *Neoseiulus californicus* (Parasitiformes: Phytoseiidae). Acta biológica colombiana. 16 (2):63-74.
- Delalibera I., Hajek A., Humber R., 2004. *Neozygites tanajoae* sp. a pathogen of the cassava green mite. Mycologia, 96(5): 1002-1009.

- Dupont L. 1979. On gene flow between *Tetranychus urticae* Koch, 1836 and *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) Boudreaux, 1956 (Acari: Tetranychidae): Synonymy between the two species. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 25: 297-303.
- Fathipour Y., Maleknia M. 2016. Ecofriendly pest management for food security. Chapter 11 mites predators. Elsevier. Academic press.
- Fernandez A., Sanchez E. 2017. Estudio de las propiedades fisicoquímicas y calidad nutricional en distintas variedades de frijol consumidas en México. *Nova Scientia*. 18:133-148.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3(5):294-299.
- Gargas A., DePriest P. 1996. A nomenclature for fungal PCR primers with examples from intron-containing SSU rDNA. *Mycologia*. 88:745–748.
- Grbić M., Van Leeuwen T., Clark R., Rombauts S., Rouzé P., Osborne E., Dermauw W., Ngoc P., Ortego F., Hernández-Crespo P., Diaz I., Martinez M., Navajas M., Sucena E., Magalhaes S., Nagy L., Pace R., Djuranovic S., Van de Peer, Y. 2011. The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature*. 479: 487-92.
- Humber R. 2012. Entomophthoromycota: a new phylum and reclassification of entomophthoroid fungi. *Mycotaxon*. 120:477-492.
- Humber R., Morales, A., Santos D. 1981. Natural infection of *Tetranychus evansi* (Acarina: Tetranychidae) by a *Triplosporium* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales) in northeastern Brazil. *Entomophaga*. 26: 421-425.
- Keller S. 1997. The genus *Neozygites* (Zygomycetes, Entomophthorales) with special reference to species found in tropical regions. *Sydowia*. 49(2): 118-146.
- Keller S. 2008. The arthropod-pathogenic entomophthorales from Switzerland: is central Europe the center of their global species-richness. *Bulletin De La Société Entomologique Suisse*. 81:39-51.
- Keller S., Petrini O. 2005. Keys to the identification of the arthropod-pathogenic genera of the families Entomophthoraceae and Neozygitaceae (Zygomycetes), with descriptions of three new subfamilies and a new genus. *Sydowia*. 57: 23-53
- Kirk P. 1999. Classification of Zygomycetes. *Encyclopedia of food Microbiology*. Elsevier. 882-887.
- Klingen I., Waersted G., Westrum K., 2009. Overwintering and prevalence of *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Neozygitaceae) in hibernating females of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) under cold climatic conditions in strawberries. *Experimental and Applied Acarology*. Amsterdam. 46(4): 231-245.

- Knapp M., Van-Houten Y., Van E., Groot T. 2018. Use of predatory mites in commercial biocontrol: current status and future prospects. *Acarologia*. 58: 72-82.
- Krantz G., Walter, D. 2009. A manual of acarology. Texas Tech University. Lubbock, Texas.
- Li T., Xiao-Lin C., Xiao-Yue H. 2009. Population genetic structure of *Tetranychus urticae* and its sibling species *Tetranychus cinnabarius* (Acari: Tetranychidae) in China as inferred from microsatellite data. *Annals of the Entomological Society of America*. 102 (4): 674-683.
- Lima-Espíndola J., Venegas-Rico J. 2017. Damage caused by *Tetranychus merganser Bondreaux* (Acari: Tetranychidae) on nopal verdura *Opuntia ficus-indica* (L) Miller during winter. *Journal of Entomological and Acarology Research*. 49 (2):121-122.
- Márquez-Chávez A. Guzmán-Franco A. Santillán-Galicia M., Tamayo-Mejía F., Rodríguez-Maciél J. 2019. Effect of host plant on the genetic diversity of *Tetranychus urticae* Koch populations and their susceptibility to fungal infection, *Biological Control*. 137:104015.
- Matsuda T., Morishita M., Hinomoto N., Gotoh T. 2014. Phylogenetic analysis of the spider Mite sub-family Tetranychinae (Acari: Tetranychidae) based on the mitochondrial COI gene and the 18s and the 59 end of the 28s rna genes indicates that several genera are polyphyletic. *PLoS ONE* 9(10): e108672.
- Mendoza R., Navia D., Diniz, I. Auge P., Navajas, M. 2011. A critical review on some closely related species of *Tetranychus* sensu stricto (Acari: Tetranychidae) in the public DNA sequences databases. *Experimental and Applied Acarology*. 55:1-23.
- Migeon A., Dorkeld F. 2013. Spider Mites Web: a comprehensive database for the Tetranychidae. Disponible en: <http://www1.montpellier.inra.fr/cbgrp/spmweb/>. Consultado el 30-jul-2018.
- Montalva C., Barta M., Rojas E., Gutierrez M., Valenzuela E. 2014. *Neozygites* species associated with aphids in Chile: current status and new reports. *Mycotaxon*. 129(2): 233-245.
- Morales J., Rojas M. 2014. A modular cage system design for continuous medium to large scale in vivo rearing al predatory mites (Acari; Phytoseiidae). *Psyche: A Journal of Entomology*. 2014:1-8.
- NAPPO; North American Plant Protection. 2015. Normas Regionales de la NAPPO sobre medidas Fitosanitarias (NRMF). NRMF 12. Directrices sobre la petición para la primera liberación de agentes entomófagos no nativos para el control biológico. Secretaría de la Organización Norteamericana de Protección a las Plantas. Canadá.
- Navajas M. 1998. Host plant associations in the spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): insights from molecular phylogeography. *Experimental and applied acarology*. 22: 201-214.

- Navajas M., Gutierrez J., Bonato O., Bolland H., Mapangou-Divassa, S. 1994. Intraspecific diversity of the Cassava Green Mite *Mononychellus progresivus* (Acari: Tetranychidae) using comparisons of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding. *Experimental and applied acarology*.18: 351-360.
- Onstad D., Knolhoff L. 2014. Arthropod Resistance to Crops, in insect resistance management biology, economics and prediction (Second Edition). Academic Press. London.
- Martínez-Jaime O., Salas-Araiza M., Salazar-Solís E., Preciado-Ramírez M., Bucio-Villalobos C. 2015. Control de la araña roja (*Tetranychus urticae* Koch.) (Acari: Tetranychidae) en rosal (*Rosa* sp.) bajo condiciones de invernadero. *Entomología Mexicana*. 2: 429-434.
- Peralta O., Tello V. 2011. Tabla de vida de *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) sobre tres variedades de melón, *Cucumis melo*. *Revista Colombiana de Entomología*. 37 (1): 21-26.
- Pilkington L., Messelink G., Van Lenteren J., Le Mottee K. 2010. Protected biological control: biological pest management in the greenhouse industry. *Biological Control*. 52: 216-220.
- Ribeiro A., Guedes M., Calderan E., Delalibera I. 2009. Host range of *Neozygites floridana* isolates (Zygomycetes: Entomophthorales) to spider mites. *Journal of Invertebrate Pathology*. 102(3):196-202.
- Robert V., Stegehuis G., Stalpers J., 2005. The MycoBank engine and related databases. <https://www.mycobank.org/> consultado el 10 mayo 2021.
- Robles-Bermúdez A., Robles-Bermúdez G., Rodríguez-Maciel J. Santillán-Ortega C., Lagunes-Tejeda A., Flores-Canales R., Cambero Campos J. 2012. Resistencia de cuatro poblaciones del ácaro (*Tetranychus urticae* Koch.) a propargite en rosa de corte (*Rosa x hybrida*) en el Estado de México, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3(4), 785-795.
- Rodríguez H., Montoya M., Pérez-Madruga., Ramos M. 2013. Reproducción masiva de ácaros depredadores Phytoseiidae: retos y perspectivas en cuba. *Revista de Protección Vegetal*. 28 (1): 12-22.
- Roggia S., Vanderei J., Roppa R., Nascimento G., Navia D., Delalibera I. 2009. Predatory mites and the fungus *Neozygites floridana* associated with the spider mites on soybean, in Rio Grande du Sul, Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 44(1):107-110.
- Schenkel M., Wievbke B., Mayer R., Bodanese M. 2012. Soybean genetic transformation: a valuable tool for the functional study of genes and the production of agronomically improved plants. *Genetics and Molecular Biology* 35: 998-1010.
- Scorsetti A., Lastra-López C. 2007. Primer registro del hongo *Neozygites sp.* (Zygomycota: Entomophthorales), patógeno de *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) en la

- república de Argentina. Boletín de la sociedad Argentina de Botánica Argentina. 42 (34):189-193.
- Sedaratian-Jahromi A., Fathipour Y., Moharramipour S. 2010. Comparative life table analysis of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) on 14 soybean genotypes. Insect Science. 18: 541 - 553.
- Smitley D., Kennedy G., Brooks W. Role of the entomogenous fungus, *Neozygites floridana*, in population declines of the twospotted spider mite, *Tetranychus urticae*, on field corn. Entomologia Experimentalis et Applicata. 41, 255–264.
- Stumpf N., Nauen R. 2001. Cross-resistance, inheritance, and biochemistry of mitochondrial electron transport inhibitor-acaricide resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: tetranychidae). Journal of Economic Entomology. 94: 577-583.
- Sun Jing-Tao., Lian C., Navajas M., Xiao-Yue H. 2012. Microsatellites reveal a strong subdivision of genetic structure in chinese populations of the mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). BMC Genetics. 13(8): 471-2156.
- Susilo F., Nordin G., Brown G. 1994. Age-specific and inter-sexual susceptibility of twospotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, to *Neozygites floridana* Weiser and Muma. Journal of the Kansas Entomological Society. 67 (3): 293-296.
- Takafuji A, So P., Tsuno N. 1991. Inter- and intra-population variation in diapause attribute of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, in Japan. Researches on Population Ecology. 33:331-344.
- Thiago C., Andrade R., Garcia C., Delalibera I., Klingen I. 2018. Prediction of sporulation and germination by the spider mite pathogenic fungus *Neozygites Floridana* (Neozygimycetes: Neozygiales: Neozygiteaceae) based on temperature, humidity and time. Insects. 9(2): 69.
- Toews D., Hofmeister N., Taylor S. The Evolution and genetics of carotenoid processing in animals. Trends in Genetics. 33:3.
- Trandem N., Bhattarai U., Westrum K., Knudsen G., Klingen I. 2015. Fatal attraction: male spider mites prefer females killed by the mite-pathogenic fungus *Neozygites floridana*. Journal of Invertebrate Pathology. 128 (1): 6-13.
- Tuttle D., Baker E., Abbatiello M. 1976. Spider mites of México (Acari: Tetranychidae). International Journal of Acarology 2:1-108.
- Ullah M., Moriya D., Badii M., Nachman G., Gotoh T. 2011. A comparative study of development and demographic parameters of *Tetranychus merganser* and *Tetranychus kanzawai* (Acari: Tetranychidae) at different temperatures. Experimental and Applied Acarology. 54 (1): 1-19.
- Van de Vrie M., McMurtry J., Huffaker C. 1972. Ecology of tetranychid mites and their natural enemies: a review. III. Biology, ecology, and pest status, and host-plant relations of tetranychids. Hilgardia. 41:343-432.

- Van Leeuwen T., Vontas J., Tsagkarakou A., Dermauw W., Tirry, L. 2010. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: a review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 40: 563-572
- Van Leewen T., Vohtas J., Tsagkarakou A., Tirry L. 2009. Mechanisms of acaricide resistance in two spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Biorational Control of Arthropod Pest*. Springer.
- Van Lenteren J., 2012. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *Biological Control*. 57: 1-20.
- Weiser J., Muma M. 1966. *Entomophthora floridana*. S. P. (Phycomycetes: Entomophthoraceae), a parasite of the Texas citrus mite, *Eutetranychus banksi*. *Florida Entomologist*. 49:155-159
- Wekesa V., Moraes G., Ortega E., Delalibera I. 2009. Effect of temperature on sporulation of *Neozygites floridana* isolates from different climates and their virulence against the tomato red spider mite, *Tetranychus evansi*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103(1): 36-42.
- Westrum K., Duarte V., Humber R., Delalibera, I., Klingen, I. 2014. Confirmation of *Neozygites floridana* azygospore formation in two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) in strains from tropical and temperate regions, *Journal of Invertebrate Pathology*.122:1-5.
- Xie L., Xie R., Zhang K., Hong X. 2008. Genetic relationship between the carmine spider mite *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) and the two-spotted mite *T. urticae* Koch in China based on the mtDNA COI and rDNA ITS2 sequences. *Zootaxa*. 1726:18-32.
- Xien L. Miao H. Xiao Y. 2006. The two-spotted mite *Tetranychus urticae* Koch and the carmine spider mite *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) in China mixed in their *Wolbochia* phylogenetic tree. *Zootaxa*. 1165:33-46.
- Zhang-Q Z. 2003. *Mites of greenhouse identification, Biology and Control*, CABI, Oxon, UK.