

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

VIRULENCIA DE HONGOS NATIVOS DEL ORDEN HYPOCREALES SOBRE  
*BEMISIA TABACI*, ESTUDIO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA EL  
DESARROLLO DE LOS HONGOS Y REGISTROS DE MOSCAS BLANCAS  
SILVESTRES PARA COSTA RICA.

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de  
Estudios de Posgrado en Biología para optar al grado y título de Maestría  
Académica en Biología

LAURA CAMPOS ESQUIVEL

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San José, Costa Rica

2020

## DEDICATORIA

*A mi madre, Cecilia Esquivel Oviedo*

*A mi padre, Mariano Campos López*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutor Paul Hanson, por su guía, sus enseñanzas y motivación para llevar a cabo y concluir mi proyecto.

A Priscila Chaverri, especialmente por permitirme ser parte de su equipo en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana, en el CIPRONA, esto fue fundamental para este proyecto. Fue una buena época y de mucho aprendizaje. Agradezco también a Rosaura Romero, quien era la directora del centro en ese momento.

A mi familia, por su apoyo económico y moral durante este proceso. No habría sido posible sin ustedes. Especialmente a Alberto Solano.

Agradezco a Efraín Escudero y a Andrea Orellana, por su valiosa colaboración y amistad.

A la Reserva Biológica Tirimbina, quienes fueron muy accesibles para realizar el muestreo. Especialmente a Juan Manuel Ley, que además me brindó mucha ayuda con la identificación de las plantas.

Gracias a Natalia Barboza, del CIBMC, quien me facilitó mis primeros adultos de *B. tabaci* para iniciar la cría. A Rebeca Mora y Griselda Arrieta por brindarme un espacio en los invernaderos. A Servicios de Laboratorio y a la sección de Micología Médica de la Facultad de Microbiología, por el aporte de materiales. Al Museo de Zoología y al Herbario de la Escuela de Biología, por darme acceso a cámaras y equipos. A Eddy Camacho por toda la ayuda logística. A Amanda Amador, por sus colectas.

A Luko Hilje y Julio Arias por sus correcciones y comentarios al escrito.

Finalmente, a los amigos del laboratorio 170 y a los del CIPRONA, gracias por su apoyo.

“Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Maestría Académica en Biología”



---

Keylor Rojas Jiménez  
**Representante del Decano  
Sistema de Estudios de Posgrado (SEP)**



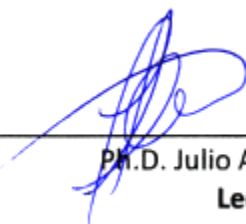
---

Ph.D. Paul Hanson Snortum  
**Director de Tesis**



---

Ph.D. Priscila Chaverri Echandi  
**Lectora**



---

Ph.D. Julio Arias Reverón  
**Lector**



---

Melissa Mardones Hidalgo  
**Representante del Director Posgrado en Biología**



---

Laura Campos Esquivel  
**Sustentante**

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
MIEMBROS DEL COMITÉ .....	iv
AUTORIZACIÓN PARA DIGITALIZACIÓN .....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	6
<b>CAPÍTULO I: Identificación de especies de hongos patógenos de las familias de insectos Aleyrodidae y Coccidae, como posibles patógenos de moscas blancas silvestres, en un bosque tropical húmedo de Costa Rica. ....</b>	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO II: Desarrollo de hongos entomopatógenos Hypocreales, posibles patógenos de moscas blancas silvestres (Aleyrodidae), bajo el efecto de la temperatura y de fungicidas comerciales, en condiciones de laboratorio.....</b>	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO III: Virulencia de hongos nativos Hypocreales sobre la mosca blanca <i>Bemisia tabaci</i> (Aleyrodidae), en condiciones de laboratorio.....</b>	<b>51</b>
<b>CAPÍTULO IV: Identificación de moscas blancas silvestres (Hemiptera: Aleyrodidae) y plantas hospederas asociadas, en el bosque tropical húmedo de la Reserva Biológica Tirimbina, Costa Rica.....</b>	<b>69</b>
CONCLUSIONES GENERALES.....	87
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	89



**Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.**

Yo, Laura Campos Esquivel, con cédula de identidad 114470192, en mi condición de autor del TFG titulado Virulencia de hongos nativos del orden Hypocreales sobre B. tabaci, estudio de las condiciones óptimas para el desarrollo de los hongos y registros de moscas blancas silvestres para Costa Rica.

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI  NO \*

\*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: \_\_\_\_\_ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

**INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:**

Nombre Completo: Laura Campos Esquivel.

Número de Carné: A81263 Número de cédula: 114470192

Correo Electrónico: laurace10@gmail.com.

Fecha: 24 de junio de 2020 Número de teléfono: 88896104

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Paul Hanson Snortum

Laura Campos E.

**FIRMA ESTUDIANTE**

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

## INTRODUCCIÓN

Las consecuencias perjudiciales del uso de insecticidas convencionales sobre los ecosistemas y la salud humana, así como el desarrollo de resistencia a dichos productos por parte de los insectos plaga han impulsado en los últimos años los estudios de microorganismos como alternativa para el control de estos insectos. Entre estos organismos, los hongos entomopatógenos han sido muy estudiados por su potencial como agentes de control biológico de insectos plaga en varios cultivos (Vega, Meyling, Luangsa-ard & Blackwell, 2012).

Se estima que existen más de 1000 especies de hongos entomopatógenos (Vega et al., 2012; Roy, Steinkraus, Eilenberg, Hajek & Pell, 2006), la mayoría pertenecientes al orden Entomophthorales (Zygomycota) y a la familia Clavicipitaceae (Hypocreales, Ascomycota) (Shah & Pel, 2003). La mayoría de especies de Hypocreales se encuentran en los trópicos y se conoce que causan epizootias de forma natural. Por ejemplo, se han reportado especies de Hypocreales que pertenecen a los géneros *Hypocrella s.l.* (fase asexual conocida como *Aschersonia*) como patógenos específicos sobre escamas (Coccidae) y moscas blancas (Aleyrodidae) (Hu et al. 2014; Chaverri, Liu & Hodge, 2008).

En general, los hongos entomopatógenos del orden Hypocreales son hemibiótrofos (Roy et al., 2006). Esta interacción entre el patógeno y su hospedante se inicia cuando las esporas infectantes entran en contacto de forma externa con la cutícula del insecto hospedante y se adhiere (Spatafora, Sung, Sung, Hywel-Jones, & White, 2007; Butt, Jackson & Magan, 2001). Posteriormente el hongo germina y prolifera de forma progresiva en estructuras multicelulares, produciendo hifas especializadas para penetrar la cutícula del insecto, a través de la presión ejercida por el apresorio y también por la liberación de enzimas que degradan los tejidos. Además, el hongo puede ingresar al hemocele del hospedante a través de orificios, como los espiráculos y la cavidad bucal (Vega et al., 2012).

Durante la infección, las hifas invaden el hemocele y aprovechan los recursos nutricionales del hospedero, induciendo anomalías fisiológicas, comportamientos

alterados y parálisis del insecto (Dar, Rather & Kandoo, 2017; Baverstock, Roy & Pell, 2009). Finalmente, el hospedante muere a causa de la combinación del daño físico de los tejidos, la deshidratación de las células por pérdida de fluido, y por los metabolitos secundarios de los hongos, algunos con actividad citotóxica (Evans, 1988; Roy et al., 2006). Cuando el insecto muere y si se dan las condiciones ambientales adecuadas, las hifas crecen nuevamente hacia el exterior del cuerpo del hospedante y ocurre la producción de nuevas esporas infectivas, los conidios, o, en algunos casos, esporas resistentes (Roy et al. 2010, Roy et al., 2006).

### **Generalidades sobre *B. tabaci***

La familia Aleyrodidae (Sternorrhyncha, Hemiptera) incluye insectos fitófagos conocidos comúnmente como moscas blancas. Se han descrito 1556 especies, alrededor de más de una docena de estas se han reportado como plagas agrícolas. Sin embargo, únicamente *Bemisia tabaci* (Gennadius) y *Trialeurodes vaporariorum* Westwood se reportan como las principales especies plaga de la familia Aleyrodidae, debido a que causan grandes pérdidas económicas, por los daños en cultivos a escala global (Rosset, Meneses, Lastra, & González, 1990; Hilje & Morales, 2008; Inbar & Gerling, 2008; De Barro, Liu, Boykin & Dinsdale, 2011). Ambas especies, *B. tabaci* y *T. vaporariorum*, son polífagas y flexibles al seleccionar sus plantas hospederas (Boykin, Bell, Evans, Small & De Barro, 2013).

El complejo de especies *Bemisia tabaci* se encuentra distribuido por todas las zonas tropicales y subtropical del planeta, especialmente en tierras bajas y de mediana altura en los trópicos (Hilje & Morales, 2008). En Costa Rica hay reportes de *B. tabaci* a más de 2000 m de altura, lo cual es inusual en la especie, pero muestra gran plasticidad y ha logrado ampliar su distribución en altitud y latitud (Hilje & Morales, 2008).

Los huevos, ninfas y adultos se encuentran en el envés de las hojas en sus plantas hospedantes, en donde se alimentan del floema (Inbar & Gerling, 2008). Algunos de los daños reportados en cultivos a causa de las moscas blancas, se debe a la melaza que excreta el insecto cuando se alimenta, ya que puede servir de sustrato para el crecimiento



de hongos saprófitos (“fumaginas” o “cenicillas” Capnodiales, Ascomycota) que cubren los tejidos fotosintéticamente activos (Buntin, Gilbertz & Oetting, 1993). Además, las ninfas *B. tabaci* MEAM1 (o biotipo B) presentan toxinas en su saliva que pueden causar daños fisiológicos a las plantas (Peng, Yan, Yang, De Barro, & Wan, 2013). Sin embargo, el daño más importante que causan las moscas blancas en cultivos se debe a la capacidad de las ninfas y adultos para transmitir virus (Gilbertson, Batuman, Webster & Adkins, 2015).

Se ha reportado que *B. tabaci* es vector de alrededor de 200 especies de virus, de los cuales los *Begomovirus* (Geminiviridae) son los de mayor frecuencia e importancia, en especial en zonas tropicales y subtropicales (Rosen et al., 2015; De Barro et al., 2011; Moriones & Navas-Castillo, 2000; Mehta, Wyman, Nakhla & Maxwell, 1994).

En el plano mundial, *B. tabaci* se ha observado en más de 540 especies de plantas de 74 familias, de las cuales para Latinoamérica se ha reportado en 14 familias: Apocynaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Caricaceae, Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Myrtaceae, Passifloraceae, Pedaliaceae, Solanaceae y Vitaceae (Hilje & Morales, 2008). Sin embargo, el ámbito completo de hospederos de esta plaga es desconocido. En sistemas agrícolas, se sabe que la mosca blanca ha causado el mayor daño económico en cultivos de tomate, frijol, melón, sandía, algodón y chile (Hilje & Morales, 2008).

### **Uso de hongos contra *B. tabaci***

Contra la mosca blanca se utilizaron insecticidas como método de control, entre ellos las mezclas de organofosforados y piretroides, que pronto comenzaron a ser menos efectivos debido a que la plaga desarrolló resistencia (Dângelo, Michereff-Filho, Campos, Da Silva & Guedes, 2017; Mascarín, Kobori, Dias-Quintela & Delalibera, 2013). Para 1987 *B. tabaci* había desarrollado resistencia a 16 plaguicidas distintos. En consecuencia, se aplicaron nuevos productos químicos, como neonicotinoides y reguladores del crecimiento del insecto, con la desventaja de poseer un alto costo económico y de correr el riesgo de un resurgimiento de la plaga después de la aplicación (Mascarín et al., 2013).

En cuanto a los enemigos naturales, se sabe que parasitoides como *Eretmocerus* y *Encarsia* (Aphelinidae) atacan a *B. tabaci* (Cave, 1996). Sin embargo, no han sido muy eficaces como método de control de poblaciones plaga en zonas agrícolas, debido a que se considera que la acción del parasitoide es lenta en comparación con la eficacia en la transmisión del virus, cuando la mosca blanca es vector (Hilje & Morales, 2008). Por otro lado, los depredadores de moscas blancas han sido aún menos estudiados que los parasitoides (Cave, 1996).

Con respecto a los hongos con mayor potencial para el control de *B. tabaci* se reportan varias especies de hongos Hypocreales, un grupo diverso de hongos que contiene varios géneros y especies entomopatógenos, incluyendo a *Hypocrella s.l.* (Mascarin et al., 2013, Chaverri & Vilchez, 2006). En un estudio donde se utilizaron cepas de *Beauveria* y *Paecilomyces* (ahora *Purpureocillium*), se encontró que ambos géneros son altamente virulentos contra la mosca blanca *B. tabaci* MEAM1 (Zafar, Freed, Khan & Farooq, 2016; Wraight et al., 1998). De hecho, en el mercado existen varios productos comerciales a base de estos hongos para combatir varias especies de moscas blancas (Faria & Wraight, 2001; Shannon, 1996). También la especie *Lecanicillium (=Verticillium) lecanii* se ha utilizado con éxito para el control de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* en cultivos de invernadero de Europa, por lo que se desarrolló una formulación comercial bajo el nombre de Mycotal (Koppert BV, Holanda), que además presenta cierta actividad contra *B. tabaci* (Shannon, 1996).

La asociación del género *Hypocrella s.l.* (sinónimo *Aschersonia s.l.*) con escamas y moscas blancas fue reportada por Webber (1897), al reconocer que *Moelleriella libera* (Syd. & P. Syd.) P. Chaverri & M. Liu (= *Aschersonia aleyrodis*) es un importante agente de control de la mosca blanca de los cítricos, *Dialeurodes citri* (Ashmead). Consecuentemente, esta especie de hongo fue utilizada por primera vez en Florida, Estados Unidos, para el control de la mosca blanca en los cítricos (Berger, 1921). Posteriormente, el uso de estos hongos en control biológico decayó, cuando se empezó a dudar de su eficacia y cuando se popularizaron los insecticidas sintéticos (Evans & Hywel-Jones, 1990), pero nuevamente resurgió su importancia en los años 70 (Meekes, Fransen

& Van Lenteren 2002). Desde entonces se ha reconocido el potencial de *Hypocrella s. l.* como potencial agente en control biológico (Chaverri et al., 2008).

*Hypocrella s.l.* se ha utilizado para el control de mosca blanca en invernaderos en Europa y en Canadá (Mascarin et al., 2013). En un estudio donde se utilizó *Aschersonia* para el control de *Bemisia argentifolii* y *Trialeurodes vaporariorum*, se reportó alta esporulación en medios artificiales y altas tasas de infección en ambas especies de moscas blancas (Meekes et al., 2002). En otros estudios se ha encontrado que los hongos *Hypocrella s.l.* spp. tienen mayor eficacia si se aplica con alta humedad y bajo sombra (Nicholls, 2008) y en el caso de *M. libera* resultó efectivo contra ninfas recién emergidas de huevos expuestos al hongo (Mascarin et al., 2013).

Se ha observado que los requerimientos de plaguicidas podrían reducirse cuando se complementa con la aplicación de hongos entomopatógenos, ya que favorece el control de la plaga y se disminuye la cantidad de insecticida que se aplica, minimizando el riesgo de contaminación ambiental y el desarrollo de resistencia por parte del insecto (Quintela & McCoy, 1998). Sin embargo, el efecto de los insecticidas sobre la germinación y viabilidad de los conidios de los hongos es un aspecto importante que se debe evaluar para establecer los programas, que involucran el control químico y el biológico, ya que en algunos hongos se ha reportado que puede afectar su desarrollo (Neves, Hirose, Tchujo & Moino, 2001).

Contra *B. tabaci* también se ha propuesto como estrategia el manejo integrado de plagas, en donde se complementan diferentes métodos, incluyendo también el control químico. Algunas de estos métodos son: campañas de prevención, uso de coberturas vivas, repelentes químicos, cultivo de plantas resistentes al virus, entre otros y la combinación de estas acciones (Amador & Hilje, 1993; Cubillo & Hilje, 1996; Hilje, 2002; Hilje, 2003; Hilje, 2008).

## OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 2.1. Objetivo general

Estudiar el potencial de algunas especies y cepas de hongos entomopatógenos nativos y específicos, del género *Hypocrella s.l.* (y otros géneros relacionados), como posibles agentes de control biológico contra *B. tabaci*.

### 2.2. Objetivos específicos:

- Identificar las especies de hongos entomopatógenos de las familias Aleyrodidae y Coccidae, como posibles patógenos de moscas blancas silvestres, en un bosque tropical húmedo de Costa Rica.
- Evaluar el desarrollo de los hongos entomopatógenos Hypocreales, bajo el efecto de la temperatura y de fungicidas comerciales, en condiciones de laboratorio.
- Calcular la virulencia de los hongos nativos Hypocreales sobre *Bemisia tabaci*, en condiciones de laboratorio.
- Identificar moscas blancas silvestres y plantas hospederas asociadas, al menor nivel taxonómico posible, en el bosque tropical húmedo de la Reserva Biológica Tirimbina, Costa Rica.

### 2.3. Hipótesis:

En la naturaleza las especies de *Hypocrella s.l.* causan epizootias, se esperaría encontrar entonces, que al menos algunos de estos hongos, que se encuentren parasitando cualquier especie de mosca blanca (Aleyrodidae) en el campo, parasiten también *B. tabaci* y muestren una alta virulencia en el laboratorio. Se esperarían también diferencias en cuanto al desarrollo de los diferentes hongos en el laboratorio, las especies tienen diferentes requerimientos. Se esperaría que la presencia de fungicidas afecte el desarrollo de los hongos. Finalmente, al ser Aleyrodidae un grupo poco estudiado en América, a excepción de especies plaga, se espera encontrar nuevos registros de especies silvestres para Costa Rica y para nuevas familias de plantas.

## **CAPÍTULO I: Identificación de especies de hongos patógenos de las familias de insectos Aleyrodidae y Coccidae, como posibles patógenos de moscas blancas silvestres, en un bosque tropical húmedo de Costa Rica.**

Resumen: Los hongos Hypocreales son hongos entomopatógenos con potencial en control biológico de insectos plaga. El objetivo de este estudio fue identificar especies de hongos patógenos que parasitan insectos de la familia Aleyrodidae o Coccidae en un bosque tropical húmedo de Costa Rica, como potenciales entomopatógenos de moscas blancas silvestres. Dieciséis hongos fueron cultivados exitosamente en el laboratorio e identificados utilizando una clave morfológica y técnicas moleculares. El uso en combinación de caracteres morfológicos y moleculares, así como la escogencia de la región amplificadora 28S del ADN ribosomal nuclear, mejoró la identificación de los hongos a nivel de especie. Esta investigación permitió obtener aislamientos de hongos para pruebas posteriores de virulencia contra *Bemisia tabaci*.

**Palabras clave:** Hypocreales, *Hypocrella*, *Moelleriella*, *Aschersonia*, LSU, ITS.

Los hongos son organismos ampliamente reconocidos por su importancia como enemigos naturales de invertebrados, entre muchos otros aspectos (Hajek & Meyling, 2018; Vega, Meyling, Luangsa-ard, & Blackwell, 2012; Baverstock, Roy & Pell, 2009; Klingen & Haukeland, 2006; Inglis et al., 2001; Carruthers & Soper, 1987). El interés por estudiar estas interacciones entre los hongos e insectos surgió desde hace muchos años, por lo que existen una gran cantidad de estudios sobre el tema. Estas investigaciones surgieron especialmente enfocadas en patógenos que ocasionan daños a insectos de interés comercial o industrial (como el caso muy conocido del gusano de seda) o cuando se desea controlar insectos considerados plagas, porque compiten por recursos con los humanos o son vectores de enfermedades (Hajek & Meyling, 2018).

Se estima que existen alrededor de 1000 especies de hongos entomopatógenos distribuidas en más de 100 géneros (Vega et al., 2012). La mayoría de estas especies de

entomopatógenos pertenecen al orden Entomophthorales (Entomophthoromycota) y a las familias Clavicipitaceae, Cordycipitaceae y Ophiocordycipitaceae; del orden Hypocreales (Filo Ascomycota, clase Sordariomycetes) (Shah & Pell, 2003).

Los hongos clasificados dentro de Hypocreales se caracterizan por formar peritecios que se encuentran inmersos en o sobre un estroma. Estos peritecios pueden ser solitarios o agrupados y el estroma suele ser de colores llamativos (anaranjado, amarillo, rojo o verde, rara vez son de color negro) o blanquecinos (Rogerson, 1970).

La mayoría de especies de este orden se encuentran en los trópicos y se conoce que, algunas de las especies entomopatógenas, causan epizootias de forma natural. Por ejemplo, se han reportado especies del género *Hypocrella s.l.* (= *Aschersonia*) como patógenos específicos sobre escamas (Coccidae) y moscas blancas (Aleyrodidae) (Chaverri, Liu & Hodge, 2008).

Las moscas blancas y las escamas son insectos que se alimentan del floema de las plantas a través de un aparato bucal modificado en forma de estilete. Algunas especies de estos insectos son consideradas plaga en el plano mundial, especialmente porque durante su alimentación son vectores de muchos tipos de virus de plantas (Rosen et al., 2015, Jiménez et al. 2019), que pueden causar grandes daños a los cultivos y por ende generar grandes pérdidas económicas. Por ejemplo, la mosca blanca *Bemisia tabaci* Gennadius es vector de virus, la mayoría del género *Begomovirus* que causan amarillamiento y enrollamiento de la hoja de tomate (TYLCV) (Barboza, Blanco-Meneses, Hallwass, Moriones & Inoue-Nagata, 2014; Moriones & Navas-Castillo, 2000; Mehta, Wyman, Nakhla & Maxwell, 1994).

Entre las alternativas para control de un insecto de la magnitud de la mosca blanca *B. tabaci*, que ya es resistente a muchos insecticidas químicos (Dângelo, Michereff-Filho, Campos, Da Silva & Guedes, 2018), se han utilizado hongos como método de control alternativo o como parte de un conjunto de técnicas de control. Entre estos hongos destacan varias especies de Hypocreales como *Cordyceps fumosorosea* Wize, *Moelleriella*

*libera* (Syd. & P. Syd.) P. Chaverri & M. Liu y *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Zhang, Ali, Musa, Wang & Qiu, 2017; Zafar, Freed, Khan & Farooq, 2016)

Los avances en biología molecular desde finales de la década de los noventa han permitido esclarecer las relaciones filogenéticas entre los hongos Hypocreales (Rossman & Seifert. 2011, Rossman 1996). Por ejemplo, muchas especies de hongos entomopatógenos, incluidos algunos Hypocreales como *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin y *Akanthomyces lecanii* (Zimm.) Spatafora, Kepler & B. Shrestha, han sido ampliamente aceptados como un complejo de especies, por lo que su identificación depende de la recaudación de información molecular, morfológica, patobiológica, entre otras (Rehner & Buckley, 2003; Humber, 1997).

El objetivo del presente estudio fue identificar, utilizando la combinación de caracteres morfológicos (de hongos frescos y en cultivo) y moleculares, especies de hongos patógenos que parasitan insectos de la familia Aleyrodidae o Coccidae en un bosque tropical húmedo de Costa Rica, como potenciales entomopatógenos de moscas blancas silvestres y promisorios para posteriores investigaciones sobre el control biológico de *B. tabaci*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitio de muestreo

Las giras de recolección de los hongos se realizaron el 11 de mayo, 25 y 26 de noviembre de 2017 y del 02 al 03 de junio del 2018. Se llevó a cabo en la Reserva Biológica Tirimbina (RBT), en la Virgen de Sarapiquí (10°43'88.9" 84°09'14.12"), provincia de Heredia, Costa Rica. Dicha reserva se localiza en las tierras bajas de la vertiente del Caribe, en el noreste del país. La RBT se encuentra a una elevación aproximada de 187 m y comprende 395 hectáreas protegidas donde predomina el bosque húmedo tropical (Holdridge, 1979). La precipitación anual varía de los 3500 y 4000 mm, siendo la época más lluviosa los meses de octubre a enero y de mayo a agosto. Además, la humedad relativa es de 80-90% y la temperatura varía entre los 20 y 30°C (INDER, 2014).

### **Muestreo y aislamiento de los hongos entomopatógenos**

Se revisaron arbustos y árboles que se encontraban justo al borde y a unos metros sobre el camino de los diferentes senderos del bosque y en los jardines de la reserva. Se recorrieron los senderos Ceiba, Cacaotal, Canopy, Corteza y jardín, dedicando aproximadamente tres horas de búsqueda dentro de cada sendero. Para ubicar insectos infectados con hongos, se revisaron hojas entre los 20 y 250 cm de altura sobre el suelo utilizando una lupa de campo con luz, con lentes de aumento de 10 y 20X. Las plantas hospederas fueron identificadas a especie y en algunos casos hasta género o familia.

Los hongos frescos fueron llevados al Laboratorio de Biotecnología Microbiana, en el Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA), de la Universidad de Costa Rica. Utilizando un estereoscopio Motic Serie SMZ-140, se registraron datos sobre la morfología macroscópica de los hongos, tales como color, forma, densidad de micelio, distribución de las masas de esporas, color de la masa de esporas, entre otras. Se tomaron muestras de las masas de esporas y se observaron a en el microscopio Olympus BX40, a 100X de magnificación, con agua destilada, KOH al 10% o azul de algodón.

Con una cámara digital para microscopio Omax 18.0 mp se fotografiaron las esporas y utilizando el programa Top View<sup>®</sup>, se midió el largo y ancho de al menos 40 esporas, para obtener un promedio de medidas y el índice largo/ancho (l/w). Estas medidas se tomaron con el fin de identificar las especies utilizando las claves de Chaverri et al. (2008). Las medidas de las esporas se graficaron utilizando el software estadístico InfoStat/L (InfoStat, 2017).

Otra parte de la masa de esporas de los hongos recolectados, se cultivó en placas Petri estériles de 60x15 mm, en aproximadamente 10 ml de medio Difco<sup>™</sup> papa-dextrosa-agar (PDA), con sulfato de gentamicina al 0,03%. A las 24 horas de haber cultivado los hongos, estos fueron purificados al tomar del cultivo inicial, la mínima cantidad posible de esporas germinadas, observando bajo el estereoscopio. Estas esporas germinadas se cultivaron en nuevas placas Petri con PDA. Para algunas especies, debido a la aparición de contaminantes en el medio, este proceso se repitió una o dos veces más. Esos hongos se



dejaron crecer en condiciones de temperatura y humedad ambiental, dentro del laboratorio (aproximadamente entre los 21 y 26°C).

A las dos o tres semanas de crecido el micelio del hongo en PDA, en condiciones estériles, se cortaron discos de 8 mm de diámetro del borde del micelio. Los discos de micelio fueron preservados en 1 ml de agua destilada estéril (ADE) en crioviales (Nalgene-Thermo Fisher Scientific). De esta forma los hongos fueron preservados para mantener los genotipos originales. Los hongos recolectados en las giras en estado inmaduro no fueron cultivados.

### **Extracción de ADN, PCR y secuenciación**

Para la identificación molecular de las diferentes especies de hongos, de los cultivos purificados en medio PDA (con las características mencionadas anteriormente), de 2-3 semanas, se tomó una masa de micelio de ~5 mm de diámetro para llevar a cabo la extracción de ADN. Se utilizó el kit de extracción PrepMan Ultra (Applied Biosystems, Norwalk). Se secuenciaron ~800 pares de bases de la región 28S (Vilgalys & Sun, 1994) y ~600 de la región ITS (Espaciador Interno Transcrito) del ARN ribosomal nuclear (White et al., 1990). La información sobre los cebadores se muestra en el Cuadro I.

Las reacciones de PCR fueron de 25  $\mu$ L, cuya mezcla consistió de 12,5  $\mu$ L de Go Taq® Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, Wisconsin), 1  $\mu$ L del cebador 5'-3', 1  $\mu$ L del cebador reverso (3'-5'), 1  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO), 0,5  $\mu$ L de suero albúmina bovino (BSA), 6  $\mu$ L de agua destilada Ultra Clear™ y 3  $\mu$ L del ADN molde (Abreu et al., 2014). Las condiciones de PCR utilizadas para ITS fueron basadas en Gazis & Chaverri (2010); mientras que para la región LSU 28S se siguió el protocolo de Kepler et al. (2013).

Finalmente, los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1% para comprobar la amplificación de los fragmentos y posteriormente fueron enviados a Macrogen Inc. (EEUU). Las secuencias resultantes fueron editadas y alineadas utilizando el Cluster Computacional Kabré (Montero et al., en prep.) y para identificar las especies, se

realizó un análisis BLAST utilizando las bases de datos de NCBI para ITS y la base de UNITE (Abarenkov et al., 2010) para 28S.

## RESULTADOS

Se muestrearon al menos 38 especies de plantas, de 18 familias distintas, en los senderos recorridos de la RBT. De los hongos recolectados en el campo, 16 fueron cultivados exitosamente. Estos fueron preservados e identificados tanto molecular como morfológicamente. La información del sendero, fecha y planta donde fueron encontrados estos hongos se muestra en el Cuadro II. Además de los 16 aislamientos obtenidos, se registraron al menos 6 especies de hongos más que fueron identificadas con material fresco utilizando la clave taxonómica (Cuadro III). También 12 especies más que no pudieron ser identificadas fueron incluidas en el Cuadro III, ya que se conocía la información de la planta hospedera. Los hongos en estadio inmaduro que fueron recolectados se descartaron.

Cabe mencionar que, durante octubre del 2017, se hizo un intento por cultivar hongos provenientes de la Reserva Alberto Manuel Brenes (RAMB), en San Ramón de Alajuela, Costa Rica. Sin embargo, en la época que se llevó a cabo el aislamiento de estos hongos, en el laboratorio se presentaban problemas por la presencia de ácaros y probablemente el uso de acaricidas para eliminar esta plaga inhibió el crecimiento de los hongos, que recién habían sido cultivados en PDA. A pesar de varios intentos, ninguno de ellos creció en el medio PDA, a excepción del hongo con el código 24\_3A (Cuadro IV; Fig.6)

De los hongos aislados, se midieron en promedio 33 esporas por hongo (mínimo 15, máximo 46). Los resultados del largo, el ancho y el índice l/w se muestran en las Figuras 1, 2 y 3 respectivamente. Por medio de estas medidas de los conidios, entre otras características, se lograron identificar todas las especies de *Moelleriella* (Cuadro VI; Fig. 6), que posteriormente fueron corroboradas con la identificación molecular (Cuadro IV). Además, con la clave se identificaron las especies de hongos del Cuadro III. Sin embargo, para algunas especies, como las del género *Hypocrella* (Cuadro VI; Fig. 5), las esporas eran

más largas y delgadas de lo que se reportaba en la clave, por lo que fue necesario el uso de las herramientas moleculares para identificar estas especies.

En cuanto a la caracterización molecular de los aislamientos, las secuencias con una identidad del 98-100%, fueron consideradas de la misma especie que la secuencia de mayor coincidencia de puntaje en las bases de datos publicadas. Por lo que la mayoría de hongos se identificaron a nivel de especie. Los resultados de la región 28S parecen dar mejor información (Cuadro IV), al dar porcentajes de identidad mucho más altos (todos más del 90%) que ITS (Cuadro V). Además, estos resultados coinciden más con las características morfológicas, información de la clave dicotómica, reportes sobre su biología y biogeografía de las especies, que los resultados de ITS. La excepción fue el aislamiento L11H1 (Cuadro V), el cual obtuvo una mayor coincidencia con secuencias ITS. Únicamente dos aislamientos presentaron porcentajes entre 95 y 98%, por lo que fueron identificados hasta género, *Aciculosporium* y *Balansia* (Cuadro IV).

Los nombres aceptados de las especies y la clasificación taxonómica actual de los hongos aislados se muestran en el Cuadro VI. Los 16 aislamientos corresponden a 12 especies distintas, distribuidas en siete géneros. Ocho de esas especies pertenecen a los géneros *Aschersonia* (Fig.4), *Hypocrella* (Fig.5) y *Moelleriella* (Fig. 6); mientras que hay cuatro especies, de los géneros: *Aciculosporium* y *Balansia* (Fig. 4), y *Microcera* y *Verticillium* (Fig.7), este último no pertenece al orden Hypocreales.

## DISCUSION

De todos los hongos hallados durante el muestreo se obtuvo 16 aislamientos, estos hongos crecieron exitosamente en medio de cultivo PDA en condiciones de laboratorio. Se reporta que la mayoría de los hongos entomopatógenos del orden Hypocreales presentan principalmente estrategias de vida facultativas (Vega et al., 2012), esto brinda cierta ventaja al facilitar su cultivo en medios artificiales. Desde el punto de vista del control biológico, esta característica debe ser tomada en cuenta, ya que puede implicar que el costo del desarrollo de los hongos en el laboratorio sea menor que para una especie

obligatoria, ya que esta requiere de condiciones muy particulares para su crecimiento (Hajek & Meyling 2018).

Por otro lado, muchos de los hongos recolectados, también Hypocreales, no crecieron exitosamente en el laboratorio. Probablemente se deba a que no todas las especies de hongos presentan los mismos requerimientos para su desarrollo o producción de esporas. Aunque los estudios de dichos requerimientos son escasos, se ha indicado variabilidad en las condiciones de cultivo en diferentes especies de Hypocreales (Borisade & Magan, 2014).

Las especies de la RAMB que no crecieron en cultivos, adicionalmente pudieron haber sido inhibidas probablemente por un acaricida aplicado durante el mantenimiento del laboratorio. Solo un aislamiento de RAMB sobrevivió, el cual fue incluido en esta investigación (Cuadro II). Debido a que la RAMB también presenta un clima muy húmedo, similar a la RBT, es también un sitio interesante para la búsqueda de hongos entomopatógenos Hypocreales. Además, esta zona ha sido menos investigada en búsqueda de estos hongos que Sarapiquí. En cuanto a este grupo Chaverri & Vilchez (2006) investigaron su diversidad en diferentes estados de sucesión de bosque, en la estación biológica La Selva, Sarapiquí. De modo que esta región es una de las mejor conocidas en su diversidad de Hypocreales en comparación con otras regiones de Costa Rica (Chaverri & Vilchez 2006).

A veces los caracteres morfológicos tradicionalmente utilizados en la identificación de hongos pueden ser ambiguos y causar dificultades en la utilización de las claves de identificación (Hajek & Meyling, 2018). Por ejemplo, en los resultados obtenidos se observó esto en caracteres como el tamaño de las esporas y color del estroma en las especies del género *Hypocrella*. En estos casos, aunque los caracteres morfológicos aporten mucha información, la biología molecular solventa la identificación con mayor especificidad. Además, las características de los cultivos pueden variar según la influencia del ambiente (Fernandes, Costa, Moraes, Zahner & Bittencourt, 2006). Por esto, el uso de

herramientas moleculares fue importante para la identificación de las especies que no forman parte de la clave utilizada.

En cuanto a la caracterización molecular de los hongos, con el locus 28S y la base de datos UNITE se obtuvieron mejores resultados que al identificarlos utilizando ITS y la base del NCBI, excepto para *M. diploa*. Esta diferencia puede deberse a que se secuenció un mayor número de pares de bases para 28S, y por lo tanto se obtuvo una mayor resolución de las especies. Además, estos resultados con 28S coinciden más con los resultados de las identificaciones morfológicas, la información de la clave, biología y biogeografía de las especies, que los resultados con ITS. Es importante resaltar que la base UNITE presenta referencias de mejor calidad, ya que las secuencias que están asociadas están bien documentadas y han sido curadas por taxónomos especialistas de los diversos grupos de hongos (Avarenkov et al. 2010). Sin embargo, el número de secuencias de 28S en esta base aún es modesto, aun así, se sugiere ser utilizada cuando no se obtienen buenas asociaciones con ITS a niveles taxonómicos superiores (Silva-Hughes et al., 2015; Avarenkov et al. 2010).

ITS es propuesto como un marcador universal para hongos (Schoch et al. 2012). Sin embargo, se ha encontrado que para *Metarhizium* y *Beauveria* esta región puede dar insuficiente resolución para identificar especies (Bischoff, Rehner & Humber, 2009; Rehner & Buckley, 2005). Esto coincide con los resultados obtenidos para las especies encontradas en la RBT del presente estudio. Por ejemplo, para *Metarhizium*, se reportan buenos resultados utilizando el factor de elongación de la traducción 5´TEF (Kepler, Humber, Bischoff & Rehner, 2014; Bischoff et al., 2009). De hecho, TEF se considera un marcador útil para Ascomycota en general (Stielow et al., 2015). En el caso de *Beauveria*, las especies pueden ser identificadas al secuenciar la región intergénica Bloc (Rehner et al., 2011). Esto quiere decir, que es importante secuenciar otros loci para obtener mejor resolución.

La similitud entre secuencias se muestra a través de los porcentajes de identidad, con este valor se puede concluir si las secuencias (por determinar y la de la base de datos) son o no homólogas y, por ende, si comparten una historia evolutiva. Los porcentajes

bajos de identidad obtenidos con ITS muestran poca coincidencia con las secuencias de las bases de datos, por lo que no se puede asegurar la identificación de las especies. Sin embargo, un alto grado de similitud, como el que se presentó con 28S implica una alta probabilidad de homología entre las secuencias. Por esto, más del 98% de similitud se considera que da suficiente confianza para caracterizar un aislamiento a nivel de especie, mientras que entre 90-98% podría indicar similitud a nivel de género, pero no especies. Las identidades más bajas al 65%, no son útiles en la identificación de los aislamientos.

En cuanto a la biología de las especies encontradas, es conocido que *Hypocrella* y *Moelleriella* son patógenos de moscas blancas e insectos escamas (Chaverri et al., 2008). La especificidad del insecto y el hongo ha sido muy poco estudiada en este grupo, debido a los daños causados por el hongo. En cuanto a *Verticillium* sp., a pesar de no ser un Hypocreales, se sabe que especies como *V. pseudohemipterigenum* son patógenos de hemípteros de la familia Cicadellidae (Hywell-Jones et al., 1997), mientras que *M. diploa* se reporta como patógeno de insectos, especialmente escamas (Gräfenhan, Schroers, Nirenberg & Seifert, 2011; Rossman, 1983; Booth, 1971).

La identificación del hospedero es una tarea que se dificulta cuando el hongo ya ha invadido y se ha desarrollado sobre este. Por esto, a pesar del interés de la investigación inicialmente era identificar hongos que crecieran sobre moscas blancas, no podemos descartar que algún hongo de los recolectados estuviera creciendo más bien en una escama. Aunque este haya sido el caso, de todos modos, los aislamientos obtenidos en la presente investigación, fueron posteriormente evaluados en pruebas de virulencia contra *B. tabaci*.

En conclusión, existen varias especies de Hypocreales entomopatógenos en la RBT, susceptibles de ser cultivados y utilizadas en investigaciones como posibles biocontroladores. El uso en combinación de caracteres morfológicos y moleculares, en especial la región amplificadora 28S y la base UNITE, mejoró la identificación de los hongos a nivel de especie. Por eso se sugiere que es muy importante hacer uso de la combinación de todas las herramientas posibles para identificar las especies. Es importante realizar análisis filogenéticos con secuencias adicionales para estudiar la

posición taxonómica de las especies y además corroborar que no se trate de especies nuevas para la ciencia.

Cuadro I. Información de los cebadores utilizados para PCR en el presente estudio.

<b>Loci</b>	<b>Cebador</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Referencia</b>
28S	LRORf	ACCCGCTGAACTTAAGC	Vilgalys & Sun, 1994
28S	LR5	TCCTGAGGGAAACTTCG	Vilgalys & Sun, 1994
ITS	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. 1990
ITS	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White et al. 1990

Cuadro II. Información de recolecta de los hongos que fueron cultivados en el laboratorio, preservados, secuenciados y utilizados en pruebas posteriores de virulencia.

CÓDIGO DE MUESTRA	SITIO DE COLECTA	FECHA DE COLECTA	FECHA PRESERVA	PLANTA HOSPEDERA
6_1	Sendero Ceiba, Tirimbina	11 de mayo de 2017	17 de mayo de 2017, pero 18 de octubre de 2017 (preservado al 3er re-cultivo), 23 de febrero y 27 de agosto de 2018	<i>Protium pittieri</i> (Burseraceae)
24_3 <sup>a</sup>	RAMB, San Ramón	29 y 30 setiembre y 01 de octubre de 2017	11 de octubre de 2017, 23 de febrero de 2018	<i>Calypstrogyne</i> sp. (Arecaceae)
L1H1	Sendero Ceiba, Tirimbina	02 de junio de 2018	27 de agosto de 2018	<i>Psychotria buchtienii</i> . (Rubiaceae)
L1H2	Sendero Ceiba, Tirimbina	02 de junio de 2018	27 de agosto de 2018	<i>P. buchtienii</i> . (Rubiaceae)
L6H1	Sendero Ceiba, Tirimbina	02 de junio de 2018	27 de agosto de 2018	<i>Leretia cordata</i> (Icacinaceae)
L7H1	Sendero Ceiba, Tirimbina	03 de junio de 2018	27 de agosto de 2018	<i>Miconia variabilis</i> (Melastomataceae)
L11H1	Sendero Corozal, Canopy y hacia Cacaotal	03 de junio de 2018	27 de agosto de 2018	<i>Socratea</i> sp. (Arecaceae)
L11H2	Sendero Corozal, Canopy y hacia Cacaotal	03 de junio de 2018	27 de agosto de 2018	<i>Socratea</i> sp. (Arecaceae)
L13H1	Sendero Corozal, Canopy y hacia Cacaotal	03 de junio de 2018	27 de agosto de 2018	<i>Anaxagorea crassipetala</i> (Annonaceae)
P17H20	Sendero Ceiba, Tirimbina	25 de noviembre de 2017	06 de marzo y 27 de agosto de 2018	<i>A. crassipetala</i> (Annonaceae)
P19h18	Sendero Ceiba, Tirimbina	25 de noviembre de 2017	23 de febrero, 22 de mayo y 27 de agosto de 2018	<i>Brosimum guianense</i> (Moraceae)
P26h43	Jardines, Tirimbina	26 de noviembre de 2017	06 de marzo de 2018, 22 de mayo y 27 de agosto de 2018	<i>Odontonema cuspidatum</i> (Acanthaceae)
P34h51	Jardines, Tirimbina	26 de noviembre de 2017	16 de enero y 27 de agosto de 2018	<i>Urera baccifera</i> (Urticaceae)
M1H1	Sendero Corozal, Canopy y hacia Cacaotal	26 de noviembre de 2017	16 de enero y 27 de agosto de 2018	<i>Psychotria</i> sp2. (Rubiaceae)
M2H2	Sendero Corozal, Canopy y hacia Cacaotal	26 de noviembre de 2017	16 de enero y 27 de agosto de 2018	<i>Piper</i> sp. (Piperaceae)
M3H3	Sendero Corozal, Canopy y hacia Cacaotal	26 de noviembre de 2017	16 de enero y 27 de agosto de 2018	<i>Psychotria</i> sp2. (Rubiaceae)



Cuadro III. Información de los hongos que fueron recolectados, sin embargo, en cultivo en el laboratorio no se desarrollaron exitosamente o se contaminaron. Por lo tanto, no fueron preservados, secuenciados ni utilizados en pruebas posteriores.

Código de la muestra	Sitio de colecta	Fecha de colecta	Fecha de cultivo (no preservados)	Especie del hongo	Planta hospedera
4_1	Sendero Ceiba, Tirimbina	11 de mayo de 2017	17 de mayo de 2017	<i>Moelleriella libera</i>	<i>Cespedesia macrophylla</i> (Ochnaceae)
P2H30	Sendero Ceiba, Tirimbina	25 de noviembre de 2017	16 de enero de 2018	NA	<i>Protium pittieri</i> (Burseraceae)
P3H29	Sendero Ceiba, Tirimbina	25 de noviembre de 2017	23 de enero de 2018	<i>Moelleriella sloanea</i>	Moraceae
P8H26	Sendero Ceiba, Tirimbina	25 de noviembre de 2017	23 de enero de 2018	<i>Moelleriella ochracea</i>	<i>Asterogyne martiana</i> (Arecaceae)
P11H23	Sendero Ceiba, Tirimbina	25 de noviembre de 2017	16 de enero de 2018	NA	<i>Leretia cordata</i> (Icacinaeae)
P11H24	Sendero Ceiba, Tirimbina	25 de noviembre de 2017	16 de enero de 2018	NA	<i>Leretia cordata</i> (Icacinaeae)
P11H25	Sendero Ceiba, Tirimbina	25 de noviembre de 2017	16 de enero de 2018	<i>Moelleriella libera</i>	<i>Leretia cordata</i> (Icacinaeae)
P17H19	Sendero Ceiba, Tirimbina	25 de noviembre de 2017	30 de enero de 2018	NA	<i>Anaxagorea crassipetala</i> (Annonaceae)
P18H21	Sendero Ceiba, Tirimbina	25 de noviembre de 2017	16 de enero de 2018	NA	<i>Adelobotrys adscendens</i> (Melastomataceae)
P24H3	Sendero Ceiba, Tirimbina	25 de noviembre de 2017	16 de enero de 2018	NA	<i>Cespedesia macrophylla</i> (Ochnaceae)
P27H42	Jardines, Tirimbina	26 de noviembre de 2017	23 de enero de 2018	<i>Moelleriella turbinata</i>	<i>Sanchezia parvibracteata</i> (Acanthaceae)
P28H35	Jardines, Tirimbina	26 de noviembre de 2017	16 de enero de 2018	NA	<i>Piper</i> sp2. (Piperaceae)
P31H45	Jardines, Tirimbina	26 de noviembre de 2017	17 de enero de 2018	<i>Hypocrella disciformis</i>	<i>Piper</i> sp3. (Piperaceae)
P35H32	Jardines, Tirimbina	26 de noviembre de 2017	16 de enero de 2018	NA	<i>Eugenia</i> sp. (Myrtaceae)
L3H1	Sendero Ceiba, Tirimbina	02 de junio de 2018	06 de junio de 2018	NA	<i>Heliconia</i> sp. (Heliconiaceae)
L4H1	Sendero Ceiba, Tirimbina	02 de junio de 2018	14 de junio de 2018	NA	Rubiaceae

L11H3	Sendero Corozal, Canopy y hacia Cacaotal	03 de junio de 2018	06 de junio de 2018	NA	<i>Socratea</i> sp. (Arecaceae)
L14H1	Sendero Corozal, Canopy y hacia Cacaotal	03 de junio de 2018	06 de junio de 2018	NA	<i>Salpichlaena volubilis</i> (Blechnaceae)

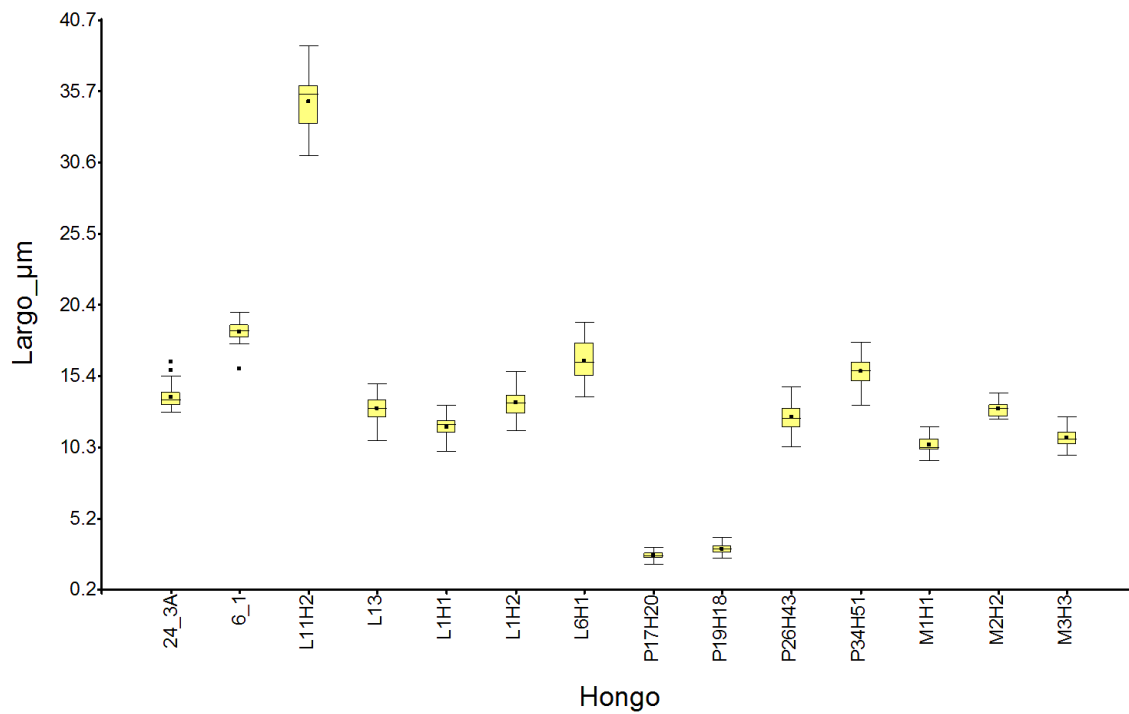


Figura 1. Largo de los conidios ( $\mu\text{m}$ ) de los diferentes hongos entomopatógenos aislados.

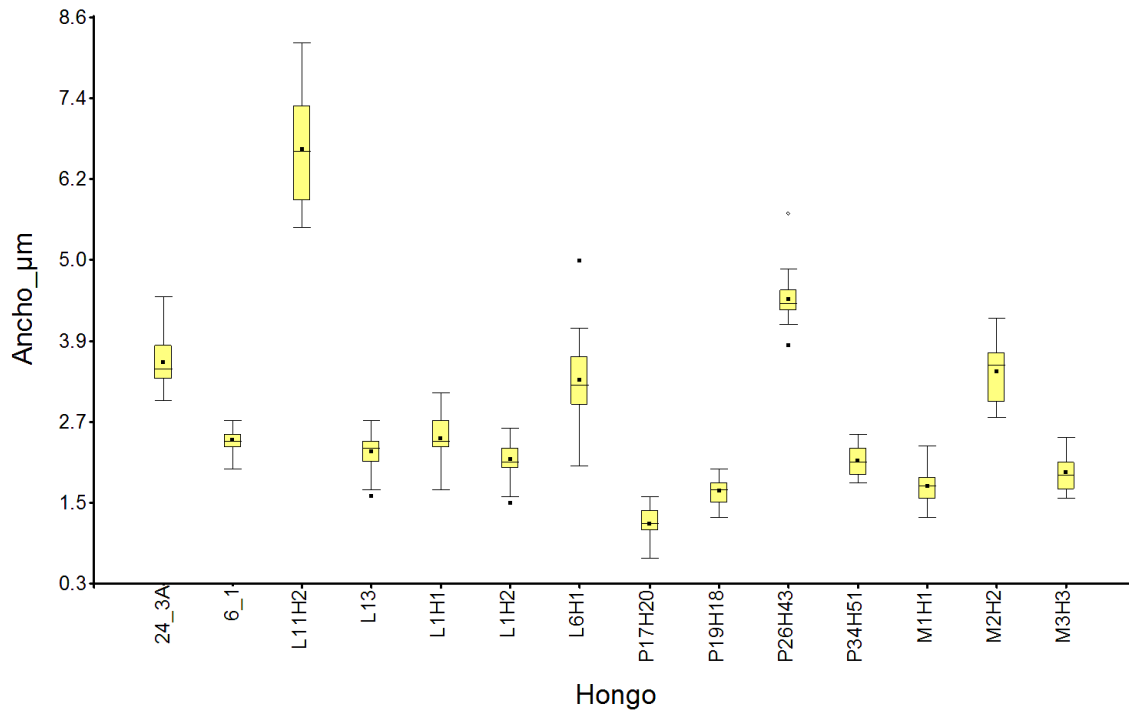


Fig. 2. Ancho de los conidios ( $\mu\text{m}$ ) de los diferentes hongos entomopatógenos aislados.

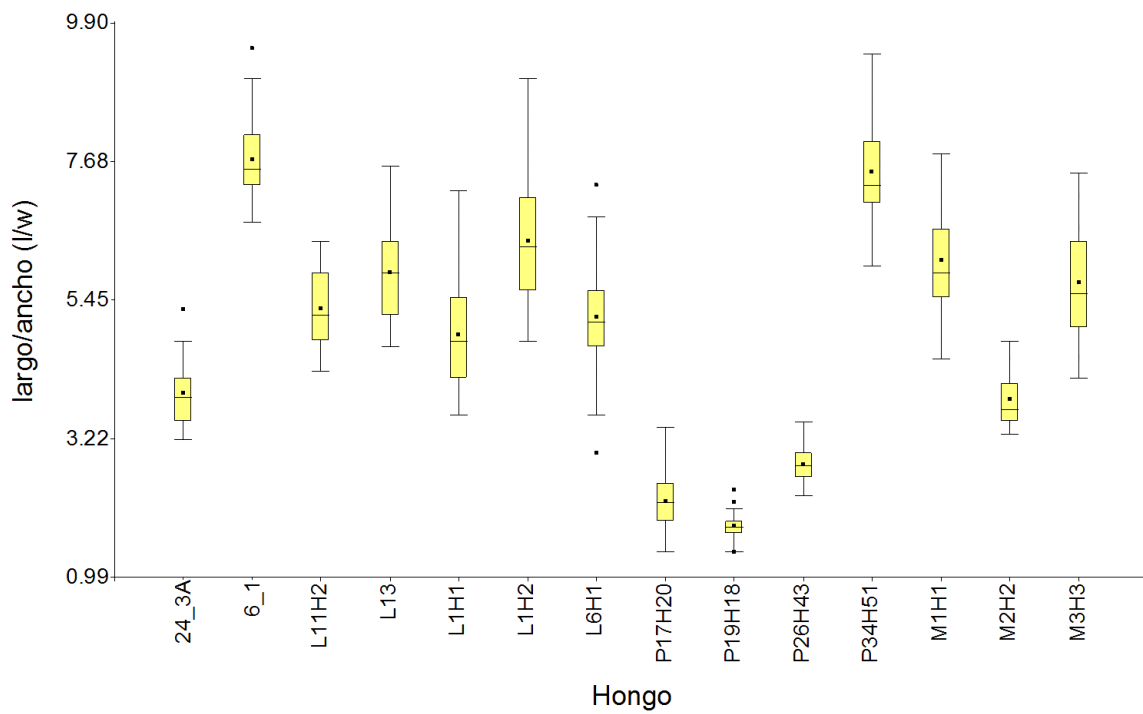


Fig. 3. Forma de conidios de los diferentes hongos entomopatógenos aislados.

Cuadro IV. Resultados de los análisis de BLASTn de las secuencias 28S. Para cada aislamiento se reportan los resultados de las tres secuencias más similares.

Aislamiento	Acceso	Especie	Identidad	Covertura
24_3A	EU392608	<b><i>Moelleriella phyllogena</i></b>	<b>98.5%</b>	94.82%
	AY986902	<i>Moelleriella basicystis</i>	98.3%	94.14%
	AY986903	<i>Moelleriella basicystis</i>	97.0%	94.71%
6_1	EU392566	<b><i>Hypocrella disciformis</i></b>	<b>99.9%</b>	95.24%
	EU392565	<i>Hypocrella disciformis</i>	99.9%	95.02%
	EU392564	<i>Hypocrella disciformis</i>	99.9%	94.91%
L11H1	MH872202	<i>Corallomycetella repens</i>	97.1%	99.43%
	MH866649	<i>Nectria rubropeziza</i>	97.0%	99.43%
	HQ232160	<i>Nalanthamala diospyri</i>	96.9%	99.43%
L13H1	EU392589	<b><i>Moelleriella libera</i></b>	<b>99.6%</b>	98.03%
	EU718240	<i>Moelleriella</i> sp.	99.4%	99.65%
	EU718242	<i>Moelleriella</i> sp.	99.3%	99.65%
L1H1	EU392587	<b><i>Moelleriella libera</i></b>	<b>99.4%</b>	100.00%
	EU392589	<i>Moelleriella libera</i>	99.4%	100.00%
	EU392592	<i>Moelleriella libera</i>	99.4%	100.00%
L1H2	EU392566	<b><i>Hypocrella disciformis</i></b>	<b>99.9%</b>	94.71%
	EU392565	<i>Hypocrella disciformis</i>	99.9%	94.49%
	DQ384945	<i>Hypocrella discoidea</i>	98.2%	99.12%
L6H1	DQ384941	<b><i>Hypocrella cf. badia</i></b>	<b>98.1%</b>	99.02%
	DQ384948	<i>Hypocrella cf. badia</i>	98.0%	99.02%
	DQ384945	<i>Hypocrella discoidea</i>	97.9%	99.13%
L7H1	EU392566	<b><i>Hypocrella disciformis</i></b>	<b>100.0%</b>	94.19%
	DQ384940	<i>Hypocrella discoidea</i>	98.1%	99.23%
	DQ384945	<i>Hypocrella discoidea</i>	98.0%	99.67%
P17H20_2	MK691594	<b><i>Aciculosporium take</i></b>	<b>95.6%</b>	99.89%
	AB925959	<i>Polycephalomyces formosus</i>	95.4%	99.89%
	AB925962	<i>Polycephalomyces formosus</i>	95.3%	99.89%
P19H18	AY327046	<b><i>Balansia brunnans</i></b>	<b>96.4%</b>	98.77%
	U57679	<i>Balansia strangulans</i>	96.2%	99.55%
	AY489715	<i>Balansia henningsiana</i>	96.1%	99.55%
P26H43	DQ070101	<b><i>Moelleriella turbinata</i></b>	<b>100.0%</b>	94.58%
	DQ070134	<i>Moelleriella turbinata</i>	100.0%	93.92%
	DQ070082	<i>Moelleriella turbinata</i>	99.9%	94.58%
P34H51	AY932753	<b><i>Hypocrella viridans</i></b>	<b>99.9%</b>	<b>95.96%</b>
	EU392564	<i>Hypocrella disciformis</i>	99.9%	95.85%
	EU392565	<i>Hypocrella disciformis</i>	99.9%	95.85%

Cuadro V. Resultados de los análisis de BLASTn de las secuencias ITS. Para cada aislamiento se reportan los resultados de las tres secuencias más similares.

Aislamiento	Acceso	Especie	Identidad	Covertura
24_3A	EU039882.1	<i>Elaphocordyceps japonica</i>	69%	85.48%
	KC775776.1	Ascomycota sp.	69%	85.61%
	AB027366.1	<i>Elaphocordyceps japonica</i>	69%	85.21%
6_1	EU409582.1	<i>Hypocrella calendulina</i>	99%	83.36%
	EU409580.1	<i>Hypocrella calendulina</i>	99%	83.41%
	DQ365834.1	<i>Hypocrella calendulina</i>	99%	83.39%
L11H1	HQ897817.1	<i>Microcera diploa</i>	100%	92.11%
	HQ446044.1	Uncultured fungus clone	100%	89.65%
	EU860076.1	<i>Fusarium</i> sp.	100%	89.52%
L11H2	AJ292403.1	<i>Verticillium pseudohemipterigenum</i>	76%	91.43%
	MH862779.1	<i>Verticillium pseudohemipterigenum</i>	73%	89.40%
	LC435735.1	<i>Metarhizium aciculare</i>	62%	89.70%
L13	MH863367.1	<i>Epichloe pampeana</i>	97%	89.12%
	MH861158.1	<i>Verticillium cylindrosporum</i>	96%	88.50%
	MH861157.1	<i>Verticillium cylindrosporum</i>	96%	88.50%
L1H1	EF190280.1	<i>Aschersonia hypocreoidea</i>	97%	99.31%
	LC489989.1	<i>Hypocrella raciborskii</i>	97%	97.25%
	DQ365845.1	<i>Aschersonia placenta</i>	97%	97.08%
L1H2	DQ365844.1	<i>Hypocrella discoidea</i>	63%	85.27%
	DQ365833.1	<i>Hypocrella discoidea</i>	63%	85.27%
	DQ365832.1	<i>Hypocrella discoidea</i>	63%	85.27%
L6H1	JQ863218.1	<i>Hortaea werneckii</i>	55%	94.23%
	KX427195.1	<i>Hortaea werneckii</i>	55%	93.96%
	KX427193.1	<i>Hortaea werneckii</i>	55%	93.96%
L7H1	EU409582.1	<i>Hypocrella calendulina</i>	98%	81.40%
	DQ365834.1	<i>Hypocrella calendulina</i>	98%	81.40%
	EU409580.1	<i>Hypocrella calendulina</i>	98%	81.40%
P19H18	MK028526.1	<i>Verticillium</i> sp.	76%	91.03%
	KU291096.1	<i>Cladobotryum cubitense</i>	98%	85.60%
	EU076967.1	Soil fungal sp.	77%	90.82%
P26H43	EF190281.1	<i>Moelleriella turbinata</i>	63%	84.33%
	EF190283.1	<i>Moelleriella turbinata</i>	63%	84.11%
	EF190270.1	<i>Moelleriella turbinata</i>	63%	83.92%
P34H51	DQ365834.1	<i>Hypocrella calendulina</i>	98%	81.25%
	EU409580.1	<i>Hypocrella calendulina</i>	98%	81.25%
	EU409582.1	<i>Hypocrella calendulina</i>	97%	81.07%
M1H1	JN049841	<i>Aschersonia confluens</i>	97%	97,70%
	DQR65848	<i>Moelleriella molli</i>	97%	100,00%
	EF190279	<i>Aschersonia hypocreoidea</i>	93%	100,00%

M2H2	EF190283	<i>Aschersonia basicystis</i>	78%	100,00%
		<i>Eucaspphaeria</i> sp.	84%	66,00%
		<i>Metapochonia suchlasporia</i>	84%	67,33%
M3H3	DQ365848	<i>Moelleriella molli</i>	94,3%	100,00%
	EF190279	<i>Aschersonia hypocreoidea</i>	93,7%	100,00%
	JN049841	<i>Aschersonia confluens</i>	97,4%	96,66%

Cuadro VI. Clasificación taxonómica actual de las especies aisladas.

Subclase	Orden	Familia	Género	Especie	
Hypocreomycetidae	Hypocreales	Clavicipitaceae	<i>Aciculosporium</i> I. Miyake	<i>Aciculosporium</i> sp.	
			<i>Balansia</i> Speg.	<i>Balansia</i> sp.	
			<i>Hypocrella</i>	<i>Hypocrella</i> c.f. <i>badia</i> Pat.	
				<i>H. disciformis</i> P. Chaverri & K.T. Hodge.	
				<i>H. viridans</i> (Berk. & M.A. Curtis) Petch.	
			<i>Moelleriella</i>	<i>M. basicystis</i> P. Chaverri & K.T. Hodge.	
				<i>M. libera</i> (Syd. & P. Syd.) P. Chaverri & M. Liu.	
				<i>M. ochracea</i> (Masse) M. Liu & P. Chaverri 2008	
				<i>M. phyllogena</i> (Mont.) P. Chaverri & K.T. Hodge.	
				<i>M. turbinata</i> (Berk.) Seaver.	
				<i>M. diploa</i> (Berk. & M.A. Curtis) Gräfenhan & Seifert, in Gräfenhan, Schroers, Nirenberg & Seifert.	
				<i>Verticillium</i> Nees	<i>Verticillium</i> sp.
				Glomerellales	Plectosphaerellaceae

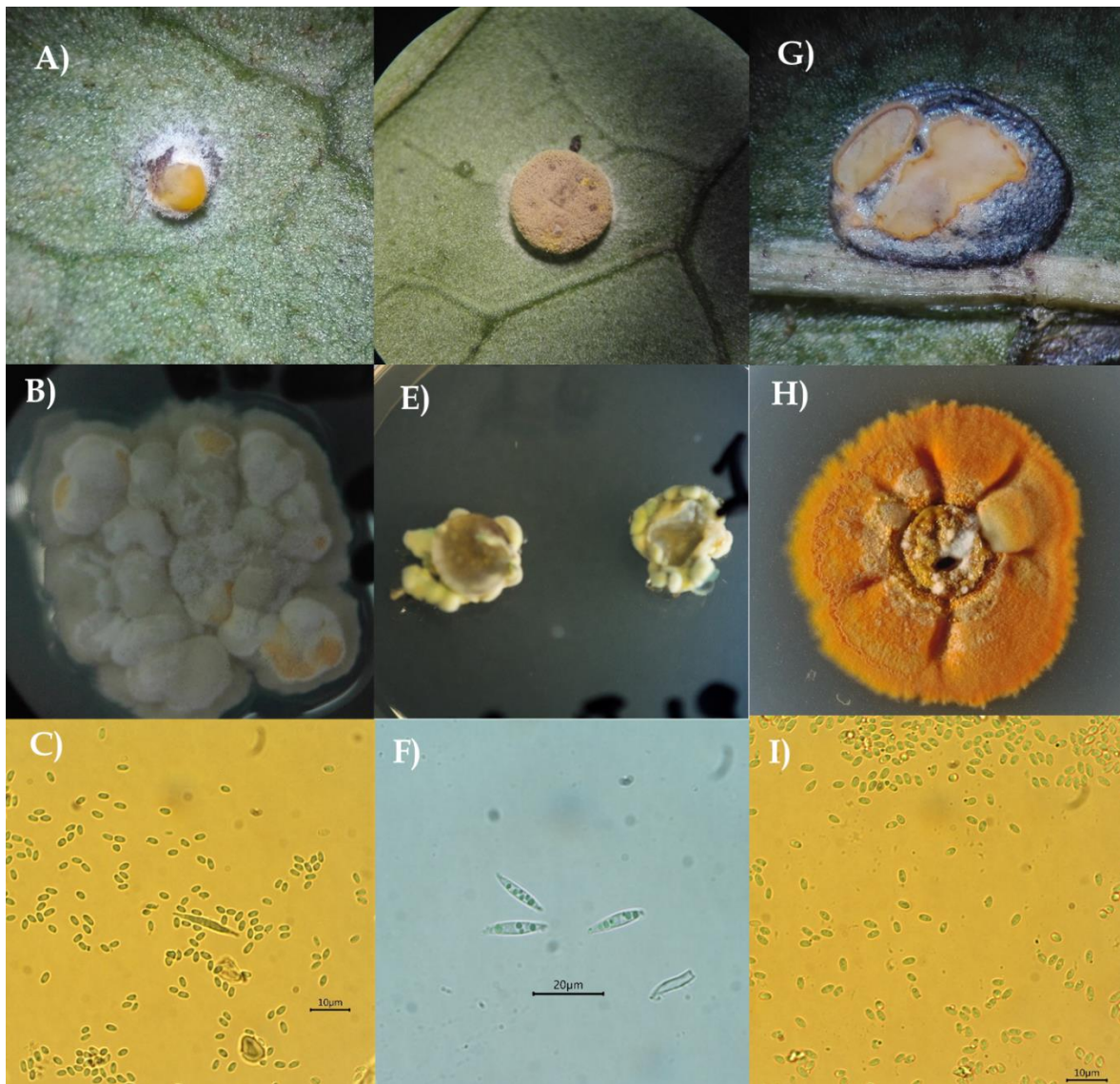


Fig. 4. Hongo sobre insecto visto bajo el estereoscopio (A, D y G), cultivos de 1-3 semanas en medio PDA (B, E y H) y esporas al microscopio (C, F, I) de *Aciculosporium* sp. (A-C), *Hypocrella* cf. *badia* (D-F) y *Balansia* sp. (G-I).



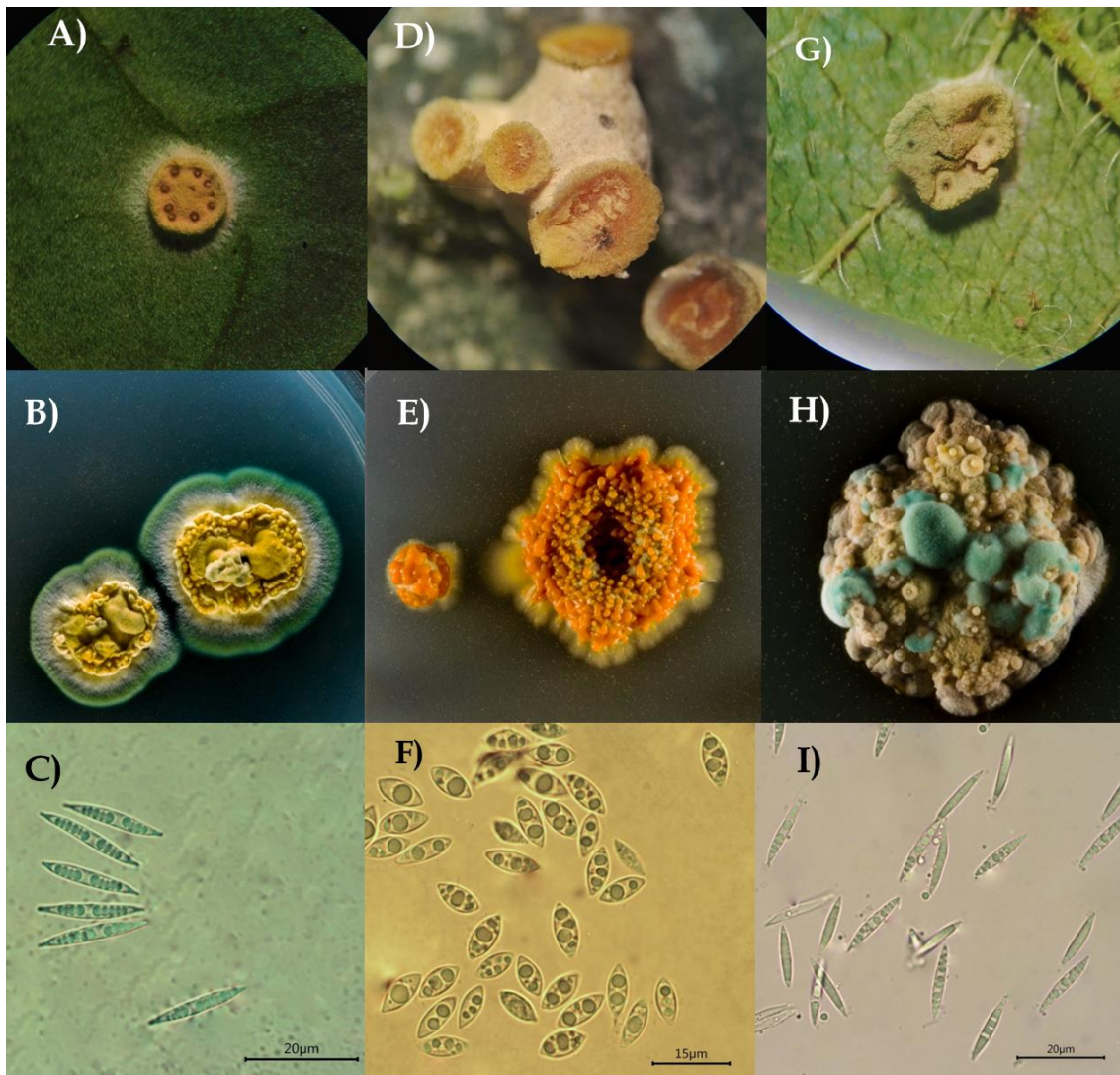


Fig. 5. Hongo sobre insecto visto bajo el estereoscopio (A, D y G), cultivos de 3-4 semanas en medio PDA (B, E y H) y esporas al microscopio (C, F, I) de *H. disciformis* (A-C), *M. turbinata* (D-F) e *H. viridans* (G-I).



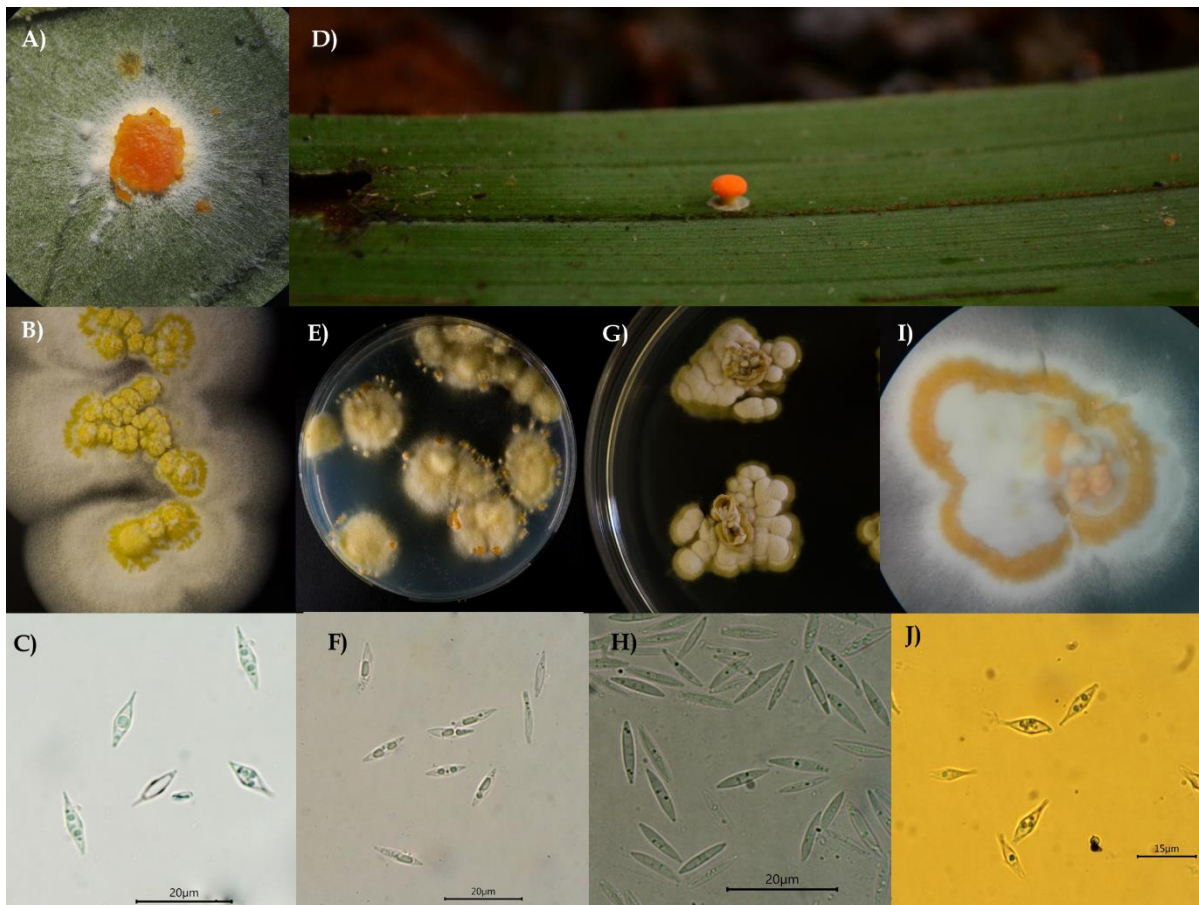


Fig. 6. Hongo sobre insecto (D), visto bajo el estereoscopio (A), cultivos de 3-4 semanas en medio PDA (B, E, G e I) y esporas al microscopio (C, F, H y J) de *M. basicystis* (B y C), *M. libera* (A, E-F), *M. ochracea* (G-H) y *M. phyllogena* (D, I-J).

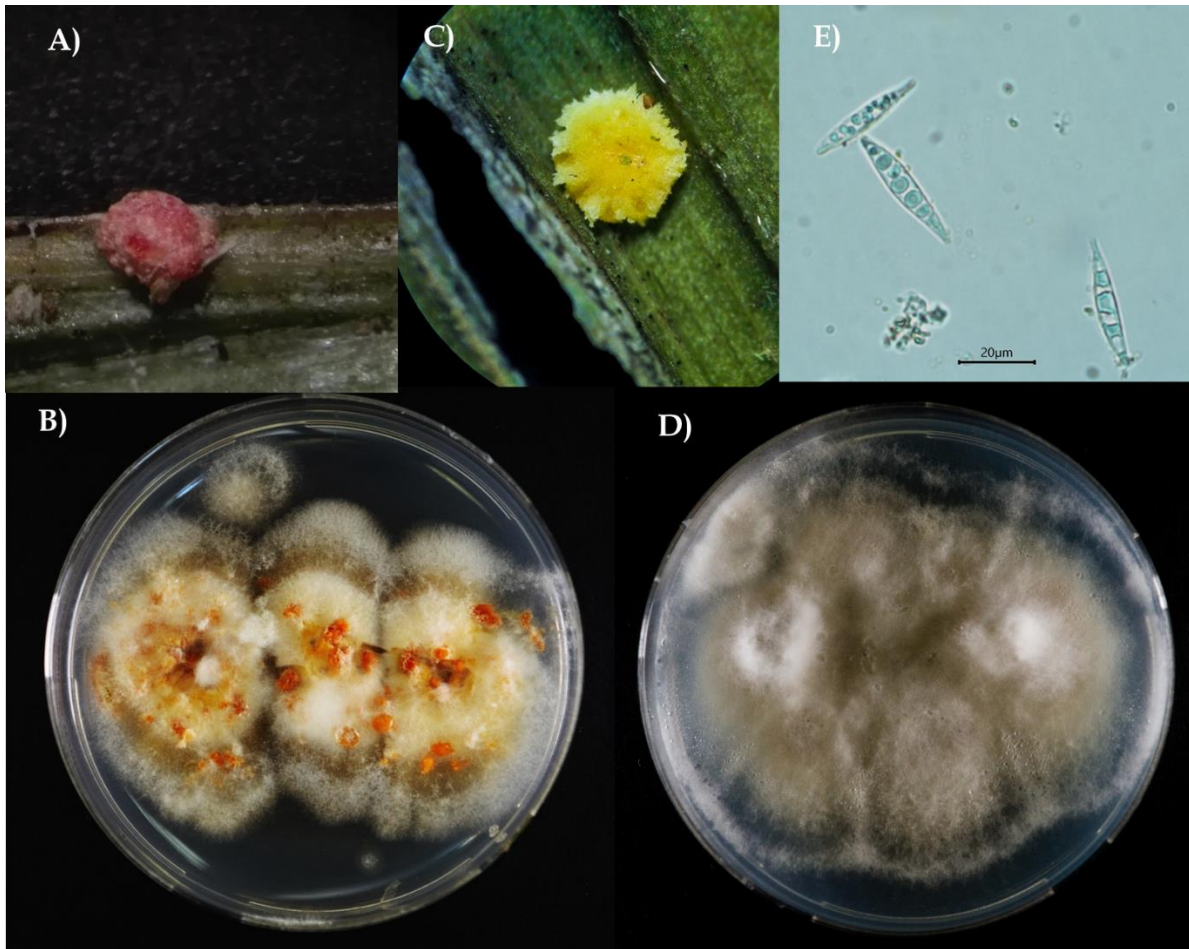


Fig. 7. Hongo sobre insecto visto bajo el estereoscopio (A y C), cultivos de 3-4 semanas en medio PDA (B y D) y esporas al microscopio (E) de *M. diploa* (A y B) y *Verticillium* sp. (C-E).

## **CAPÍTULO II: Desarrollo de hongos entomopatógenos Hypocreales, posibles patógenos de moscas blancas silvestres (Aleyrodidae), bajo el efecto de la temperatura y de fungicidas comerciales, en condiciones de laboratorio.**

Resumen: Especies entomopatógenas de Hypocreales son utilizados en control biológico ya que son fáciles de crecer en el laboratorio y de producir en masa. Esto se sabe gracias a los numerosos estudios con especies comerciales. Sin embargo, para especies silvestres, que causan epizootias sobre Coccidae y Aleyrodidae, los estudios sobre desarrollo en condiciones de laboratorio son muy escasos. Además, el éxito de los hongos como biocontroladores también depende de la compatibilidad con otros métodos de control. Por ejemplo, el uso de fungicidas podría afectar el uso de hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga. Se compararon tasas de crecimiento y porcentajes de germinación de esporas de hongos Hypocreales, bajo diferentes temperaturas de incubación, y el efecto de dos fungicidas comerciales, para doce especies de hongos entomopatógenos nativos, que parasitaban moscas blancas o escamas cuando fueron recolectados en el campo. *Moelleriella libera*, *Aciculosporium* sp. y *Verticillium* sp. mostraron las mayores tasas de crecimiento y frecuencias de germinación de todos los hongos evaluados, en todas las temperaturas. La temperatura óptima de crecimiento depende de la especie de hongo, pero a 23°C y 25 °C fue mayor la probabilidad de germinación para la mayoría de aislamientos. Con respecto al uso de los fungicidas, se encontró que, a las concentraciones recomendadas por los fabricantes, ambos fungicidas afectaron el crecimiento de la gran mayoría de los hongos. Además, ambos fungicidas inhibieron la germinación de las esporas a las 24 y 48 horas de exposición. En este estudio se demuestra el efecto de la temperatura y vulnerabilidad de algunos hongos entomopatógenos nativos a la exposición a fungicidas. Estos hongos son patógenos de moscas blancas y escamas, por lo tanto, tienen potencial como biocontroladores. Los resultados del presente estudio brindan información sobre especies y condiciones de temperatura óptimas para el desarrollo en el laboratorio y susceptibilidad a fungicidas, que podrían contribuir al planteamiento de futuras estrategias de control biológico.

**Palabras clave:** *Aschersonia*, *Hypocrella*, *Moelleriella*, azoxistrobina, clorotalonil, tasa de crecimiento de hongos, germinación de esporas.

Hace algunas décadas, el uso de insecticidas químicos en el control de plagas y vectores de enfermedades causó una gran revolución en la agricultura y salud humana en todo el mundo. Sin embargo, debido a los conocimientos sobre el impacto negativo del uso de los insecticidas sobre el ambiente y la salud (Ansari et al., 2014) y la resistencia a dichos productos por parte de los insectos plaga (Mascarin et al., 2013), surgió la búsqueda de

alternativas a los químicos, con el fin de disminuir estos efectos nocivos. En consecuencia, se aumentó el interés en investigar hongos entomopatógenos por su gran potencial como alternativa al uso de dichos insecticidas (Vega et al., 2012; Meeke, 2001).

Existen alrededor de 129 productos comerciales a base de hongos, con el fin de controlar diversas plagas de artrópodos (Faria & Wraight, 2007). La mayoría de estos son a base de *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin y *Akanthomyces lecanii* (Zimm.) Spatafora, Kepler & B. Shrestha. Para estas especies existen muchos estudios acerca de las condiciones y requerimientos para su cultivo en el laboratorio, viabilidad de las esporas y cría masiva (Tumuhaise et al., 2018; Dale & Shinde 2017; Jaronski & Mascarin, 2017; Faria et al., 2015; Mascarin et al., 2015; Jaronski, 2014; Sahayaraj & Karthick Raja-Namasivayam, 2008; Ibrahim et al., 2002; Dorta et al., 1996; Ibrahim & Low, 1993), debido a su importancia comercial. Sin embargo, existen especies con potencial en control biológico, que han sido muy poco estudiadas en estos aspectos. Por ejemplo, los géneros *Moelleriella* e *Hypocrella* causan epizootias naturalmente en insectos Aleyrodidae y Coccidae (Hu et al., 2014; Chaverri et al., 2008). No obstante, estas son especies donde los estudios sobre virulencia y desarrollo en condiciones de laboratorio son muy escasos.

En general, los Hypocreales son fáciles de crecer y de producir en masa, por lo que se recomiendan, pero no exclusivamente, en control biológico de tipo inundativo (Jaronski, 2010). Gracias a los estudios de las especies comerciales, especialmente *B. bassiana* y *M. anisoplie*, es que se conocen algunos factores que son esenciales para el desarrollo de hongos entomopatógenos en condiciones del campo (Jaronski, 2010) y de laboratorio. En este último caso, la selección del medio de crecimiento adecuado para la nutrición del hongo, la humedad, la luz y la temperatura son factores importantes a considerar (Rangel et al., 2015; Jaronski, 2010). Como se reporta en varios estudios, estos factores pueden tener un efecto en el crecimiento y la germinación de esporas de los hongos (Tumuhaise et al., 2018; Ibrahim et al., 1993).

El éxito de los hongos como agentes de control biológico también depende mucho de la interacción y compatibilidad con otras estrategias de control. Por ejemplo, el uso de fungicidas para controlar enfermedades de los cultivos podría afectar el uso de hongos entomopatógenos para el control de una población de insectos plaga. Por esta razón, se debe conocer la tolerancia de los hongos entomopatógenos a plaguicidas antes de ser utilizados, especialmente en cultivos donde se aplica o se han aplicado estos productos (Pelizza et al., 2018; Neves et al., 2001; Todorova et al., 1998; Clark et al., 1982).

Hay varios estudios donde se reporta el efecto de diferentes fungicidas en el crecimiento radial de las especies y en la esporulación de los aislamientos de hongos, de nuevo principalmente en *B. bassiana* y *M. anisoplie*. Sin embargo, son más escasos los estudios donde se reporta el efecto de los fungicidas en la germinación de las esporas (Rachappa et al., 2007). Esto a pesar de que la inhibición de la germinación podría prevenir la infección del hospedero (Shah et al., 2009), afectando la efectividad del hongo como controlador de una plaga.

El objetivo del presente estudio fue comparar las tasas de crecimiento vegetativo y el porcentaje de germinación de esporas de doce aislamientos de hongos nativos entomopatógenos, a diferentes temperaturas, dentro del rango de crecimiento reportado para otros hongos entomopatógenos. Además, se evaluó el efecto de dos fungicidas comerciales, también sobre el crecimiento del micelio y la germinación de esporas de dichos hongos, en condiciones de laboratorio. Estos hongos son posibles patógenos de moscas blancas y escamas, por lo tanto, tienen potencial como biocontroladores. Los resultados del presente estudio contribuirían al desarrollo de mejores estrategias para la cría de los hongos, al brindar conocimiento sobre especies y condiciones de temperatura óptimas para el desarrollo en el laboratorio y susceptibilidad a fungicidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Procedencia y preservación de los hongos**

Los hongos utilizados en estas pruebas son provenientes de la Reserva Biológica Tirimbina (RBT), en la Virgen de Sarapiquí (10°43'88.9" 84°09'14.12"), provincia de Heredia, Costa Rica. Estos hongos fueron recolectados el 11 de mayo, 25 y 26 de noviembre de 2017 y del 02 al 03 de junio del 2018, de los senderos Ceiba, Cacaotal, Canopy, Corteza y jardín en la RBT. Los hongos frescos fueron llevados al Laboratorio de Biotecnología Microbiana, en el Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA), de la Universidad de Costa Rica, en donde fueron aislados e identificados. Para la identificación de los hongos, se utilizaron de forma complementaria, las claves taxonómicas de Chaverri et al. (2008) y la secuenciación de las regiones del espaciador transcrito interno (ITS) y 28S del ARN ribosomal nuclear (Cuadro I).

Las esporas de los hongos traídos del campo, se cultivaron en placas Petri estériles de 60x15 mm, en aproximadamente 10 ml de medio Difco™ papa-dextrosa-agar (PDA), con sulfato de gentamicina al 0,03%. A las 24 horas, estos fueron purificados y después de dos o tres semanas de crecimiento en condiciones de temperatura ambiente del laboratorio (controlada entre los 21 y 25°C), se cortaron discos de 7,5 mm de diámetro del borde del micelio. Los discos se preservaron en 1 ml de agua destilada estéril (ADE) en crioviales (Nalgene-Thermo Fisher Scientific) hasta ser utilizados en las pruebas.

### **Pruebas sobre el crecimiento del micelio**

Para las pruebas, se cultivaron los hongos en placas Petri estériles de 60x15 mm, en 10 ml de medio PDA, con sulfato de gentamicina al 0,03%, a temperatura ambiente del laboratorio. Aproximadamente a las dos semanas de haberse cultivado, se realizaron cortes de discos del margen del micelio de 7,5 mm de diámetro. Cada disco se colocó sobre medio PDA en el centro de la placa Petri, de manera que el micelio estaba en contacto con el medio y la placa se selló con Parafilm®. Las placas fueron expuestas a los diferentes tratamientos, estos fueron diferentes temperaturas o exposición a diferentes

fungicidas. En este último caso, el fungicida fue incorporado en el medio de cultivo PDA en donde se puso a crecer el disco de micelio.

*Crecimiento vegetativo de los hongos y efecto de la temperatura.* Las placas con discos de micelio sobre PDA se mantuvieron en una incubadora marca Hotech modelo 624, en condiciones de oscuridad, a la temperatura por evaluar. Dichas temperaturas fueron: 23, 25 y 27 ( $\pm 0,15^{\circ}\text{C}$ ). Se evaluó una temperatura a la vez, debido a que sólo se contaba con una incubadora. Se colocó un disco de micelio por placa, con cinco réplicas para cada uno de los 12 aislamientos evaluados, por cada temperatura.

*Efecto de fungicidas en el crecimiento de los hongos.* Para evaluar el efecto de los fungicidas azoxystrobina y clorotalonil (Cuadro II) en el desarrollo del micelio, se utilizó el mismo método de discos que en la evaluación del efecto de la temperatura. Pero, en este caso, la temperatura de incubación fue constante (a  $25^{\circ}\text{C}$  en oscuridad) y los discos se colocaron sobre placas con PDA a las cuales se les incorporó el fungicida por evaluar. Para esto, durante la preparación de la solución PDA, se agregaron 0,5 g de azoxystrobina en 1 litro de medio y 1 ml de clorotalonil en 1 litro de medio, ya que estas son las dosis recomendadas en tomate por los fabricantes. Como testigo, se colocaron discos de micelio de cada especie hongo sobre PDA sin fungicida. La evaluación de los fungicidas se realizó en un solo bloque, a cada hongo se le fue asignado aleatoriamente uno de los tres tratamientos (azoxystrobina, clorotalonil y control). Se realizaron cinco réplicas por cada uno de los 12 aislamientos evaluados, para cada tratamiento.

Tanto para las pruebas de temperatura como para las de fungicidas, se registró el crecimiento del micelio cada dos días durante dos semanas de incubación. Para obtener las medidas del micelio, se tomaron fotografías de los discos en el día correspondiente a la medición y por medio del programa Image J 1.52a, se midió el área de micelio y se calcularon las tasas de crecimiento para cada hongo.

### **Pruebas sobre la germinación de esporas**

Para obtener las esporas, los hongos se cultivaron en placas Petri estériles de 60x15 mm, en 10 ml de medio PDA con sulfato de gentamicina al 0,03%, y se incubaron a

25° C ( $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ), fotoperiodo 12:12, durante 4-5 semanas, que inició la esporulación. Se cosecharon las esporas utilizando un bisturí estéril y se prepararon suspensiones de  $8 \times 10^5$  conidios/ml de agua destilada esterilizada (ADE) con Tween 80 al 1%. Para los conteos de las esporas, se utilizó una cámara de Neubauer. Los tubos de las suspensiones se agitaron por 1 min en un vórtex. Se colocó una gota de 10 $\mu\text{l}$  de la suspensión de conidios, en una placa Petri con medio PDA. Las gotas se dejaron secar 10 min en cámara de flujo laminar y posteriormente se sellaron con láminas de Parafilm®.

*Efecto de la temperatura en la germinación de las esporas.* Las placas Petri con las gotas de las disoluciones de esporas fueron incubadas durante 24 horas y fotoperiodo 12:12. Se realizó el experimento a las siguientes temperaturas: 23, 25 y 27°C ( $\pm 0,15^{\circ}\text{C}$ ). La germinación fue evaluada al exponer las esporas a una de las temperaturas a la vez. Se realizaron cinco réplicas por cada uno de los 11 aislamientos y el experimento completo se repitió en días distintos.

*Efecto de fungicidas en la germinación de las esporas:* En este caso, se evaluó la germinación de las esporas creciendo en un medio con fungicida. Dicho medio PDA se preparó incorporando las disoluciones de fungicidas, tal y como se detalla anteriormente en los métodos para evaluar el efecto de fungicida en el crecimiento de los hongos. Se utilizó medio PDA sin fungicida como testigo. Además, se prepararon disoluciones de esporas directamente con los fungicidas. Para esto, las esporas cosechadas fueron diluidas en azoxystrobina y en clorotalonil, en vez de ADE, a las concentraciones recomendadas para tomate ya mencionadas. Posteriormente gotas de 10 $\mu\text{L}$  de estas diluciones de esporas con fungicidas fueron colocadas placas con 10 ml de PDA sin fungicida incorporado en el medio de cultivo. Las placas se incubaron a 25°C ( $\pm 0,15^{\circ}\text{C}$ ), durante 24 o 48 horas, según el periodo por evaluar.

En total fueron cinco tratamientos por cada especie de hongo (medio PDA con azoxystrobina, medio PDA con clorotalonil, esporas diluidas en azoxystrobina, esporas diluidas en clorotalonil, y finalmente, esporas diluidas en ADE en medio sin fungicida), los cuales fueron asignados al azar, tanto para evaluar la germinación en un periodo de 24



horas de incubación, como para el periodo de 48 horas. Para combinación de hongo, tratamiento y periodo de incubación se realizaron cinco réplicas. El experimento completo se repitió en día distinto.

Para realizar el conteo de esporas germinadas, tanto para las pruebas de temperatura como para las pruebas con fungicidas, después de las 24 horas de incubación, se cortaron los discos de PDA en donde fue colocada inicialmente la gota de 10 $\mu$ l de la suspensión de esporas y se colocaron en una lámina. Se agregó una gota de azul de algodón y se colocó un cubreobjetos para ser observadas al microscopio Olympus BX40, con el objetivo de 40X. Se contaron 100 esporas por cada disco y se calculó el porcentaje de esporas germinadas. Las esporas se contaron como germinadas cuando se observó un tubo germinativo de un largo igual o mayor al largo de la espora.

### **Análisis estadístico**

Para comparar las tasas de crecimiento de los hongos, a las diferentes temperaturas evaluadas y el efecto de la interacción entre ambas variables (hongo\*temperatura), se realizó un análisis de varianza factorial. Las diferencias que fueron significativas se compararon con pruebas a posteriori de Tukey. Mientras que para evaluar el efecto de los fungicidas sobre crecimiento del micelio de cada hongo, se realizaron ANOVAs de una vía, también con pruebas posteriores de Tukey. Las pruebas se realizaron con previa evaluación de los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia de los datos.

Finalmente, para evaluar el efecto de la temperatura sobre la germinación de las esporas de los diferentes aislamientos y también para evaluar el efecto de los fungicidas sobre la germinación de esporas, a 24 y 48 horas de exposición, se realizaron pruebas Chi-cuadrado de Pearson y se calcularon las razones de momios (odds ratios) o pruebas exactas de Fisher, en los casos que fue necesario. Todas estas pruebas se realizaron con el software estadístico JMP® 7.0.

## RESULTADOS

Al realizar la comparación entre las tasas de crecimiento de los hongos evaluados, se obtuvo que hay diferencias significativas que dependen de la interacción entre la especie y el efecto de la temperatura (ANOVA factorial;  $F=8,9$ ;  $gl=12$ ;  $p<0,001$ ). Para siete especies de los doce hongos evaluados, 23°C resultó ser la temperatura en donde se registraron las mayores tasas de crecimiento vegetativo (Cuadro III). Sin embargo, en las especies *Moelleriella libera* e *Hypocrella disciformis* (L7H1), se registraron las mayores tasas de crecimiento tanto a 23° C como en 25°C. Asimismo, *H. disciformis* e *H. viridans* obtuvieron mayores tasas a 23° C y a 27 °C, ya que no se encontraron diferencias para estas especies entre dichas temperaturas. Por otro lado, *M. ochracea* y *Aciculosporium* sp. mostraron mayor crecimiento a 25°C y finalmente *M. bacysistis* a 27°C.

Al comparar las tasas de crecimiento entre especies, a una misma temperatura (Cuadro III), se encontró que, a 23°C el hongo *Verticillium* sp. posee la mayor tasa de crecimiento, seguido por *M. libera*, *M. phyllogena* y *Aciculosporium* sp. De igual manera, tanto a los 25°C como a los 27°C, se reportaron las mayores tasas de crecimiento para *Aciculosporium* sp., seguido de *M. libera* y *Verticillium* sp. Para estos mismos hongos, en las tres temperaturas a las cuales se evaluó la germinación de las esporas, se encontró el 100% de las esporas germinadas a las 24 horas de incubación (Figura 1).

Se encontró una asociación entre la temperatura y la germinación de las esporas para todos los aislamientos (Cuadro IV). Este resultado varió según el aislamiento, ya que todos los hongos pertenecientes al género *Hypocrella* presentaron una mayor probabilidad de germinar a 23°C. Sin embargo, en el caso de *H. viridas*, se dio tanto a 23°C como a 25°C. Por otro lado, todos los aislamientos del género *Moelleriella* (a excepción de *M. libera*, que germinó al 100% en todas las temperaturas) presentaron una mayor probabilidad de germinación a 25°C. Finalmente, *Balansia* sp. fue el único hongo, entre los que no germinaron al 100%, con mayor probabilidad de germinación a 27°C (Fig. 1; Cuadro IV).

Se obtuvieron resultados variables en cuanto al efecto de los fungicidas sobre el crecimiento del micelio entre los hongos evaluados. La mayoría de las especies de hongos mostraron una disminución significativa del crecimiento del micelio, al ser expuestas a los fungicidas (Fig. 2 y Fig.3). Estas especies fueron: *Aciculosporium* sp. (F=43,6; gl=2;  $p<0,001$ ), *B. brunnans* (F=62,4; gl=2;  $p<0,001$ ), *H. disciformis* (6\_1) (F=34,2; gl=;  $p<0,001$ ), *H. disciformis* (L7h1) (F=5,7; gl=2;  $p=0,005$ ), *H. viridans* (F=52,9; gl=2;  $p<0,001$ ), *M. libera* (F=51,1; gl=2;  $p<0,001$ ), *M. ochracea* (F=45,3; gl=2;  $P<0,001$ ) y *Verticillium* sp. (F=32,4, gl=2,  $<0,001$ ). Para estas ocho especies también se encontró que no hubo diferencias al comparar el crecimiento entre ambos fungicidas.

En el caso del hongo *Hypocrella* cf. *badia*, se encontraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento, entre los tres tratamientos (F=24,4; gl=2;  $p<0,001$ ). Esto quiere decir que los fungicidas afectaron el crecimiento del micelio y que, además, el micelio expuesto a clorotalonil creció menos que con azoxystrobina. También se encontró un efecto inhibitorio del crecimiento de *M. basicystis* al aplicar azoxystrobina (F=4,8; gl=2;  $p=0,01$ ) en comparación con el control. Lo contrario se observó en *M. turbinata*, en donde únicamente el clorotalonil afectó el crecimiento del hongo (F=5,8; gl=2;  $p<0,01$ ). Por otro lado, la única de las especies que no mostró diferencias entre los tres tratamientos fue *M. phyllogena* (Fig. 3), lo que indica que ninguno de los fungicidas afectó el crecimiento de este hongo.

La exposición de las esporas a los fungicidas azoxystrobina y clorotalonil inhibió la germinación de las mismas de forma significativa. Esto se observó tanto en las esporas cultivadas sobre PDA con los fungicidas incorporados al medio, como en las esporas disueltas en las soluciones de los fungicidas, a las concentraciones recomendadas (Cuadro II), y para todos los hongos evaluados. Esta inhibición de la germinación por efecto de fungicidas se observó tanto en las esporas evaluadas a las 24 horas de incubación (Cuadro V), como a las 48 horas de incubación (Cuadro VI).

Dentro de estos resultados de germinación, cabe resaltar que, a las 24 horas de incubación, solamente la mitad de los hongos que se evaluaron como testigos presentaban un promedio de germinación mayor a 90%, mientras que para la otra mitad

de las especies la germinación fue menos del 50% dentro este periodo (Cuadro V). Aun así, estos bajos porcentajes de germinación fueron significativamente mayores que en el caso de las esporas expuestas a fungicidas. Por otra parte, se obtuvo que las esporas testigo, evaluadas a las 48 horas de incubación, presentaron porcentajes de germinación altos en todas las especies. En este periodo, el porcentaje más bajo fue de un 85% de esporas germinadas, que corresponde a *Hypocrella* cf. *badia* (Cuadro VI). Esta comparación del porcentaje de germinación de las esporas control entre los dos periodos de incubación, a 25°C, se muestra en la Fig. 4.

## DISCUSIÓN

Las tasas de crecimiento de los hongos dependen de la temperatura y de la especie de hongo, como se muestra en los resultados obtenidos. En el presente estudio los hongos con mayores tasas de crecimiento fueron además los hongos con mayores porcentajes de esporulación. Sin embargo, en la literatura se ha visto que no necesariamente la tasa de crecimiento está correlacionada a las tasas de germinación de esporas (Rangel et al., 2008; Safavi et al., 2007). Por ejemplo, en un estudio de Safavi et al. (2007) se encontró que *B. bassiana*, creciendo en un medio de estrés osmótico, presentó las más bajas tasas de crecimiento y esporulación, pero al mismo tiempo, las más altas tasas de germinación y virulencia de las esporas.

La temperatura es considerada en general un factor crítico para el crecimiento y la germinación de esporas de los hongos. Por lo tanto, se conocen los rangos en los que crecen muchas especies de hongos entomopatógenos comerciales, usualmente entre 20 y 25°C o 25-30°C (Tumuhaise et al., 2018; Ibrahim et al., 1993). De los pocos estudios que existen con hongos *Hypocrella*, hay un estudio que muestra el efecto de la temperatura sobre la germinación de *Aschersonia placenta* e *H. raciborskii*, muestra que la germinación óptima ocurre entre 25 y 30°C y el desarrollo mayor de los tubos germinativos se dio a 30°C (Ibrahim et al., 1993). Además, Zhu et al. (2008) reportan requerimientos

nutricionales para el crecimiento óptimo de *M. libera*, para esto reportan crecimiento y esporulación, pero en medio de cultivo líquido.

Se debe de tomar en cuenta que la temperatura no es el único factor de influye en el desarrollo de los hongos. En general los hongos Hypocreales son hemibiotrofos (Roy et al., 2006), lo que implica que sean fáciles de cultivar a diferencia de los hongos que poseen modos de vida más obligatorios. Aun así, los Hypocreales tienen sus requerimientos para el desarrollo óptimo. Se sabe que en el crecimiento de hongos como *B. bassiana* y *M. anisoplie*, influyen factores nutricionales, por ejemplo, la proporción C/N presente en el medio de crecimiento, pero los efectos de la proporción de C/N en el medio varían entre especies. Además, las tasas de germinación también son afectadas por las condiciones nutricionales del medio (Safavi et al., 2007). También en la velocidad de la germinación se ha encontrado una correlación positiva con el tamaño de conidios aéreos (Altre et al., 1999), mientras que otros autores atribuyen una mayor velocidad de germinación al contenido proteico del inóculo (Jackson & Schisler, 1992).

En la gran mayoría de las especies evaluadas, la presencia de los fungicidas azoxystrobina y clorotalonil afectó el crecimiento del micelio. Además, inhibieron los porcentajes de germinación en prácticamente todas las especies. Interesante resaltar que las especies con tasas de crecimiento altas fueron las especies más susceptibles al efecto del fungicida, mientras que en las especies con las tasas de crecimiento más bajas las diferencias no fueron tan evidentes. En la literatura también se reportan efectos variables en estudios de interacción de fungicidas con aislamientos de especies comerciales, como *B. bassiana*. Se ha encontrado que muchos aislamientos son susceptibles al efecto de los fungicidas, causando inhibición del crecimiento del hongo y la germinación de las esporas; sin embargo, otros aislamientos han mostrado mayor tolerancia a diferentes fungicidas (Shah et al., 2009; Kouassi et al., 2003).

En el estudio de Shah et al. (2009), el crecimiento del micelio de algunos aislamientos no se vio afectado por los fungicidas evaluados, como en el caso de algunos hongos del presente estudio. No obstante, en el mismo estudio, el crecimiento fue inhibido significativamente para otros hongos, por lo que se describen efectos

fungistáticos más que fungicidas. Además, en ese mismo estudio se demostró que los efectos son dependientes de la dosis de los fungicidas (Shah et al., 2009).

Sobre la germinación a 24 y 48 horas, se encontró que en ambos momentos la germinación de esporas estaba inhibida por efectos de los fungicidas azoxystrobina y clorotalonil. Puede que lo que ocurra no sea una inhibición total de la germinación, sino un retraso de la misma (Shah et al., 2009). De ser así, al menos con los datos encontrados en este estudio, con azoxystrobina y clorotalonil, los hongos evaluados tenían retrasos en su germinación de más de 48 horas. Aun así, con sólo retrasar la germinación, la efectividad del hongo ya podría verse comprometida (Shah et al., 2009).

Jaronski (2010) reporta que los agroquímicos pueden afectar el desarrollo de los hongos *in vitro*, pero no necesariamente es lo que ocurre *in vivo*. Esto puede deberse a que, en el campo, los hongos pueden producir esporas de resistencia, esperando alcanzar la cutícula del hospedero para germinar. Mientras las esporas se encuentran en este estado, los agroquímicos podrían ser rápidamente absorbidos por las hojas (Jaronski, 2010). De hecho, se reporta que en general los fungicidas poseen persistencias en el ambiente bastante cortas (Griffin, 1994). Esto se ha reportado para fungicidas estrobilurinos, como la azoxystrobina, que son tóxicos para varios hongos entomopatógenos *in vitro* (da Silva & Neves, 2005). Sin embargo, algunos derivados pueden ser absorbidos por la planta en minutos, después de la aplicación (Shah et al., 2009). Esto quiere decir que las esporas aplicadas cierto tiempo después de estos fungicidas, ya no tienen contacto con los residuos y, por ende, no causaría el mismo efecto que al estar expuestas al fungicida durante 24 o 48 horas, como en este estudio.

En otros estudios, en donde se reporta que el tiempo de aplicación del fungicida (antes o después de los hongos) podría ser un factor importante a considerar en el campo, para no comprometer la efectividad de los hongos, más bien sugiere que los fungicidas podrían ser aplicados días después de los hongos. Kouassi et al. (2003) encontró que los fungicidas metalaxil, macnozeb y óxido cuproso afectan la germinación de *B. bassiana* en la cutícula, sin embargo, ya no causan el mismo efecto al ser aplicados dos días después de los hongos, y de esta forma la infección no se ve comprometida.

En cuanto a las esporas que no fueron expuestas a fungicidas, en donde se observó que aumentaron sus porcentajes de germinación a los dos días de incubación, podrían presentar tasas de germinación más lentas que la otra mitad de los hongos que desde el día 1 estaban 100% germinadas las esporas. Esto podría tener implicaciones importantes sobre la selección de las especies y efectividad de los hongos en control biológico. Esto debido a que hongos con mayor velocidad de germinación, presentan mayor virulencia, esta correlación se reporta en varios estudios con los hongos comerciales (Safavi et al., 2007; Hall, 1984).

En conclusión, se reportan y comparan tasas de crecimiento y porcentaje de germinación de esporas de hongos nativos entomopatógenos, que hasta la fecha han sido poco estudiados. Las tasas de crecimiento dependieron de la especie de los hongos y de la temperatura. Las especies de hongos con mayores tasas de crecimiento también presentaron los mayores porcentajes de germinación, en este último caso en todas las temperaturas evaluadas. Las temperaturas óptimas para el crecimiento variaron entre cada especie, entre 23 y 27°C. Sin embargo, a pesar de que la temperatura es un factor importante en el desarrollo de los hongos, en realidad son mucho los factores que influyen sobre estas variables y deberían ser evaluados en conjunto en futuras investigaciones.

Finalmente, los hongos evaluados mostraron una alta susceptibilidad a la exposición de los fungicidas azoxystrobina y clorotalonil, especialmente en cuanto a la germinación de esporas. Esta información es importante de considerar, ya que al ser estos hongos patógenos de grupos de insectos que incluyen serias plagas, podrían ser promisorios como agentes de control, por lo que esta información debe ser considerada para efectos de mejoras en la cría y uso en control biológico.

Cuadro I. Lista de especies de hongos aislados y utilizados en las diferentes pruebas de desarrollo.

Código de la muestra	Nombre actual	Acceso
6_1	<i>Hypocrella disciformis</i> P. Chaverri & K.T. Hodge, <i>Stud. Mycol.</i> 60: 55 (2008)	EU392566
24_3A	<i>Moelleriella phyllogena</i> (Mont.) P. Chaverri & K.T. Hodge, <i>Stud. Mycol.</i> 60: 46 (2008)	EU392608
L1H1	<i>M. libera</i> (Syd. & P. Syd.) P. Chaverri & M. Liu, <i>Stud. Mycol.</i> 60: 41 (2008)	EU392587
L11H2	<i>Verticillium</i> sp. Nees, <i>Syst. Pilze (Würzburg)</i> : 57 (1816)	AJ292403.1
L6H1	<i>Hypocrella</i> cf. <i>badia</i> Pat., <i>J. Bot.</i> , Paris 11: 370 (1897)	DQ384941
L7H1	<i>H. disciformis</i> P. Chaverri & K.T. Hodge, <i>Stud. Mycol.</i> 60: 55 (2008)	EU392566
M2H2	<i>M. basicystis</i> P. Chaverri & K.T. Hodge 2008	EF190283
M3H3	<i>M. ochracea</i> (Masse) M. Liu & P. Chaverri 2008	DQ365848
P17H20	<i>Aciculosporium</i> sp. I. Miyake, <i>Bot. Mag.</i> , Tokyo 22: (307) (1908)	MK691594
P19H18	<i>Balansia</i> sp. Speg. <i>Anal. Soc. cient. argent.</i> 19(1): 45 (1885)	AY327046
P26H43	<i>M. turbinata</i> (Berk.) Seaver, <i>Mycologia</i> 12(2): 96 (1920)	DQ070101
P34H51	<i>H. viridans</i> (Berk. & M.A. Curtis) Petch 1921	AY932753

Cuadro II: Información sobre los fungicidas utilizados para las pruebas de desarrollo de los hongos entomopatógenos.

Nombre comercial	Ingrediente activo	Formulación	Grupo químico	Dosis en Tomate ( <i>Lycopersicon sculentum</i> )
AMISTAR® 50 WG	Azoxystrobina	Gránulos dispersables (WG)	Estrobilurinas	0,5-0,6 g por litro de agua
BRAVONIL® 72SC	Clorotalonil	Suspensión Concentrada	Cloronitrilo	160-210 ml por 100 litros de agua (0,16-0,21%)



Cuadro III. Tasas de crecimiento del micelio de las especies de hongos (área (mm<sup>2</sup>)/día), a las distintas temperaturas evaluadas ( $\pm$ desviación estándar). Se resaltan las tasas de crecimiento que fueron significativamente más altas al comparar entre temperaturas, para una especie dada. Además, se utilizan letras en superíndice al lado del promedio, para indicar las diferencias entre las tasas de crecimiento de los hongos, dentro de una misma temperatura. Los hongos que comparten letra no presentan diferencias significativas entre ellos. Todas las comparaciones fueron resultados de pruebas a posterior de Tukey (con  $\alpha=0,05$ ).

Hongo	Temperatura		
	23°C	25°C	27°C
<i>M. libera</i>	15,0 $\pm$ 2,4 <sup>B</sup>	16,1 $\pm$ 1,3 <sup>B</sup>	11,2 $\pm$ 0,4 <sup>B</sup>
<i>M. phyllogena</i>	14,3 $\pm$ 6,0 <sup>B</sup>	3,2 $\pm$ 0,6 <sup>C-D-E</sup>	4,6 $\pm$ 1,1 <sup>C-D</sup>
<i>Verticillium</i> sp. (L11H2)	35,1 $\pm$ 9,0 <sup>A</sup>	16,2 $\pm$ 2,1 <sup>B</sup>	16,4 $\pm$ 2,7 <sup>A</sup>
<i>M. ochracea</i>	2,2 $\pm$ 0,5 <sup>D</sup>	5,1 $\pm$ 2,7 <sup>C-D</sup>	2,1 $\pm$ 0,5 <sup>D-E</sup>
<i>Aciculosporium</i> sp.	12,5 $\pm$ 1,4 <sup>B-C</sup>	20,6 $\pm$ 5,0 <sup>A</sup>	13,9 $\pm$ 1,1 <sup>A-B</sup>
<i>B. brunas</i>	6,4 $\pm$ 1,9 <sup>C-D</sup>	5,5 $\pm$ 1,9 <sup>C</sup>	4,3 $\pm$ 1,1 <sup>C-D</sup>
<i>H. disciformis</i> (6_1)	2,6 $\pm$ 0,7 <sup>D</sup>	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>E</sup>	2,3 $\pm$ 0,7 <sup>D-E</sup>
<i>Hypocrella</i> cf. <i>badia</i>	3,6 $\pm$ 2,1 <sup>D</sup>	1,2 $\pm$ 0,2 <sup>D-E</sup>	1,3 $\pm$ 1,0 <sup>D-E</sup>
<i>H. disciformis</i> (L7H1)	2,3 $\pm$ 0,7 <sup>D</sup>	2,9 $\pm$ 0,3 <sup>C-D-E</sup>	0,9 $\pm$ 0,2 <sup>E</sup>
<i>M. bacysistis</i>	3,0 $\pm$ 0,9 <sup>D</sup>	0,8 $\pm$ 0,5 <sup>E</sup>	6,8 $\pm$ 3,1 <sup>C</sup>
<i>M. turbinata</i>	2,6 $\pm$ 0,8 <sup>D</sup>	2,8 $\pm$ 0,6 <sup>C-D-E</sup>	2,8 $\pm$ 1,4 <sup>D-E</sup>
<i>H. viridans</i>	1,4 $\pm$ 0,3 <sup>D</sup>	0,8 $\pm$ 0,4 <sup>E</sup>	1,7 $\pm$ 0,6 <sup>D-E</sup>

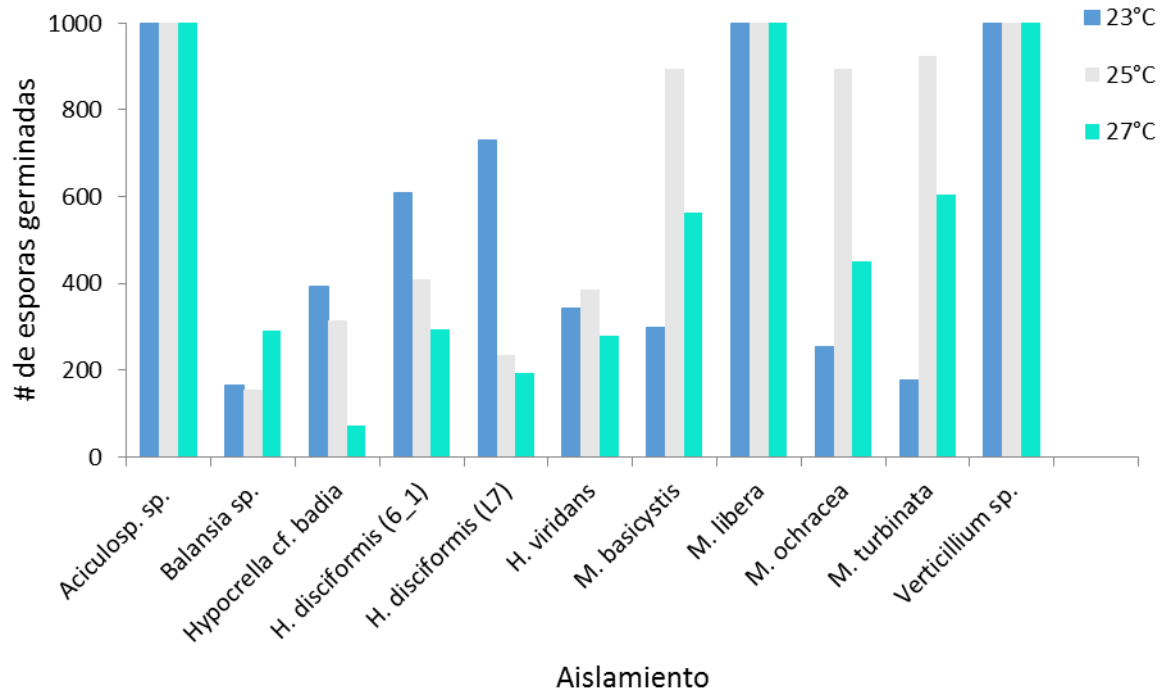


Figura 1. Número de esporas que germinaron a las 24 horas de incubación, para once aislamientos de hongos, evaluados a tres diferentes temperaturas.

Cuadro IV: Razones de momios (OR), intervalos de confianza y probabilidades asociadas a los Chi-cuadrado de Pearson, para medir la asociación entre las temperaturas y la germinación de esporas, para cada aislamiento. Los OR indican la posibilidad que las esporas germinen bajo la temperatura indicada a la izquierda con respecto a la temperatura de la derecha.

Aislamiento	Temperatura (°C)	OR	LIC 95%	LSC 95%	$\chi^2$	p ( $\chi^2$ )
<i>Balansia</i> sp.	23 vs 25	1,11	0,91	1,43	69,4	<0,0001
	25 vs 27	0,50	0,43	0,63		
	23 vs 27	0,45	0,43	0,56		
<i>Hypocrella</i> cf. <i>badia</i>	23 vs 25	1,43	1,25	1,67	292,5	<0,0001
	25 vs 27	5,00	5,00	10,00		
	23 vs 27	10,00	5,00	10,00		
<i>H. disciformis</i> (6_1)	23 vs 25	2,50	2,00	2,50	206	<0,0001
	25 vs 27	1,67	1,43	2,00		
	23 vs 27	3,33	3,33	5,00		
<i>H. disciformis</i> (L7)	23 vs 25	10,00	10,00	10,00	753,8	<0,0001
	25 vs 27	1,25	1,11	1,67		
	23 vs 27	10,00	10,00	10,00		
<i>H. viridans</i>	23 vs 25	0,83	0,71	1,00	25,6	<0,0001
	25 vs 27	1,67	1,43	2,00		
	23 vs 27	1,43	1,11	1,67		
<i>M. basicystis</i>	23 vs 25	0,05	0,04	0,06	737,3	<0,0001
	25 vs 27	10,00	5,00	10,00		
	23 vs 27	0,33	0,28	0,40		
<i>M. ochracea</i>	23 vs 25	0,04	0,03	0,05	864,9	<0,0001
	25 vs 27	10,00	10,00	10,00		
	23 vs 27	0,42	0,34	0,48		
<i>M. turbinata</i>	23 vs 25	0,02	0,01	0,02	1145,7	<0,0001
	25 vs 27	10,00	5,00	10,00		
	23 vs 27	0,14	0,11	0,17		

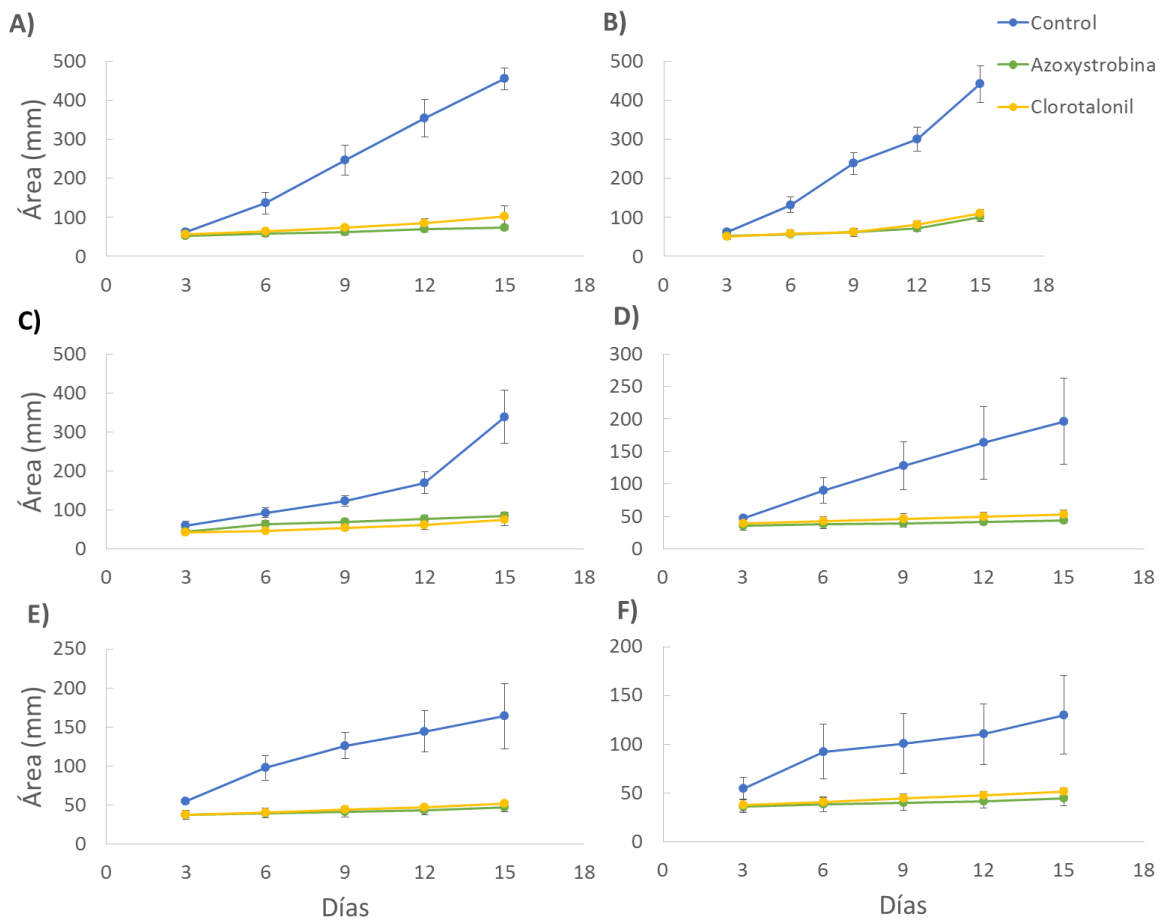


Fig. 2. Crecimiento del micelio en el tiempo de los aislamientos de hongos expuestos a los fungicidas azoxystrobin (verde), clorotalonil (amarillo) y control (azul). Estos hongos corresponden a las especies: **A)** *Aciculosporium* sp., **B)** *M. libera* (L1H1), **C)** *Verticillium* sp., **D)** *H. disciformis* (6\_1), **E)** *Balansia* sp. y **F)** *M. ochracea* (M3H3).

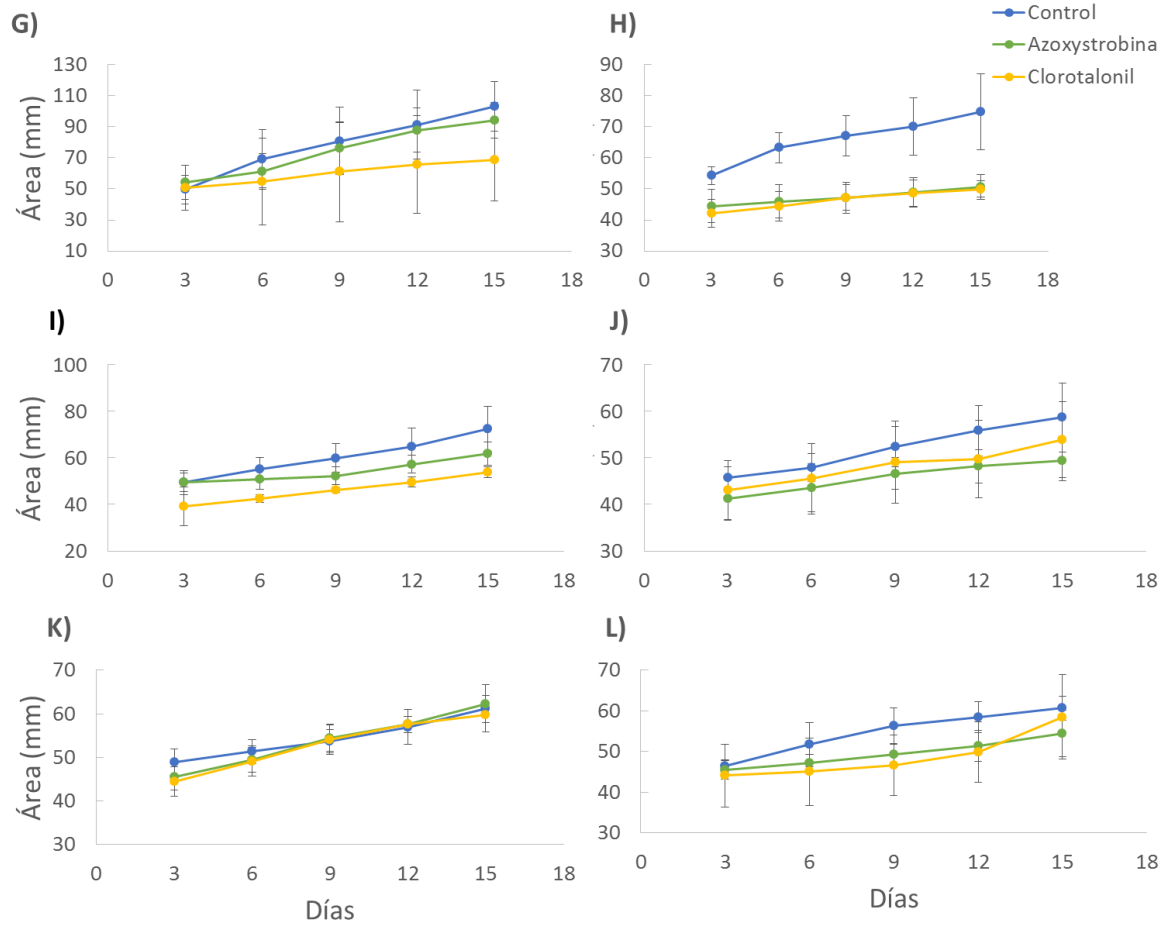


Fig. 3. Crecimiento del micelio en el tiempo de los aislamientos de hongos expuestos a los fungicidas azoxystrobina (verde), clorotalonil (amarillo) y control (azul). Estos hongos corresponden a las especies: **G)** *M. turbinata*, **H)** *H. viridans*, **I)** *Hypocrella cf. badia*, **J)** *M. basicystis*, **K)** *M. phyllogena* y **L)** *H. disciformis* (L7h1).

Cuadro V. Número de esporas germinadas a las **24 horas** de estar expuestas a cada uno de los tratamientos: control, medio PDA con fungicidas incorporados y la disolución de esporas con fungicidas. En todos los aislamientos y para todos los tratamientos de fungicidas comparados contra el control se obtuvo  $p < 0,0001$  (Prueba Exacta de Fisher).

Especie (código)	Tratamientos				
	Control	PDA+ Azoxystrobina	PDA+ Clorotalonil	Disueltas Azoxystrobina	Disueltas Clorotalonil
<i>Aciculosporium</i> sp. (P17H20)	1000	6	0	9	1
<i>M. libera</i> (L1H1)	1000	10	0	7	2
<i>Verticillium</i> sp. (L11H2)	1000	5	4	5	4
<i>M. turbinata</i> (P26H43)	925	0	2	1	0
<i>M. phyllogena</i> (24_3A)	901	0	0	0	0
<i>M. basicystis</i> (M2H2)	895	3	0	1	1
<i>M. ochracea</i> (M3H3)	894	0	0	0	0
<i>H. disciformis</i> (6_1)	411	6	0	2	2
<i>H. viridans</i> (P34H51)	385	0	0	0	1
<i>Hypocrella</i> cf. <i>badia</i> (L6H1)	315	0	0	0	0
<i>H. disciformis</i> (L7H1)	236	9	0	4	1
<i>Balansia</i> sp. (P19H18)	154	1	0	0	0

Cuadro VI. Número de esporas germinadas a las **48 horas** de estar expuestas a cada uno de los tratamientos: control, medio PDA con fungicidas incorporados y la disolución de esporas con fungicidas. En todos los aislamientos y para todos los tratamientos de fungicidas comparados contra el control se obtuvo  $p < 0,0001$  (Prueba Exacta de Fisher).

Especie (código)	Tratamientos				
	Control	PDA+ Azoxystrobina	PDA+ Clorotalonil	Disueltas Azoxystrobina	Disueltas Clorotalonil
<i>Aciculosporium</i> sp. (P17H20)	1000	8	2	6	3
<i>M. libera</i> (L1H1)	1000	9	4	4	1
<i>Verticillium</i> sp. (L11H2)	1000	7	8	6	5
<i>M. turbinata</i> (P26H43)	1000	1	2	0	3
<i>M. phyllogena</i> (24_3A)	997	0	0	0	0
<i>M. basicystis</i> (M2H2)	987	8	1	1	1
<i>M. ochracea</i> (M3H3)	1000	1	3	0	1
<i>H. disciformis</i> (6_1)	913	14	2	4	0
<i>H. viridans</i> (P34H51)	994	3	1	0	2
<i>Hypocrella</i> cf. <i>badia</i> (L6H1)	854	5	1	2	0
<i>H. disciformis</i> (L7H1)	960	13	2	2	2
<i>Balansia</i> sp. (P19H18)	954	10	3	2	4

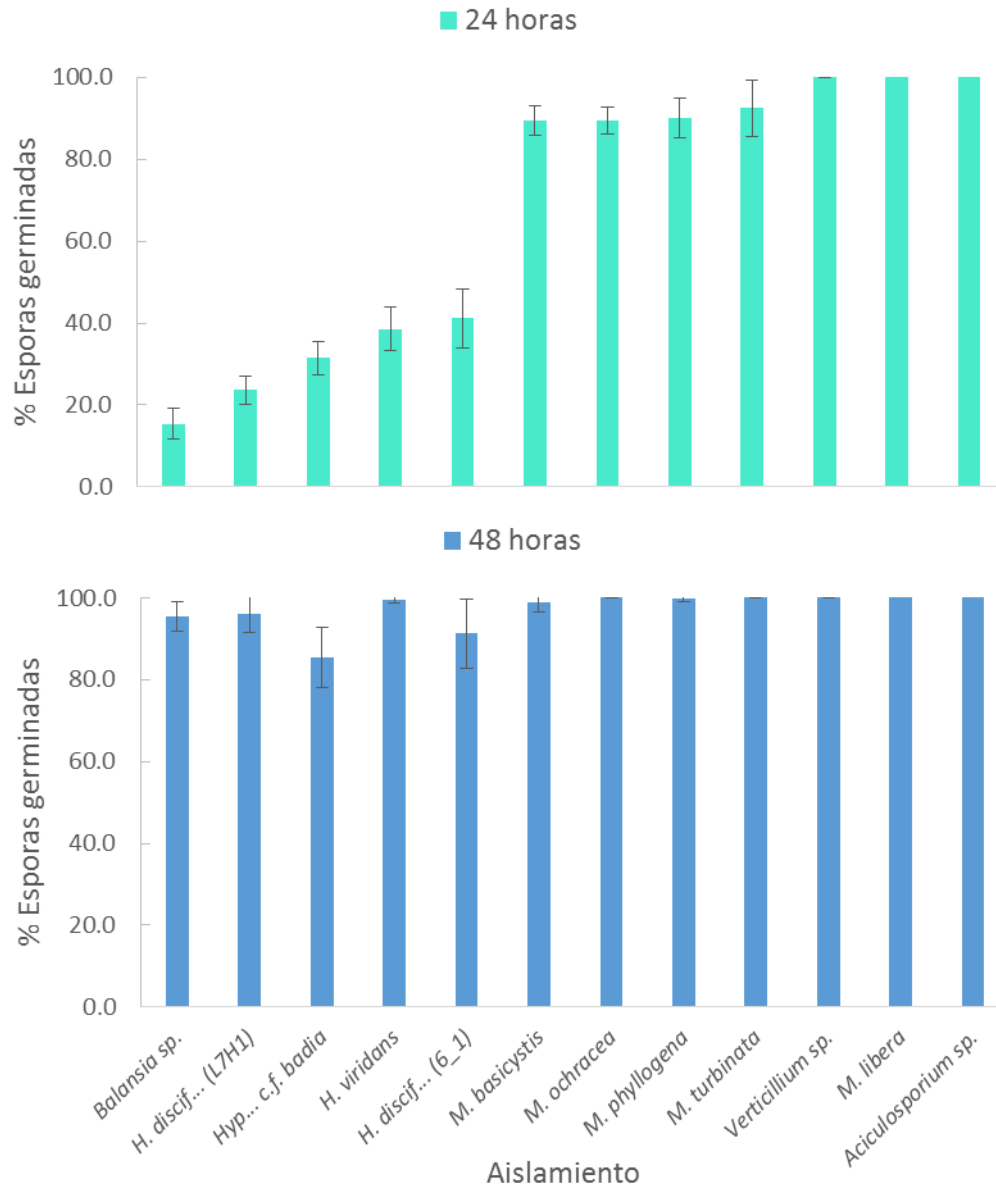


Fig. 4. Porcentaje promedio de esporas germinadas a las 24 y a las 48 horas de haberse cultivado en medio PDA e incubadas a 25°C, para cada uno de los hongos evaluados bajo el tratamiento Control.



### **CAPÍTULO III: Virulencia de hongos nativos Hypocreales sobre la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Aleyrodidae), en condiciones de laboratorio.**

Resumen: Se han impulsado en los últimos años los estudios de hongos entomopatógenos como alternativa para el control de insectos plaga. Especies de hongos *Hypocrella* y *Moelleriella* causan epizootias en la naturaleza sobre moscas blancas y escamas. A pesar de esto, los estudios sobre especificidad, virulencia y ciclos de infección son muy escasos para especies de estos géneros. Debido a su afinidad por Aleyrodidae silvestres, estos hongos son promisorios como controladores de *B. tabaci*. El objetivo del presente estudio fue evaluar la virulencia, sobre huevos y ninfas de *B. tabaci*, de distintos aislamientos de hongos Hypocreales, que se encontraron originalmente en el campo infectando especies nativas de Aleyrodidae o Coccidae. Para esto, se calculó el porcentaje de mortalidad de huevos y ninfas del cuarto estadio de *B. tabaci*, al exponerlos a los diferentes aislamientos de los hongos. Además, se calculó la concentración letal 50 (LC<sub>50</sub>) para los hongos que mostraron los mayores porcentajes de mortalidad. Ninguno de los aislamientos evaluados infectó los huevos, mientras que *M. libera*, *M. ochracea* y *M. turbinata* obtuvieron porcentajes de mortalidad de ninfas altos y significativamente mayores al control. *M. libera* resultó ser el aislamiento más virulento (LC<sub>50</sub>=1x10<sup>5</sup> conidios<sup>-ml</sup>), mientras que *M. ochracea* y *M. turbinata* requieren de una concentración de esporas mayor a las evaluadas en este estudio, para alcanzar la mortalidad del 50% de los individuos (para ambas LC<sub>50</sub>=1x10<sup>8</sup> conidios<sup>-ml</sup>). En estas pruebas los resultados suelen ser muy variables y dependen tanto de las características propias de cada aislamiento, como de muchos factores ambientales, que se deben considerar. La relevancia del presente estudio es el aporte de información sobre virulencia y ciclos de infección para especies de Hypocreales nada o muy poco estudiadas y además es un estudio con especies de hongos silvestres, lo cual también es poco común en la literatura.

**Palabras clave:** hongos entomopatógenos, *Hypocrella*, *Moelleriella*, concentración letal 50 (LC<sub>50</sub>), porcentaje de mortalidad, análisis Probit, control biológico.

La familia de insectos fitófagos Aleyrodidae (Hemiptera: Sternorrhyncha) incluye cientos de especies conocidas como moscas blancas, con alrededor de una docena de especies de importancia agrícola. Dos especies en particular, *Bemisia tabaci* (Gennadius) y *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), son de gran importancia, ya que se reportan como serias plagas en diferentes cultivos en muchas partes del mundo. Los huevos, ninfas y adultos de moscas blancas suelen encontrarse alimentándose de floema, en el envés de las hojas de las plantas hospederas (Khan & Wan, 2015).

*B. tabaci* es considerada un complejo de especies crípticas (De Barro, Liu, Boykin, & Dinsdale, 2011). El problema de *B. tabaci* como plaga en cultivos se debe principalmente a los daños que ocasiona al ser vectores de alrededor de 200 especies de virus, de los cuales los *Begomovirus* (Geminiviridae) son los de mayor frecuencia e importancia, en especial en zonas tropicales y subtropicales (De Barro et al., 2011; Rosen et al., 2015). En sistemas agrícolas, se sabe que la mosca blanca ha causado el mayor daño económico en cultivos de tomate, frijol, melón, sandía, algodón y chile (Hilje & Morales, 2008).

El uso tradicional de insecticidas químicos como único método de control de *B. tabaci* en la actualidad resulta ineficiente, ya que la especie ha logrado rápidamente desarrollar resistencia a la mayoría de los productos (Mascarin, Kobori, Quintela, & Delalibera, 2013; Dângelo, Michereff-Filho, Campos, da Silva, & Guedes, 2018). De hecho, este complejo de especies *B. tabaci* es considerado entre los cinco artrópodos con más casos registrados de resistencia a insecticidas en el mundo (Sparks & Nauen, 2015). En consecuencia, se ha impulsado en los últimos años el estudio de microorganismos como alternativa para el control de estos insectos. Entre estos organismos, los hongos entomopatógenos poseen gran potencial como biocontroladores (Butt & Goettel, 2000; Vega et al., 2009; Vega et al., 2012).

Actualmente existen en el mercado cerca de 129 productos comerciales a base de hongos, con el fin de controlar diversas plagas. La mayoría de estos son a base de *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin y *Akanthomyces lecanii* (Zimm.) Spatafora, Kepler & B. Shrestha (Faria & Wraight 2007). Estos son hongos que son muy generalistas (Jaronski, 2014). Por un lado, es beneficioso porque al atacar varias plagas a la vez, se reduce el costo del control, pero por otro lado se desconoce el efecto que podría tener sobre otros organismos que no son el blanco del control. Por ejemplo, el afectar insectos que actúan como enemigos naturales de la plaga, si se ven afectados, podría haber un resurgimiento de la plaga ya sin la presencia de los enemigos naturales, o surgimiento de plagas secundarias como primarias (Osborne & Landa, 1992).

En el caso de moscas blancas y escamas (Coccidae), se ha reportado que existen otras especies de Hypocreales que causan en la naturaleza epizootias y al parecer son específicos a estas familias de insectos (Meekes, et al. 2000; Meekes, Fransen, & Van Lenteren, 2002; Chaverri, Liu, & Hodge, 2008; Qiue et al. 2013). A pesar de esto, no han sido muy estudiadas y se desconoce sus rangos de hospederos, patogenicidad, virulencia y en general, información acerca de su ciclo de infección (Chaverri et al., 2008). Aspectos que han sido bien documentados para las especies más generalistas y comerciales como *B. bassiana* y *M. anisoplie* (Ibrahim, Butt, & Jenkinson, 2002; Mascarín et al., 2013; Faria, Lopes, Souza, & Wraight, 2015; Rangel et al., 2015; Tumuhaise et al., 2018).

La mayoría de las investigaciones sobre la virulencia de hongos entomopatógenos sobre *B. tabaci*, se enfocan en las especies más comerciales y para géneros como *Moelleriella* e *Hypocrella* son casi inexistentes, especialmente para aislamientos obtenidos directamente de insectos infectados en el campo. La excepción podría ser la especie *M. libera*, para la cual se pueden encontrar algunos reportes sobre su virulencia sobre diferentes especies de moscas blancas (Ibrahim & Low, 1993; Meekes et al. 2000; Meekes, 2001; Meekes et al., 2002).

La asociación del género *Hypocrella* y *Moelleriella* con escamas y moscas blancas fue reportada por Webber (1897), al reconocer que *Moelleriella libera* (sinónimo *Aschersonia aleyrodis*) era un importante agente de control de la mosca blanca de los cítricos *Dialeurodes citri* (Ashmead). Consecuentemente, esta especie de hongo fue utilizada por primera vez en Florida, Estados Unidos, para el control de las moscas blancas (Berger, 1921). Posteriormente el uso de estos hongos en control biológico decayó cuando se popularizaron los insecticidas sintéticos (Evans & Hywel-Jones, 1990). Sin embargo, su importancia resurgió en las últimas décadas (Meekes, 2001), ante la toma de conciencia de los efectos nocivos de los insecticidas y el desarrollo de resistencia por parte de las plagas, anteriormente mencionado.

El objetivo de la presente investigación fue calcular el porcentaje de mortalidad y la virulencia, sobre huevos y ninfas de *B. tabaci*, de distintos aislamientos de hongos Hypocreales, que se encontraron infectando especies silvestres de Aleyrodidae o

Coccidae. Este estudio aportaría información sobre medidas de virulencia y ciclo de infección para especies de Hypocreales nada o muy poco estudiadas anteriormente. Además, es relevante por la escasez de estudios en donde se utilizan hongos silvestres y con rangos de hospederos más limitados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Procedencia y cultivo de los hongos Hypocreales**

Los hongos utilizados en estas pruebas eran procedentes de la Reserva Biológica Tirimbina (RBT), en la Virgen de Sarapiquí (10°43'8689' 84°09'1412'), provincia de Heredia, Costa Rica. Estos hongos fueron recolectados el 11 de mayo, 25 y 26 de noviembre de 2017 y del 02 al 03 de junio del 2018, de los senderos Ceiba, Cacaotal, Canopy, Corteza y jardín de la reserva. Los hongos frescos fueron llevados al Laboratorio de Biotecnología Microbiana, en el Centro de Investigaciones de Productos Naturales (CIPRONA), de la Universidad de Costa Rica, en donde fueron aislados e identificados. Para la identificación de los hongos se utilizó, de forma complementaria, las claves taxonómicas para los hongos *Hypocrella* y *Moelleriella* (Chaverri et al., 2008) y la secuenciación de las regiones del espaciador transcrito interno (ITS) y 28S del ARN ribosomal nuclear, para su identificación molecular (Cuadro I).

Las esporas de los hongos traídos del campo, se cultivaron en placas Petri estériles de 60x15 mm, en aproximadamente 10 ml de medio Difco™ papa-dextrosa-agar (PDA), con sulfato de gentamicina al 0,03%. A las 24 horas, estos fueron purificados y después de dos o tres semanas de crecimiento en condiciones de temperatura ambiente del laboratorio (controlada entre los 21 y 25°C), se cortaron discos de 7,5 mm de diámetro del borde del micelio. Los discos se preservaron en 1 ml de agua destilada estéril (ADE) en crioviales (Nalgene-Thermo Fisher Scientific) hasta ser utilizados en las pruebas.

### **Cría de *Bemisia tabaci***

La cría de moscas blancas se mantuvo en plantas de tomate *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* (Dunal) D.M. Spooner, G.J. Anderson & R. K. Jansen, sembradas en

macetas, dentro de jaulas entomológicas de 100x100x62 cm, recubiertas con malla. Las jaulas se mantuvieron en un invernadero perteneciente al Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), ubicado en la Finca 2 del campus de la Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca. La temperatura en este recinto varió entre 20 y 30°C, y la humedad relativa 50-75%.

La cría de *B. tabaci* para la presente investigación, se inició en agosto del 2017 con hembras y machos adultos, provenientes de una cría ya establecida, perteneciente también al CIBCM. Las plantas de tomate, donde se mantuvo la cría, eran regadas tres veces por semana, con aproximadamente 300 ml de agua por planta. Periódicamente se colocaron en las jaulas nuevas plantas de tomate para la alimentación y reproducción de *B. tabaci* de la cría.

### **Preparación de las disoluciones de conidios**

Para la obtención de esporas, se cultivaron los hongos en PDA y se mantuvieron en las condiciones ya descritas del laboratorio del CIPRONA, esperando la esporulación. Una vez que los hongos esporularon, cerca de la cuarta semana de incubación, en una cámara de flujo laminar, se cosecharon los conidios utilizando bisturí esterilizado y se diluyeron en 25 ml de ADE con Tween 80 al 0,1%. Los tubos se agitaron durante 3 minutos y se colocaron en baño ultrasónico durante 1 minuto. Posteriormente, se realizaron conteos directos utilizando una cámara de Neubauer (1/400 mm<sup>2</sup>), para conocer la concentración de cada una de las disoluciones de los diferentes aislamientos. Para esto, se tomaron dos alícuotas de 20 µL y se contó el número de conidios dentro de los cuadros de las esquinas y del centro (área de cada cuadro: 0,0625 mm<sup>2</sup>) de la cámara. Se tomaron en cuenta las esporas sobre el borde superior y derecho de cada cuadro. Se realizaron cinco conteos para cada uno de los dos lados de la cámara Neubauer y se obtuvo la concentración de esporas utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de esporas} = \frac{\text{Total esporas contadas}}{\text{Número de cuadros contados}} * 160\ 000.$$

Una vez calculada la concentración inicial de las suspensiones de esporas de cada tubo (aislamiento), estas fueron diluidas a las concentraciones deseadas ( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,

$1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ ), con el fin de ser utilizadas para las diferentes evaluaciones sobre la virulencia de los hongos. Para este cálculo se utilizó la fórmula  $C1 * V1 = C2 * V2$ . Donde C1 es la concentración de esporas inicial, V1 es el volumen requerido para la dilución de la alícuota original, C2 la concentración de esporas deseada y V2 el volumen final deseado. Las nuevas suspensiones se almacenaron en refrigeración a  $5^\circ\text{C}$ , por un máximo de 24 horas (Inglis *et al.* 2012).

La viabilidad de las esporas utilizadas en los bioensayos fue corroborada al colocar una gota de  $10\mu\text{l}$  de la suspensión de conidios, en una placa Petri con medio PDA. Las gotas se dejaron secar 10 min en cámara de flujo laminar y posteriormente se sellaron con Parafilm®. Después de 24 horas de incubación, se cortaron los discos de PDA en donde fue colocada inicialmente las gotas y se observaron al microscopio Olympus BX40, con el objetivo de 40X. Se contaron 100 esporas por cada disco y se calculó el porcentaje de esporas germinadas. Estas contaron como germinadas cuando se observó un tubo germinativo de un largo igual o mayor al largo de la espora.

### **Diseño experimental de los bioensayos**

Para los bioensayos con los diferentes aislamientos de hongos sobre *B. tabaci*, se utilizaron discos de hojas con varios huevos o con ninfas del cuarto instar adheridos. Para concentrar la puesta de huevos, se colocaron 20 adultos de *B. tabaci* (tratando de que fuera una proporción similar de machos y de hembras) dentro de bolsas de tergal de  $12 \times 12$  cm, que se amarraron a una hoja compuesta de la planta de tomate, que previamente fue limpiada con agua y detergente. Las plantas de tomate con las bolsas se mantuvieron dentro de las jaulas del invernadero. A las 48 horas, las hojas fueron recolectadas y llevadas al laboratorio del CIPRONA, para obtener los huevos.

Para los bioensayos con ninfas de 4to instar, igualmente se colocaron 20 adultos en varias bolsas de tergal de  $12 \times 12$  cm. Cada bolsa en una hoja compuesta de tomate. A las 24 horas estos adultos fueron removidos de las bolsas, pero la hoja continuó cubierta, para concentrar las ninfas y evitar nuevas puestas de huevos, y de esta forma tratar de que todas las ninfas fueran aproximadamente de la misma edad. A los 15 días, que es

aproximadamente el tiempo de desarrollo del huevo hasta la ninfa de 4to instar, se cortaron las hojas y se llevaron dentro de las bolsas al laboratorio del CIPRONA.

Para los bioensayos, de las hojas recolectadas se cortaron discos de 3 cm de diámetro, donde se encontraban al menos 10 o más huevos o ninfas de 4to instar. Para infectar huevos o ninfas sobre los discos de hojas, dentro de una cámara de flujo laminar, las suspensiones diluidas a una concentración deseada, se agitaron durante un minuto, y se vertieron en placas Petri de vidrio estériles de 80x15mm. Los discos de hojas con los huevos o ninfas fueron sumergidos y agitados utilizando pinzas, en estas soluciones durante 1 minuto. Después los discos se dejaron secar 10-15 minutos, dentro de la cámara de flujo laminar. Finalmente se colocaron sobre un papel filtro mojado con 1-2 ml de agua, dentro de una nueva placa Petri estéril de 80x15mm. Las placas se sellaron con láminas de parafilm®.

Se evaluó la mortalidad sobre los huevos, causada por siete aislamientos de hongos Hypocreales, mientras que para las ninfas fueron 11 diferentes aislamientos (Cuadro I). Tanto para los ensayos con huevo como para las ninfas, se aplicaron los hongos a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios/ml, contra un testigo que fue la exposición de discos de hojas con *B. tabaci*, a una solución de ADE con Tween 80 al 0,1% sin conidios.

### **Medición del porcentaje de mortalidad y LC<sub>50</sub>**

Para conocer el porcentaje de mortalidad de huevos, se contó el número inicial de huevos y se restó el número de huevos eclosionados. Se realizó el conteo de ninfas emergidas de los huevos a los 10 días de iniciado el ensayo. En el caso de los bioensayos con ninfas de cuarto instar, se contó diariamente el número de ninfas muertas, durante 14 días de experimento. Las ninfas muertas se identificaron debido al cambio de coloración que experimentan. En caso de identificar una ninfa muerta, los cadáveres eran removidos y colocados en cámaras húmedas para esperar la esporulación y confirmar la infección por el hongo.

Además, una vez conocidos los aislamientos que ocasionaron los mayores porcentajes de mortalidad en ninfas de cuarto instar, se realizaron ensayos para obtener

la LC<sub>50</sub> únicamente con estos aislamientos. Para esto, los discos de hojas fueron expuestos a diferentes concentraciones de conidios:  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  conidios<sup>-1</sup>. Todos los tratamientos fueron asignados de forma aleatoria a cada unidad experimental.

Los bioensayos con ninfas de cuarto instar, en total fueron 12 tratamientos (11 aislamientos + el control), con 5 réplicas por cada uno. Además, en la evaluación de la LC<sub>50</sub>, también se realizaron 5 réplicas por cada una de las cuatro concentraciones de esporas evaluada, para cada aislamiento evaluado. Todos los experimentos completos se repitieron dos veces más en días distintos.

### **Análisis estadístico**

Se realizaron pruebas de Chi-cuadrado de Pearson para comparar la mortalidad de huevos a los 10 días de incubación, entre los bioensayos realizados y entre los diferentes aislamientos de hongos, a la concentración de  $1 \times 10^6$  conidios ml<sup>-1</sup>. Para comparar los porcentajes de mortalidad de las ninfas entre los distintos aislamientos, se realizó una transformación Arcsen de los datos, debido a que presentaban una distribución binomial. Se realizó un ANOVA de una vía para conocer si existía variación entre la mortalidad de ninfas entre los distintos bioensayos realizados, con prueba a posteriori de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Además, se realizaron ANOVAS de una vía y pruebas de Dunnett ( $\alpha=0,05$ ) a posteriori para comparar los porcentajes de mortalidad de ninfas expuestas a los hongos contra el porcentaje de mortalidad del control. Debido a que el primer bioensayo fue significativamente distinto a los otros, este se analizó por separado.

Finalmente, se utilizó un modelo de regresión Probit para evaluar el efecto de la concentración de esporas sobre la mortalidad de las ninfas y para calcular la LC<sub>50</sub> de cada uno de los hongos. Los análisis se realizaron con el software estadístico JMP® 7.0.

### **RESULTADOS**

Para corroborar que los conidios aplicados en los bioensayos estaban viables, se realizó un conteo de esporas germinadas a las 24 horas y se obtuvo que para los hongos *Aciculosporium* sp., *Moelleriella libera* y *Verticillium* sp., el porcentaje de esporas



germinadas siempre fue del 100%, para todos los bioensayos. En los hongos *Moelleriella turbinata*, *Moelleriella phyllogena*, *Moelleriella basicystis* y *Moelleriella ochracea* el porcentaje de germinación siempre fue mayor al 90%. Mientras que *Hypocrella disciformis* (6\_1) e *Hypocrella viridans* presentaron porcentajes de germinación a las 24 horas cerca del 50%. Finalmente, para los hongos *Hypocrella* c.f. *badia*, *H. disciformis* (L7H1) y *Balansia* sp. el porcentaje de germinación a las 24 horas fue de 15-30%.

Los porcentajes de mortalidad de los huevos de *B. tabaci*, que fueron expuestos a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{ml}^{-1}$ , no fueron variables entre los bioensayos ( $\chi^2=1,18$ ;  $gl=2$ ;  $p=0,06$ ), por eso fueron analizados los tres bioensayos en conjunto. En general, dichos porcentajes de mortalidad fueron bastante bajos para todos los aislamientos (Figura 1). El porcentaje de eclosión (o de sobrevivencia) de los huevos fue de  $86,8 \pm 10,7\%$  y la gran mayoría eclosionó entre los días 5 y 6 (Fig. 2). Ningún tratamiento se asoció a una mayor mortalidad de huevos ( $\chi^2=9,75$ ;  $gl=7$ ;  $p=0,20$ ). Debido a que no se encontró un efecto de los hongos sobre la mortalidad de los huevos, no se realizaron las pruebas posteriores con huevos para calcular la  $LC_{50}$ .

En cuanto a la mortalidad de ninfas, debido a que se encontró una gran variación en el bioensayo I en comparación con los bioensayos restantes ( $F=5,52$ ;  $gl=2$ ;  $p=0,005$ ), se analizó por separado el bioensayo I, el cual presentó un porcentaje de mortalidad promedio mayor que los bioensayos II y III (Figuras 3 y 4). Para el primer bioensayo, se encontró que el único hongo con un porcentaje de mortalidad promedio significativamente mayor al control fue *M. libera*. Para los demás hongos no se encontraron diferencias con respecto al control (Fig. 3;  $F=3,80$ ;  $gl=12$ ;  $p<0,001$ ).

En cuanto los bioensayos II y III, los cuales fueron analizados en conjunto, los hongos *M. libera*, *M. ochracea*, *M. turbinata* e *H. disciformis* presentaron porcentajes de mortalidad de ninfas significativamente mayores al control; mientras que los demás hongos evaluados no presentaron diferencias con respecto a este (Fig. 4;  $F=23,57$ ;  $gl=12$ ;  $p<0,001$ ). A pesar de presentar diferencias con respecto al control, algunos de estos hongos presentaron porcentajes de mortalidad relativamente bajos y el único hongo que superó el 50% de mortalidad de las ninfas fue *M. libera*.

Los hongos evaluados a distintas concentraciones de esporas fueron *M. libera*, *M. ochracea* y *M. turbinata*, ya que fueron los que mostraron mejores resultados en los bioensayos anteriores. Se encontró que la concentración de esporas posee un efecto sobre la mortalidad de las ninfas, esto se observó en los tres aislamientos: *M. libera* (Cuadro II; n=20; p<0,001), *M. ochracea* (Cuadro II; n=20; p<0,001) y *M. turbinata* (Cuadro II; n=20; p<0,01). Los tres hongos, *M. libera*, *M. ochracea* y *M. turbinata*, mostraron un buen ajuste al modelo de regresión Probit (Cuadro II). Se obtuvo que la LC<sub>50</sub> para *M. libera* fue de  $1 \times 10^5$  conidios ml<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup>=0,8), mientras que para *M. ochracea* y *M. turbinata* fue de  $1 \times 10^8$  conidios ml<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup>=0,6 y 0,5 respectivamente).

## DISCUSIÓN

La infección de los huevos de *B. tabaci* con hongos entomopatógenos parece ser poco común. De hecho, en muchas de las investigaciones donde se ha evaluado la patogenicidad de aislamientos de hongos entomopatógenos, especialmente comerciales, sobre distintos estadios de moscas blancas, se ha encontrado que los huevos y los adultos no son tan susceptibles a las infecciones como otros estadios inmaduros (Samson & McCoy, 1983; Fransen et al., 1987; Osborne & Landa, 1992). Un estudio más reciente que evaluó *M. libera* llegó a la misma conclusión, en donde los porcentajes de eclosión de huevos fueron mayores al 70% y no diferentes del control (Zhang, Ali, Musa, Wang, & Qiu, 2017). Esto coincide con los resultados obtenidos, ya que, al no encontrarse diferencias entre los porcentajes de mortalidad de los huevos con respecto al control, se concluye que ninguno de los siete aislamientos evaluados infecta los huevos de *B. tabaci*, a los 10 días de incubación y a la concentración  $1 \times 10^6$  conidios ml<sup>-1</sup>.

Lo que se observa en los resultados de mortalidad de los huevos del presente estudio parece reflejar más los aspectos propios del ciclo de vida de *B. tabaci*, para la cual se reporta la eclosión de más del 80% de los huevos, en periodos de incubación de aproximadamente 11 días en tomate (Marilene & Vendramim, 2002). Estos datos coinciden con estos resultados obtenidos, por lo tanto, se confirma que no hay efecto de los hongos evaluados sobre los huevos.

En un estudio con varios aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, tampoco se encontró diferencias en la mortalidad de los huevos de *B. tabaci*, al comparar entre huevos expuestos a los hongos contra el control (Fransen et al., 1987). Sin embargo, en el mismo estudio, se encontró que las ninfas provenientes de huevos tratados con hongos mostraron señales de infección. Esto podría indicar que los primeros estadios ninfales pueden infectarse con los conidios al salir del huevo, aunque el huevo no sea directamente afectado. Esto es relevante ya que podría indicar un efecto residual importante, al infectarse al entrar en contacto con las esporas que permanecen sobre las hojas. Por ejemplo, se reporta que *M. libera* posee un efecto residual de hasta 7 días sobre las hojas (Fransen et al., 1987).

Se han reportado en estudios con *M. libera*, los mayores porcentajes de mortalidad en ninfas recién eclosionadas, mientras que los hongos sobre las ninfas de 4to instar son menos patogénicos (Zhang et al., 2017). Algunos hongos, como *Akanthomyces lecanii* y *Cordyceps fumosoroseus* se conoce que poseen un rango de infección más amplio que otros hongos, como *M. libera*, al ser capaces de infectar todos los estadios inmaduros y además adultos de *B. tabaci* y de *T. vaporariorum*. Además, *C. fumosoroseus* puede infectar huevos de moscas blancas (Osborne & Landa, 1992). Quizás esta capacidad de infectar huevos, a diferencia de otros Hypocreales, se deba a esta particularidad de presentar ciclos de infección mucho más rápidos que otros hongos (Hall, 1981; Landa & Jiranova, 1988).

En cuanto a los bioensayos con las ninfas de cuarto instar, se encontró que el primer bioensayo realizado fue muy diferente a los otros dos, ya que presentó porcentajes de mortalidad generales más altos que el bioensayo 2 y 3. Esto podría deberse a la atenuación de la virulencia que ocurre cuando se realizan varios subcultivos en medios artificiales (Shah et al. 2005; Mohammadbeigi, 2013). Esto se podría contrarrestar si las esporas que se utilizan para los bioensayos, son obtenidas directamente de los insectos infectados. Sin embargo, ese tipo de pruebas son útiles para hongos que presentan virulencia y hospederos confirmados, y esta información aún es poco conocida para los hongos Hypocreales, lo cual es un aporte del presente estudio.

*Moelleriella libera* fue el hongo que presentó los mayores porcentajes de mortalidad de ninfas de 4to instar, para todos los bioensayos. De los Hypocreales evaluados, esta es la especie que ha sido un poco más estudiada (Zhang et al., 2017) y se ha reportado como un buen prospecto para el control de *B. tabaci*. Además de las características encontradas en el presente estudio, se reporta que la capacidad de infección de *M. libera* podría estar favorecida por su amplia tolerancia a diferentes humedades relativas, larga persistencia en la superficie de las hojas, compatibilidad con otros enemigos naturales y capacidad de infectar por contacto directo o de forma secundaria a insectos chupadores del floema (Meekes et al., 2002; Qiu et al., 2013).

*Moelleriella ochraceae* y *M. turbinata*, a pesar de no mostrar porcentajes de mortalidad de las ninfas tan altos como *M. libera*, mostraron un efecto significativo. Estas especies no han sido estudiadas previamente. *M. ochracea* y *M. libera* podrían ser consideradas especies más generalistas, ya que se han encontrado parasitando varias especies de escamas y moscas blancas (Petch, 1921; Meekes et al., 2000; Meekes, 2001; Meekes et al., 2002). Por lo tanto, el presente estudio aporta información sobre patogenicidad de hongos Hypocreales poco estudiados.

En los resultados del presente estudio se encontró que *M. ochracea* y *M. turbinata* tienen la capacidad de infectar ninfas de cuarto instar de *B. tabaci*. Sin embargo, para ambos aislamientos se requiere de una concentración de esporas mayor a la evaluada para alcanzar el 50% de la mortalidad de las ninfas, ya que la  $LC_{50}$  calculada por el modelo fue de  $1 \times 10^8$  conidios  $ml^{-1}$ . Por otro lado, la  $LC_{50}$  de *M. libera* fue de  $1 \times 10^5$  conidios  $ml^{-1}$ , esto quiere decir que con mucho menos concentración de esporas es capaz de matar al 50% de los individuos, por lo tanto, es el aislamiento más virulento. En la literatura se reporta que la mortalidad de las ninfas puede aumentar con la concentración de esporas (Zhang et al., 2017) y que la  $LC_{50}$  es dependiente de la edad, en donde las ninfas más jóvenes suelen tener una menor  $LC_{50}$  que para ninfas más viejas (Bajwa et al., 2016).

En general, la virulencia de los hongos entomopatógenos puede depender de las características propias del aislamiento, por ejemplo, hay aislamientos más susceptibles que otros a la atenuación de la virulencia (Butt et al., 2006). Además, existen otras

características que pueden afectar el proceso de infección y el desarrollo de los hongos en el hospedero. Estos factores son la capacidad de adhesión a la superficie, germinación, penetración de la cutícula, colonización y diferenciación de conidios y células conidióforas (Butt et al., 2006). También la virulencia puede verse afectada por la composición de enzimas encargadas de la degradación de la cutícula que presenta cada hongo (Nahar et al., 2008). Se ha visto que la virulencia puede estar en parte correlacionada a la actividad de las quitinasas (El-Sayed et al., 1989; El-Sayed et al., 1993; St. Leger et al., 1996).

La virulencia puede depender de condiciones ambientales. Por ejemplo el efecto de la nutrición del hongo sobre la virulencia ha sido reportado y se ha visto que la proporción de C:N en el medio de cultivo puede afectar la virulencia de los hongos (Safavi et al., 2007; Zhu et al., 2008). Asimismo, niveles de humedad altos, al menos en un periodo corto, parece ser un aspecto crítico que favorece el inicio de la infección (la adhesión de los conidios a la superficie del hospedero, la germinación y penetración de la cutícula). Se reporta que para *M. libera* este proceso de infección bajo condiciones óptimas ocurre entre 12 y 24 horas (Rombach & Gillespie, 1988). Mientras que la temperatura es un factor menos limitante que la humedad (Osborne & Landa, 1992).

Los bioensayos de laboratorio suelen tener resultados muy variables, por esto deben imitar en la medida de lo posible las condiciones reales del campo (Inglis, Enkerli, & Goettel, 2012). La respuesta obtenida en el laboratorio puede ser distinta en condiciones del campo, por eso se dice que el éxito de los hongos como biocontroladores depende principalmente de los resultados de las pruebas de invernadero (Faria & Wraight, 2001). Sin embargo, los bioensayos en condiciones controladas son de mucha importancia para conocer los aspectos más preliminares.

Algunas posibles fuentes de error en el presente estudio podrían deberse a que no se determinó la concentración real de las disoluciones de esporas, las cuales se prepararon previo a realizar los bioensayos, ni se calculó el porcentaje de error para estas, a las concentraciones deseadas. Esto fue debido a falta de tiempo, para poder realizar el montaje de todo un bioensayo completo en un mismo día. La forma de aplicar los conidios a los individuos, por medio de inmersión podría ser otra fuente de error. Lo ideal sería

aplicar las esporas con un aspersor que pueda calcular el volumen aplicado, de forma más exacta, con lo cual no se contaba en el laboratorio al momento de realizar los bioensayos. Se recomienda, además de aumentar las repeticiones de los bioensayos, utilizar un hongo con virulencia comprobada como un segundo control.

Cabe destacar que en el presente estudio hubo un intento de montar bioensayos en placas multipozos y en láminas fijas, lo cual permitía evaluar todos los hongos y las diferentes concentraciones a la vez y para evitar contaminantes presentes en los discos de hojas de las plantas. Sin embargo, en pruebas preliminares se obtuvo un porcentaje de mortalidad de huevos y de ninfas control muy alto (casi el 100%), ya que debían manipularse para ser despegados de las hojas, esto parecía tener un efecto negativo en la sobrevivencia de los huevos y de las ninfas, por lo que se descartó la idea de hacer los bioensayos de esta manera.

Como conclusiones del presente estudio, los hongos Hypocreales ensayados no tuvieron efecto sobre los huevos de *B. tabaci*, ya que registraron porcentajes de mortalidad muy bajos, que no fueron significativamente distintos a la mortalidad del tratamiento control. Sin embargo, tres especies demostraron ser patogénicas contra ninfas del cuarto estadio de *B. tabaci* en condiciones de laboratorio: *M. libera*, *M. ochracea* y *M. turbinata*. Entre estas, el aislamiento más virulento resultó ser *M. libera*, la cual causó la mayor mortalidad de las ninfas y además se determinó que posee una  $LC_{50}=1 \times 10^5$  conidios  $ml^{-1}$ , mientras que para las otras dos especies fue de  $LC_{50}=1 \times 10^8$  conidios  $ml^{-1}$ , esto quiere decir que se requiere de una concentración de esporas mayor a la evaluada en este estudio para causar el 50% de la mortalidad de las ninfas.

Esta información sobre la infección y virulencia de los hongos, en conjunto con estudios posteriores acerca de la producción en masa, ensayos en invernaderos y formulación de estos hongos en productos, son esenciales para su potencial uso como biocontroladores en programas de MIP contra *B. tabaci*. Este estudio, con ensayos preliminares en laboratorio, brinda información sobre aspectos del ciclo de infección de hongos silvestres, que eran poco o nada estudiados previamente. Conocer esta información permitiría la selección de los aislamientos más virulentos para ensayos

posteriores en invernaderos. Conocer la virulencia de los hongos y, además, los requerimientos ambientales para su cultivo y desarrollo óptimo en el laboratorio, son estudios relevantes como primeros pasos hacia el desarrollo de formulaciones y planteamiento de estrategias más eficaces para el control de *B. tabaci*, en cultivos de importancia económica.

Cuadro I. Lista de especies de hongos aislados y utilizados en las diferentes pruebas de virulencia.

Código de la muestra	Nombre actual	Acceso
6_1	<i>Hypocrella disciformis</i> P. Chaverri & K.T. Hodge	EU392566
24_3 <sup>a</sup>	<i>Moelleriella phyllogena</i> (Mont.) P. Chaverri & K.T. Hodge	EU392608
L1H1	<i>M. libera</i> (Syd. & P. Syd.) P. Chaverri & M. Liu	EU392587
L11H2	<i>Verticillium sp.</i> Nees	AJ292403.1
L6H1	<i>Hypocrella cf. badia</i> Pat.	DQ384941
L7H1	<i>H. disciformis</i> P. Chaverri & K.T. Hodge	EU392566
M2H2	<i>M. basicystis</i> P. Chaverri & K.T. Hodge	EF190283
M3H3	<i>M. ochracea</i> (Masse) M. Liu & P. Chaverri	DQ365848
P17H20	<i>Aciculosporium sp.</i> I. Miyake	MK691594
P19H18	<i>Balansia</i> Speg	AY327046
P26H43	<i>M. turbinata</i> (Petch) P. Chaverri & K.T. Hodge	DQ070101
P34H51	<i>H. viridans</i> (Berk. & M.A. Curtis) Petch	AY932753

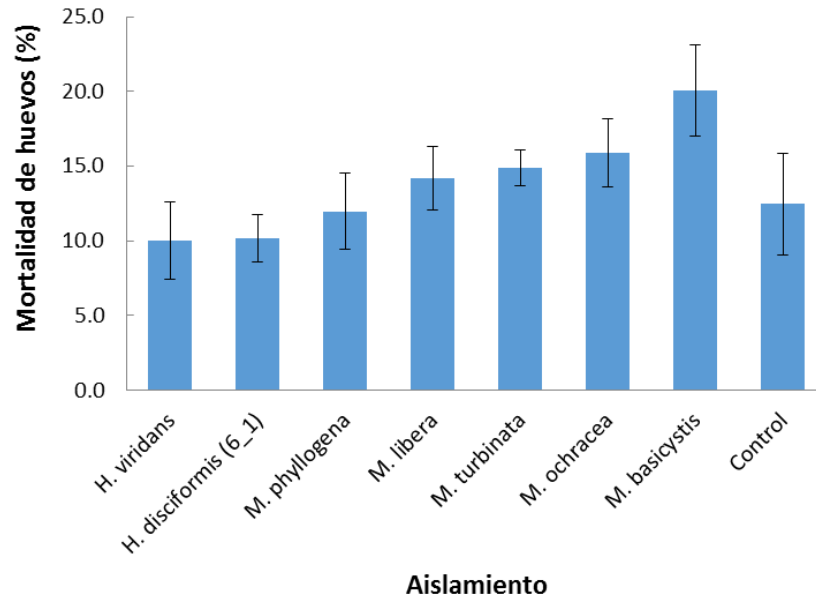


Figura 1. Porcentaje de mortalidad ( $\pm$ desviación estándar) de los huevos a los 10 días, expuestos a diferentes aislamientos, a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{ml}^{-1}$ .

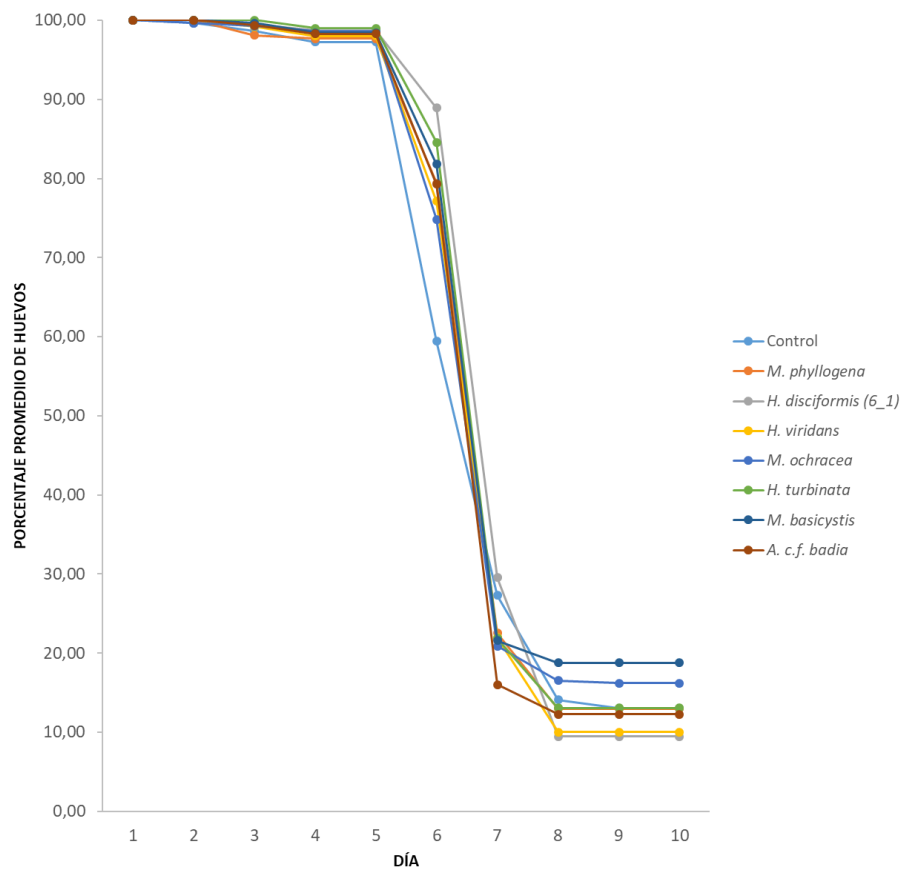


Fig. 2. Porcentaje de huevos promedio medido a través el tiempo (en días), para los diferentes aislamientos.



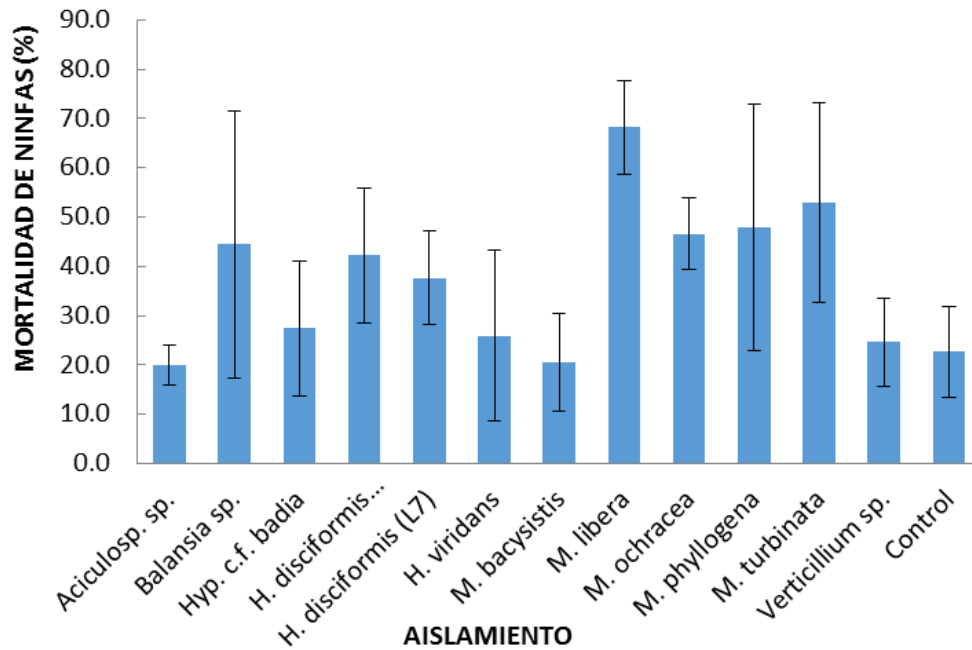


Fig.3. Porcentaje de mortalidad ( $\pm$ desviación estándar) de ninfas de cuarto instar a los 14 días, del primer bioensayo, a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ .

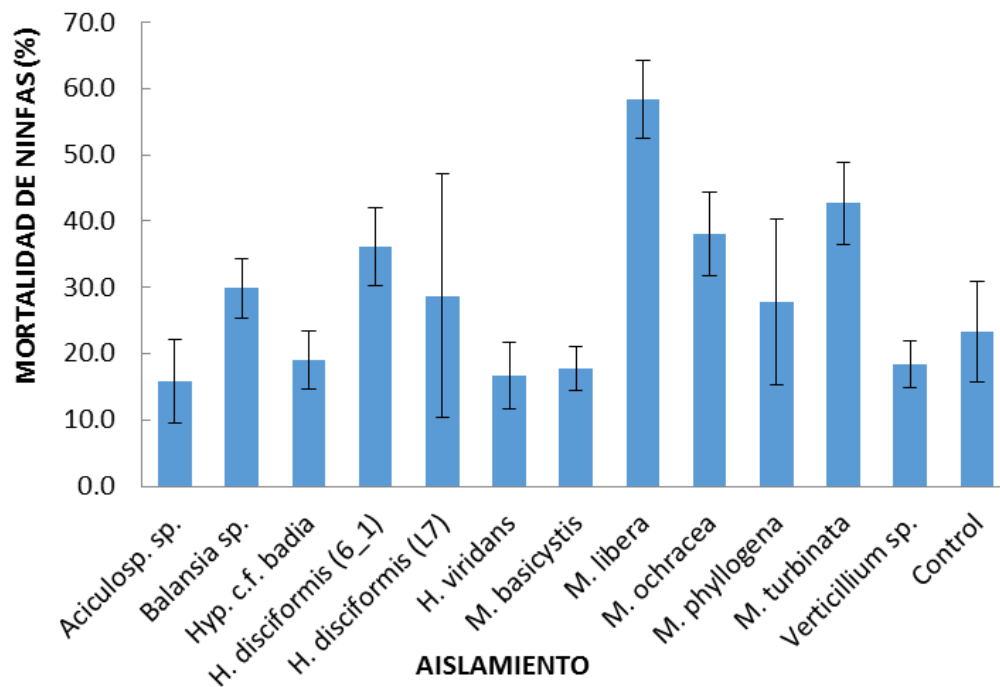


Fig. 4. Porcentaje de mortalidad ( $\pm$ desviación estándar) de ninfas de cuarto instar, a los 14 días, para los bioensayos 2 y 3, a la concentración de  $1 \times 10^6$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ .

Cuadro II. Porcentaje de mortalidad de ninfas y análisis de regresión Probit, para los aislamientos evaluados a cuatro distintas concentraciones de esporas.

Parámetro	Conidios/mL	HONGO		
		<i>M. libera</i>	<i>M. ochracea</i>	<i>M. turbinata</i>
Porcentaje promedio de mortalidad y DE	1x10 <sup>4</sup>	42 ± 4.6	31 ± 3.4	26.2 ± 2.6
	1x10 <sup>5</sup>	46.6 ± 7.1	32.6 ± 5.4	29.8 ± 5.7
	1x10 <sup>6</sup>	62.8 ± 8.2	44.2 ± 6.5	39 ± 4.9
	1x10 <sup>7</sup>	72 ± 5.7	45.2 ± 5.4	41.6 ± 9.7
valor probit		4,80	4,502	4,36
LIC95%	1x10 <sup>4</sup>	3,90	3,90	3,90
LSC95%		5,15	5,15	5,15
valor probit		4,912	4,54	4,47
LIC95%	1x10 <sup>5</sup>	4,10	4,10	4,10
LSC95%		5,33	5,33	5,33
valor probit		5,33	4,85	4,72
LIC95%	1x10 <sup>6</sup>	4,29	4,29	4,29
LSC95%		5,52	5,52	5,52
valor probit		5,59	4,88	4,78
LIC95%	1x10 <sup>7</sup>	4,47	4,47	4,47
LSC95%		5,72	5,72	5,72
		<i>M. libera</i>	<i>M. ochracea</i>	<i>M. turbinata</i>
Función de mortalidad		$y = 3.621 + 0.279 \cdot \log_{10}$	$y = 3.906 + 0.143 \cdot \log_{10}$	$y = 3.7476 + 0.1518 \cdot \log_{10}$
R2		0,8	0,6	0,5
LD50		1x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>8</sup>	1x10 <sup>8</sup>

**CAPÍTULO IV: Identificación de moscas blancas nativas (Hemiptera: Aleyrodidae) y plantas hospederas asociadas, en el bosque tropical húmedo de la Reserva Biológica Tirimbina, Costa Rica.**

Resumen: La familia Aleyrodidae comprende 1556 especies, distribuidas en 161 géneros. Dentro de esta familia se encuentran al menos una docena de especies plaga, de amplia distribución y que causan grandes pérdidas económicas en cultivos. Existen varios reportes de moscas blancas silvestres, algunas neotropicales incluso aún no descritas, que han llegado a ser plagas en sitios donde han sido introducidas. A pesar de esta importancia agrícola, la sistemática de Aleyrodidae ha sido problemática y muy poco estudiada, en especial para Centroamérica. El objetivo de la investigación fue identificar especies de Aleyrodidae y sus respectivas especies de plantas hospederas, en el bosque tropical húmedo de Costa Rica. El sitio de muestreo fue la Reserva Biológica Tirimbina. Se encontraron moscas blancas en 38 especies (22 familias) de plantas distintas. Todas las plantas hospederas fueron identificadas. De la subfamilia Alyrodinae se identificaron 19 especies distintas (8 géneros). Por otro lado, se encontraron 2 especies de Aleurodicinae (2 géneros). *Paraleyrodes minei*, una especie potencialmente plaga fuera del Neotrópico, se reporta por primera vez para Costa Rica y en Rubiaceae. *Tetraleyrodes* fue el género con más especies. La sistemática de Aleyrodidae sigue siendo problemática para algunos grupos y estos requieren de mucho trabajo taxonómico, especialmente cuando se trata de un grupo de importancia agrícola, con casos donde especies Neotropicales desconocidas han sido introducidas en otras regiones y han causado daños en cultivos.

**Palabras clave:** Aleurodicinae, Aleyrodinae, morfología, insectos fitófagos, especies plaga.

La familia Aleyrodidae comprende 1556 especies, distribuidas en 161 géneros (Martin & Mound, 2007), de insectos conocidos como moscas blancas. Estos se clasifican dentro del orden Hemiptera y suborden Sternorrhyncha. Dentro de este suborden se encuentran cuatro grandes grupos de especies fitófagas, de los cuales Aleyrodoidea es el que presenta un menor número de especies descritas. No obstante, se estima que esta cifra podría ser

mayor de lo que se conoce (Martin & Mound, 2007). Esta escasez de especies podría estar reflejando la falta de trabajos taxonómicos para este grupo en el plano mundial, en comparación con Coccoidea (7300 especies), Aphidoidea (4800) y Psylloidea (2500) (Gullan & Martin, 2009).

Existe una gran carencia de estudios taxonómicos de Aleyrodidae para la región Neotropical. Además, otro de los problemas es que la mayoría de investigaciones y claves taxonómicas disponibles para moscas blancas, trabajan únicamente con especies que son plaga de cultivos (Malumphy et al., 2009; Martin, 1987), lo que podría causar dificultad al identificar especies silvestres, al ser insuficiente el material de referencia. Las revisiones taxonómicas de especies silvestres, especialmente en Centroamérica son prácticamente nulas, a excepción de un trabajo realizado para Belice (Martin, 2004, 2005). Fuera de esta publicación se pueden encontrar algunas claves para moscas blancas del sureste de Estados Unidos (Hodges & Evans, 2005) e información de especies plaga (Caballero, 1994; Hilje & Arboleda, 1993).

Mound & Halsey (1978) publicaron por primera vez un catálogo de especies de moscas blancas, donde se reportaron 1156 especies distribuidas en 126 géneros. Posteriormente se realizaron algunos trabajos que aportaron la descripción de una significativa cantidad de especies y géneros nuevos (Martin & Mound, 2007). Entre estos grandes trabajos se incluye la revisión de especies de Belice (Martin, 2004, 2005), que hasta la fecha, ha sido la revisión más detallada de Aleyrodidae de Centroamérica. Las demás publicaciones corresponden a trabajos fuera América; por ejemplo, en Australia (Martin 1999), Chad y Egipto (Bink-Moenen, 1983), India (Meganathan & David, 1994; Regu & David, 1993; Jesudasan & David, 1991), Israel (Bink-Moenen & Gerling, 1990), Papua Nueva Guinea (Martin, 1985), Sri Lanka (David, 1993), Sulawesi (Martin, 1988) y países del Mediterráneo (Bink-Moenen, 1992).

Existen otros trabajos más pequeños que han contribuido a la descripción de nuevas especies de Aleyrodidae. Estos trabajos se han llevado a cabo principalmente en Brasil (Hempel, 1922; Bondar, 1923, 1928), México (Baker, 1937; Sampson & Drews, 1941)

y la región del Caribe (Martin & Watson, 1998). En Martin (2004) se presenta una lista más completa de otros pequeños trabajos taxonómicos que se han realizado en América.

Los adultos Aleyrodidae se reconocen fácilmente por la presencia de cera blanca y de apariencia pulverulenta que recubre el cuerpo y las alas, en ambos sexos. De esta característica se deriva el nombre común de moscas blancas (Gullan & Martin, 2009). La estructura llamada orificio vasiforme es característica de toda la familia y está presente en todos los estadios ninfales y en los adultos. El orificio vasiforme es la abertura del ano en la posición dorsal y posterior del abdomen. Además del ano, esta estructura presenta una lígula, cuya función es remover las excretas líquidas, y un opérculo que cubierto total o parcialmente el orificio (Martin, 2004; Gill, 1990). Las características de estas estructuras son de gran importancia en la taxonomía del grupo.

Las hembras de moscas blancas colocan los huevos sobre las plantas, generalmente en el envés de las hojas. Estos, así como las ninfas, también pueden estar cubiertos de cera. Además, los huevos pueden ser colocados en patrones de distribución circular, arcos o en espiral, que podrían ser característicos de las especies (Martin, 2004).

Las moscas blancas tienen cuatro estadios ninfales y su ciclo de vida es un poco particular dentro de los insectos hemimetábolos. El cuarto y último estadio ninfal se le conoce como “pupario”, debido a que su morfología es significativamente distinta al adulto que emerge. Este estadio es sésil y no puede moverse de su sitio ni cuando las condiciones alimenticias se deterioran (Martin, 2004), ya que las ninfas también son capaces de alimentarse y probablemente dejan de hacerlo justo hasta el momento de la ecdisis a adulto (Gelman & Hu, 2007). La sistemática de Aleyrodidae actualmente es basada en las características del cuarto estadio ninfal y no sobre los adultos (Gullan & Martin, 2009; Martin, 2003); por eso es de importancia la preservación adecuada del pupario.

Las moscas blancas, tanto ninfas como adultos, se alimentan del floema de las plantas hospederas (Byrne & Bellows, 1991). En general son consideradas oligófagas, mientras que hay muy pocas especies monófagas (Gullan & Martin, 2009), pero se

desconoce las preferencias para la mayoría de las especies (Martin, 2004). Las especies más polífagas son las que están mejor documentadas, ya que suelen ser especies plaga (Gullan & Martin, 2009).

De todas las especies descritas, alrededor de una docena son consideradas plaga y las más importantes han sido *Bemisia tabaci* Gennadius y *Trialeurodes vaporariorum* Westwood. Esto debido a su amplia distribución y rango de plantas hospederas, y por causar grandes pérdidas económicas en cultivos, ya que transmiten más de 200 virus de plantas (De Barro, Liu, Boykin, & Dinsdale, 2011; Jones, 2003). Se ha reportado que muchas otras especies de Aleyrodidae, varias de origen Neotropical e incluso aún no descritas, se han introducido en otros sitios donde han surgido como plagas (Martin 2004). Esto justifica la importancia de realizar estudios con moscas blancas silvestres neotropicales, identificarlas, conocer su origen, plantas hospederas y otros aspectos de su biología, ya que podrían ser potenciales plagas.

El objetivo de la presente investigación es identificar especies de Aleyrodidae nativas y sus respectivas especies de plantas hospederas, al menor nivel taxonómico posible, en el bosque tropical húmedo de la Reserva Biológica Tirimbina (RBT), en Costa Rica. Estudios de este tipo con moscas blancas silvestres son prácticamente nulos para Costa Rica y en general, muy escasos para Suramérica, Centroamérica y el Caribe (Martin, 2004). Adicionalmente, otro objetivo de la investigación es procesar y fijar de forma adecuada ninfas de moscas blancas silvestres, con el fin de proveer material testigo en la colección entomológica del Museo de Zoología de la Universidad de Costa Rica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en la Reserva Biológica Tirimbina (RBT), en la Virgen de Sarapiquí (10°43'89" 84°09'1412"), en la provincia de Heredia. La reserva se localiza en las tierras bajas de la vertiente del Caribe, en la región noroeste de Costa Rica y se encuentra a una elevación aproximada de 187 m. La RBT comprende 395 hectáreas protegidas, donde predomina el bosque húmedo tropical (Holdridge, 1979). La

precipitación anual varía de los 3500 y 4000 mm, siendo la época más lluviosa durante los meses de octubre a enero y de mayo a agosto. La humedad relativa de la zona es de 80-90% y la temperatura puede variar entre los 20 y 30°C (INDER, 2018).

Las moscas blancas y sus respectivas plantas hospederas fueron recolectadas para su identificación durante las giras del 18 y 19 de febrero, 11 de mayo, 25 y 26 de noviembre de 2017 y del 02 al 03 de junio del 2018, en la RBT. Para ubicar moscas blancas se revisaron con lupa arbustos y árboles que se encontraban al borde del camino de los diferentes senderos del bosque y en los jardines de la reserva. Se recorrieron los senderos Ceiba, Cacaotal y Corteza, dedicando aproximadamente tres horas de búsqueda dentro de cada sendero. Durante el muestreo, se revisaron las hojas que se encontraban a una altura de 20-250 cm sobre el suelo, se volteaban ramas escogidas al azar, con varias hojas para observar el envés con lupa.

Debido a que las características que se utilizan para identificar especies de Aleyrodidae se basan en la morfología de las ninfas de cuarto instar, solamente se recolectaron ninfas durante las giras. Para esto, se tomaron muestras de las plantas que incluían las hojas en donde se observaron las ninfas y, además, varias hojas aledañas. Esas hojas posteriormente se revisaron bajo el estereoscopio en el laboratorio de Entomología de la Escuela de Biología, de la Universidad de Costa Rica. Los huevos y los adultos hallados en el campo no fueron preservados, pero algunos sí fueron fotografiados. Las plantas hospederas fueron identificadas a especie, pero algunos casos solamente a género o familia.

Las ninfas fueron preservadas en seco para conservar características de la cera. El montaje de las ninfas de moscas blancas silvestres en láminas se llevó a cabo en el laboratorio de Entomología. Antes de preservar los individuos, estos fueron observados y fotografiados bajo el estereoscopio para documentar el color, la forma del pupario, y la presencia, color y disposición de la cera sobre las ninfas.

Para el montaje se utilizaron los protocolos de Hodges & Evans (2005) y Evans (2007), con algunas modificaciones. Las ninfas se despegaron cuidadosamente de la hoja y

se colocaron en KOH al 10% entre 12 y 24 horas, dependiendo del color del pupario. Algunas especies de pupario mucho más oscuro, permanecieron más tiempo en el KOH 10% (hasta 48 horas máximo) debido a su difícil decoloración. Después, las ninfas aclaradas se sumergieron por 10 minutos en agua destilada, luego 15 minutos en alcohol al 70%, 5-15 min en fucsina ácida, 10 minutos en alcohol al 95% y, por último, 30 min en aceite de clavo. Finalmente, las ninfas se fijaron en las láminas con 2 gotas de bálsamo de Canadá y 1-2 gotas de xilol. Las láminas secaron a 35°C durante 3-4 semanas. En este proceso, las ninfas fueron manipuladas con un instrumento similar a un asa microbiológico (fabricado originalmente para tardígrados) para evitar daños.

Las ninfas preservadas se fotografiaron con una cámara digital para microscopio Omax 18.0 mp y con el programa Top View® fueron medidas. Para la identificación de los géneros de la subfamilia Aleyrodinae se utilizó la clave interactiva LUCID® por Dooley (2006) y además se revisaron las descripciones dadas por Martin (2005). Por otro lado, para los géneros de Aleurodicinae se utilizó la clave dicotómica de Martin (2004) y finalmente, para la identificación de especies del género *Paraleyrodes* también se utilizó una clave interactiva (Dooley, 2006). El material obtenido en el presente estudio será depositado en el Museo de Zoología de la Universidad de Costa Rica

## RESULTADOS

Se encontraron moscas blancas en 22 familias de plantas distintas dentro de los senderos y en los jardines de la RBT (Cuadro I). Todas las plantas hospederas fueron identificadas, en su mayoría, a especie y, en algunos casos, hasta género o familia. En total se hallaron especies de Aleyrodidae en 38 especies de plantas distintas, dentro de los senderos recorridos (Cuadro I).

En el laboratorio, se prepararon en total 118 láminas fijas de ninfas de cuarto instar, pero solamente alrededor de 80 láminas presentaron la calidad del montaje necesaria para la identificación (calidad de la tinción y estado del pupario, por ejemplo). Estas láminas se agruparon por morfotipos y por planta hospedera y se lograron



identificar, en la mayoría de casos, los géneros de Aleyrodinae (Cuadro II; Figs. 2-4) y de Aleurodicinae (Cuadro III; Fig. 1).

De la subfamilia Alyrodinae se identificaron individuos pertenecientes a ocho géneros y 19 especies distintas, mientras que cuatro morfotipos no se pudieron identificar más allá de subfamilia. Esto debido a que en algunos casos la calidad del montaje no fue suficiente, la presencia de parasitoides dificultó su identificación o porque no coincidieron con las características de las claves utilizadas. *Tetraleurodes* fue el género que más especies presentó en el presente trabajo. Por otro lado, únicamente se encontraron dos especies pertenecientes a la subfamilia Aleurodicinae, de dos géneros distintos (Cuadro III). Gracias a la existencia de una clave para el género *Paraleyrodes* (Dooley, 2006), este pudo ser identificado hasta especie. Las demás especies, de ambas subfamilias, se sugiere que deben ser comparadas con material preservado para corroborar las identificaciones.

## DISCUSIÓN

La mayoría de plantas que se reportan en la literatura como hospedaras de moscas blancas son angiospermas leñosas (Evans, 2007; Martin, 2004; Mound & Halsey, 1978). Sin embargo, existen algunas pocas especies que son más especialistas en plantas herbáceas, como pastos (Martin, 2004). Además, se han reportado moscas blancas en helechos (Martin & Camus, 2001) y monocotiledóneas, especialmente en palmas (Mound & Halsey, 1978). En la presente investigación, todas las especies de moscas blancas fueron encontradas en el envés de las hojas de angiospermas en su mayoría, pero también se hallaron especies de Aleyrodinae en helechos y monocotiledóneas.

Las moscas blancas suelen ser consideradas oligófagas, aunque la información sobre el rango completo de plantas de las cuales se alimentan es aún escasa (Martin, 2004), especialmente para especies silvestres. Las especies que son plagas tienen un mejor registro de plantas hospederas. En estos casos muchas suelen ser consideradas polífagas. Por ejemplo, mientras algunas especies de la subfamilia Aleurodicinae se alimentan exclusivamente de pastos (Martin, 2004), un caso opuesto sería *B. tabaci*, que

se reporta en unas 540 especies en 77 familias de plantas hospederas (Basu, 2019). El hecho de tener un amplio rango de plantas hospederas tiene un gran impacto en la capacidad de las moscas blancas para establecerse en una nueva región (Martin2004), ya que esta plasticidad les podría permitir establecerse exitosamente en el nuevo sitio.

Las especies polífagas, como las de *Bemisia* y *Trialeurodes*, además, se reporta que su morfología puede variar según las características de las hojas de las plantas hospederas (Gullan & Martin, 2009; Mound, 1963). En *B. tabaci*, por ejemplo, la quetotaxia del pupario podría estar relacionada con las vellosidades de la superficie de la hoja (Mound & Halsey, 1978; Mound, 1963). Esto hace que la identificación de las especies sea más compleja. En el presente estudio, solamente en uno de los morfotipos, identificado como *Aleurotrachelus* sp.2, se encontró una variación en la forma del pupario al comparar entre los diferentes individuos. Mientras que los puparios de Aleurodicinae parecen ser menos plásticos (Martin, 2004).

En la RBT se encontraron especies de ambas subfamilias, no obstante, las especies de Aleyrodinae fueron más comunes que Aleurodicinae. Esta última subfamilia comprende 20 géneros y 130 especies, esto corresponde cerca de un 8% de todas las especies de Aleyrodidae descritas. La gran mayoría de estas especies son nativas de la región Neotropical. Por otro lado, Aleyrodidae incluye 140 géneros descritos y presenta una distribución más amplia, siendo más escasas hacia las zonas templadas (Gullan & Martin, 2009).

Las primeras láminas preparadas (durante el proceso inicial de aprendizaje del montaje de esta investigación) se descartaron por no alcanzar la calidad para la identificación de las especies. Sin embargo, las pérdidas fueron mínimas y con el material obtenido se lograron identificar dos especies Aleurodicinae y 19 Aleyrodinae. Tomando en cuenta que Aleyrodidae es una familia con poco trabajo taxonómico para Centroamérica, en especial de especies silvestres, se recomienda que las especies halladas en la presente investigación sean posteriormente comparadas con material testigo para corroborar las identificaciones. Esto no se realizó previamente porque el material preservado en Costa

Rica es muy escaso o inexistente. Además, existe la posibilidad que entre las moscas blancas recolectadas haya especies nuevas por describir y especies que no se identificaron más allá de género, pero que podrían ser los primeros registros para Costa Rica.

Todos los diez géneros reportados acá han sido reportados también en Belice (Martin, 2004, 2005). Las especies de Aleurodicinae fueron halladas ambas en especies distintas de Rubiaceae. Son dos las especies de *Ceraleurodicus* reportadas en Belice (Martin 2004). *Ceraleurodicus keris* fue descrita por Martin (2004) con el holotipo de Belice en Flacourtiaceae. Sin embargo, esta especie también ha sido reportada para Costa Rica, pero en *Eupatorium* sp. (Asteraceae), en el CATIE, Turrialba (Martin, 2004).

En Belice hay reportadas ocho especies de *Paraleyrodes* (Martin 2004) de las 17 especies que se conocen en el mundo (Martin & Mound, 2007). *P. minei* Iccarino, conocida como la mosca blanca de anidación, es nativa de la región Neotropical, y se reportó como una plaga que causó daños moderados en plantaciones de cítricos en California, Siria y España. Esto antes de ser formalmente descrita de la población introducida en Siria. Esto refleja el hecho de que muchas Aleyrodidae son un grupo potencialmente amenazante como plagas de cultivos, lo y que justifica esta investigación y la importancia del trabajo taxonómico del grupo y la asociación con plantas hospederas. Esto debido a que se han reportado varios casos como este de *P. minei*, tanto para Aleurodicinae como Aleyrodinae, en donde ha surgido una plaga en un sitio y ha resultado ser una especie no descrita. Más ejemplos se reportan en Martin (2004).

A pesar de que el cuarto estadio ninfal es el que históricamente se utiliza para identificar las especies de Aleyrodidae, los adultos también pueden presentar caracteres útiles para la taxonomía del insecto, por ejemplo, la genitalia de los machos presenta caracteres más confiables para distinguir especies de *Paraleyrodes* (Martin, 2004). No obstante, en la presente investigación no se preservaron adultos, pero el pupario fue suficientemente útil para identificar *P. minei*. Al revisar la distribución de las especies según Dooley (2006) y Martin (2004), y el catálogo de plantas hospederas de Aleyrodidae del mundo (Evans, 2007), no se encontró un registro previo de la especie para Costa Rica,

por lo tanto, este es el primer reporte de *P. minei* para el país y el primer reporte alimentándose de una especie de Rubiaceae.

En cuanto a los géneros de la subfamilia Aleyrodinae, *Tetraleurodes* fue el género con más especies encontradas en Melastomataceae, Rubiaceae, Fabaceae y además en Araceae. Este también fue el género con más especies en el estudio de Martin (2005) para Belice, donde encontró seis descritas y 17 sin describir. En el presente estudio, las especies no pudieron ser identificadas más allá del género. *Tetraleurodes* es considerado un gran ensamblaje de 66 especies polifiléticas (Nakahara 1995). Dentro de este género se encuentra la especie *T. acacia* que también representa un ejemplo de especies nativas del Neotropico que fueron introducidas en otras regiones del mundo, como una amenaza de plaga, en este caso, de fabáceas de Filipinas y Hong Kong (Martin 2005). Además *T. perseae* descrita en California y Centroamérica, se encontró en Israel y Líbano en el 2002 (Martin 2005).

Cuatro especies de *Aleurovitreus* fueron encontradas en Fabaceae, Piperaceae y Araceae de la RBT. Varias especies sin describir y *A. risor* ya han sido reportadas en Piperaceae en Belice (Martin, 2005). *Aleurotrachelus* es un gran ensamblaje de especies polifiléticas. Actualmente comprende alrededor de 85 especies descritas que requieren de revisión (Martin, 2005). En el presente estudio se encontraron tres especies de este género en Urticaceae, Melastomataceae y Simaroubaceae. *Aleuroplatus* es otro ensamblaje polifilético de 80 especies que también requiere de revisión. De este género, en la RBT, se hallaron dos especies, una de estas las ninfas producen cera de color amarillo (Fig. 2.D).

En la RBT se encontró una especie para cada uno de los siguientes géneros: *Aleurothulus* en Araceae, *Bemisia* en Icacinaceae, *Singhiella* en Rubiaceae y *Trialeurodes* en un helecho. Dentro de *Bemisia* y de *Trialeurodes* es que se encuentran las dos especies de moscas blancas de mayor importancia agrícola en el mundo, como vectores de virus en plantas (Perring, Stansly, Liu, Smith, & Andreason, 2018). *Trialeurodes* comprende unas 60 especies que fueron revisadas por Russell (1948) y separadas en seis grupos.

Probablemente sea *Bemisia* el género de moscas blancas mejor estudiado, debido a que en este se encuentra *B. tabaci*. El género incluye unas 40 especies ampliamente distribuidas en todo el mundo, sin embargo, aún no se conoce su origen geográfico (Martin, 2005). *Bemisia* puede presentar una gran variabilidad intraespecífica ya que se sabe que las características de las hojas de las plantas hospederas pueden influenciar en su morfología (Mound & Halsey, 1978; Mound, 1963). Finalmente, dentro del género *Singhiella* se encuentra *S. citrii*, una plaga común en cítricos, que se cree que es originaria de Asia, pero ha expandido su rango de distribución y ha causado pérdidas en la región Neotropical (Martin, 2005).

Para futuras investigaciones se recomienda no solamente comparar las láminas preparadas con material testigo como ya fue sugerido, sino que también sería interesante realizar análisis moleculares para esclarecer también relaciones filogenéticas. Además, con la combinación de estas herramientas se podría estudiar géneros como *Trialeurodes*, que son considerados polifiléticos e inclusive algunas especies como *B. tabaci* son consideradas complejos de especies que no se distinguen morfológicamente. Adicionalmente, para futuros muestreos sería adecuado establecer una metodología de muestreo que sea más estándar y que permita estudiar moscas blancas de sitios que se puedan comparar entre ellos. Además, estudiar sitios que no se tomaron en cuenta en este estudio, como el dosel del bosque.

En conclusión, se identificaron, al menos a nivel de género, 21 morfotipos de Aleyrodidae silvestres de Costa Rica, y sus respectivas plantas hospederas fueron reportadas. Se reporta por primera vez *P. minei* en Costa Rica, una especie potencialmente plaga fuera del Neotrópico, y que por primera vez se reporta también en Rubiaceae. *Tetraleurodes* fue el género con más especies. Estas identificaciones fueron posibles gracias a la clave taxonómica de Dooley (2006) y el trabajo de Martin (2005, 2004) para Belice. Sin embargo, la sistemática de Aleyrodidae sigue siendo problemática para algunos grupos (como *Aleurotrachelus* y *Trialeurodes*) que aún requieren de mucho trabajo taxonómico. Así como también quedan muchos sitios para muestrear en Centroamérica, en especial cuando se trata de un grupo con especies de importancia

agrícola, con casos donde especies desconocidas Neotropicales han sido introducidas en otras regiones del mundo y han causado daños en cultivos en diferentes niveles.

Cuadro I: Familias y especies de plantas hospederas de Aleyrodidae encontradas en la RBT.

<b>FAMILIA</b>	<b>ESPECIE</b>
Acanthaceae	<i>Sanchezia parvibracteata</i> <i>Odontonema cuspidatum</i>
Annonaceae	<i>Anaxagorea crassipetala</i>
Araceae	<i>Philodendron grandipes</i> No id.
Arecaceae	<i>Asterogyne martiana</i> <i>Iriarteia</i> sp. <i>Reinhardtia gracilis</i> <i>Socratea</i> sp.
Bignoniaceae	<i>Jacaranda copaia</i>
Blechnaceae	<i>Salpichlaena volubilis</i>
Burseraceae	<i>Protium pittieri</i>
Clusiaceae	<i>Symphonia globulifera</i>
Fabaceae	<i>Inga</i> sp.
HELECHO	No id.
Icacinaceae	<i>Leretia cordata</i>
Melastomataceae	<i>Adelobotrys adscendens</i> <i>Henriettea tuberculosa</i> <i>Miconia affinis</i> <i>Miconia punctata</i> <i>Miconia variabilis</i> No id.
Moraceae	<i>Brosimum guianense</i> No id.
Myristicaceae	<i>Virola sebifera</i> o <i>V. koschnyi</i>
Myrtaceae	<i>Eugenia</i> sp.
Ochnaceae	<i>Cespedesia macrophylla</i>
Piperaceae	<i>Piper</i> sp1. <i>Piper</i> sp2. <i>Piper</i> sp3. <i>Piper</i> sp4.
Rubiaceae	<i>Psychotria buchtienii</i> <i>Psychotria</i> sp. No id.
Solanaceae	<i>Lycianthes sanctaeclarae</i>

Simaroubaceae	<i>Simarouba amara</i>
Urticaceae	<i>Urera baccifera</i>
Violaceae	<i>Globospermum sp.</i>

Cuadro II. Especies identificadas de la subfamilia Aleyrodinae, con sus respectivas plantas hospederas, encontrados en la RBT.

#LÁMINA	GÉNERO	ESPECIE	HOSPEDERO
20-23	<b><i>Aleuroplatus</i></b> Quaintance & Baker	<i>Aleuroplatus</i> cf. <i>Vinsonioides</i>	<i>Symphonia globulifera</i>
45		<i>Aleuroplatus</i> sp.	<i>Piper</i> sp.2
115-122	<b><i>Aleurotrachelus</i></b> Quaintance & Baker	<i>Aleurotrachelus</i> sp.	<i>Simarouba amara</i>
106 a 114		<i>Aleurotrachelus</i> sp.2	<i>Urera baccifera</i>
46,61- 65		<i>Aleurotrachelus</i> sp.3	<i>Miconia variabilis</i>
74 a 76	<b><i>Aleurotulus</i></b> Quaintance & Baker	<i>Aleurotulus</i> sp.	<i>Reinhardtia gracilis</i>
34 y 35	<b><i>Aleurovitreus</i></b> Martin	<i>Aleurovitreus</i> sp.1	<i>Inga</i> sp.
9 y 10		<i>Aleurovitreus</i> sp.2	<i>Piper</i> sp.
41 y 44		<i>Aleurovitreus</i> sp.3	<i>Piper</i> sp.2
59		<i>Aleurovitreus</i> sp.4	Araceae
136	<b><i>Bemisia</i></b> Quaintance & Baker	<i>Bemisia</i> sp.1	<i>Leretic cordata</i>
14	No id.	No id. (Fig. 3-O)	<i>Protium pittieri</i>
69-73		No id. (Fig. 3-P)	<i>S. amara</i>
105		No id. (Fig. 3-Q)	<i>Brosimum guianense</i>
135		No id. (Fig. 3-R)	<i>Psychotria buchtienii</i>
133 y 134	<b><i>Singhiella</i></b> Sampson	<i>Singhiella</i> sp.	<i>P. buchtienii</i>
123-132	<b><i>Tetraleurodes</i></b> Cockerell	<i>Tetraleurodes</i> sp.1	<i>M. variabilis</i>
103-104		<i>Tetraleurodes</i> Sp. 2	<i>P. buchtienii</i>
67 y 69		<i>Tetraleurodes</i> sp.3	Melastoma-taceae
42 y 43		<i>Tetraleurodes</i> sp.4	<i>Inga</i> sp.
38		<i>Tetraleurodes</i> sp.5	<i>Inga</i> sp.
60		<i>Tetraleurodes</i> sp.6	Araceae
95-100	<b><i>Trialeurodes</i></b> Cockerell	<i>Trialeurodes</i> sp.1	Helecho no id.

Cuadro III. Especies identificadas de la subfamilia Aleurodicinae, con sus respectivas plantas hospederas, encontrados en la RBT.

<b>#LÁMINA</b>	<b>GÉNERO</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>HOSPEDERO</b>
36	<i>Ceraleurodicus</i> Hempel	<i>Ceraleurodicus</i> c.f. <i>keris</i>	Rubiaceae
102	<i>Paraleyrodes</i> Quaintance	<i>Paraleyrodes</i> <i>minei</i>	<i>P. buchtienii</i>



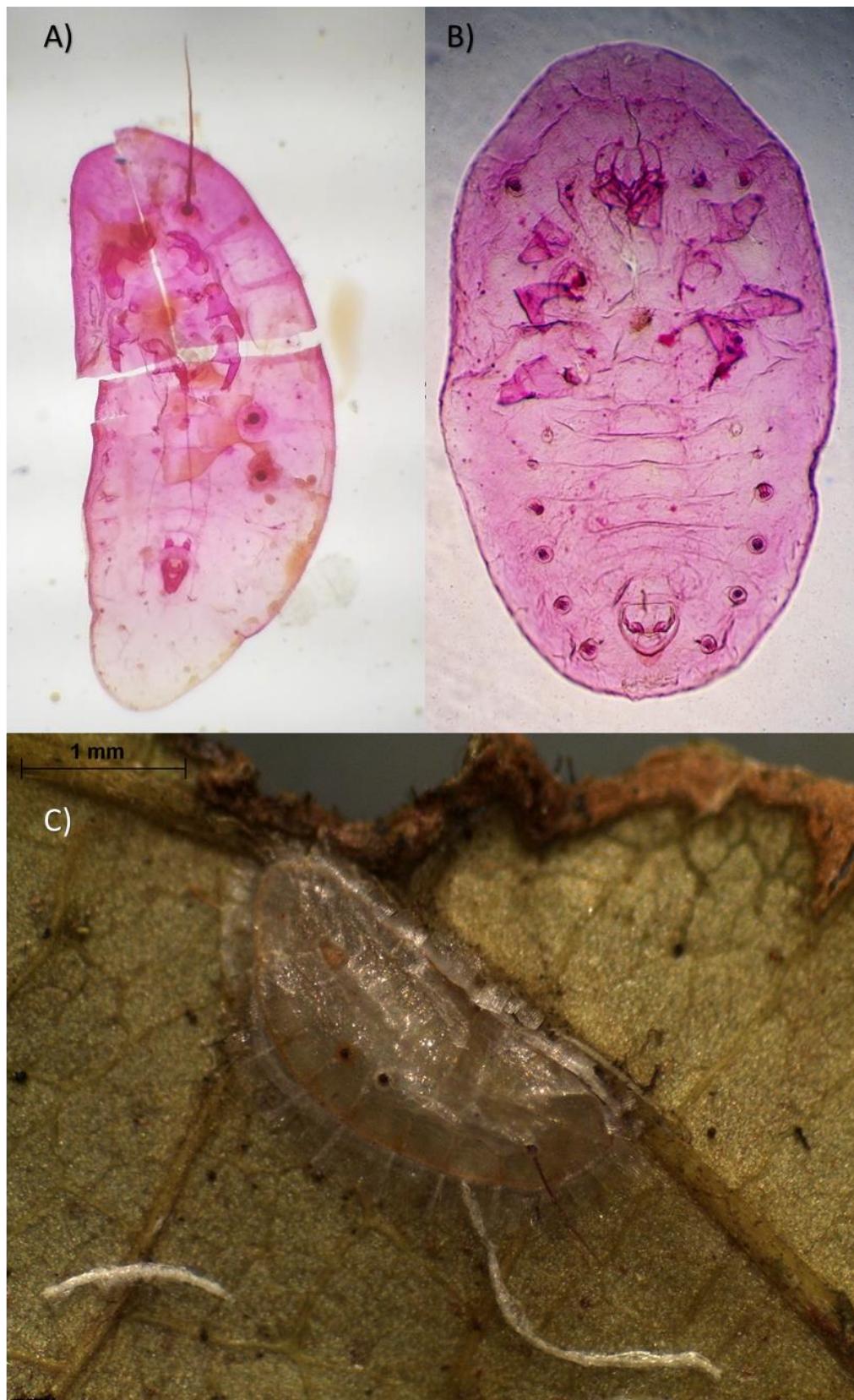


Figura 1. Aleurodicinae. A y C) Pupa de *Ceraleurodicus c.f. keris*. B) *Paraleyrodes minei*.

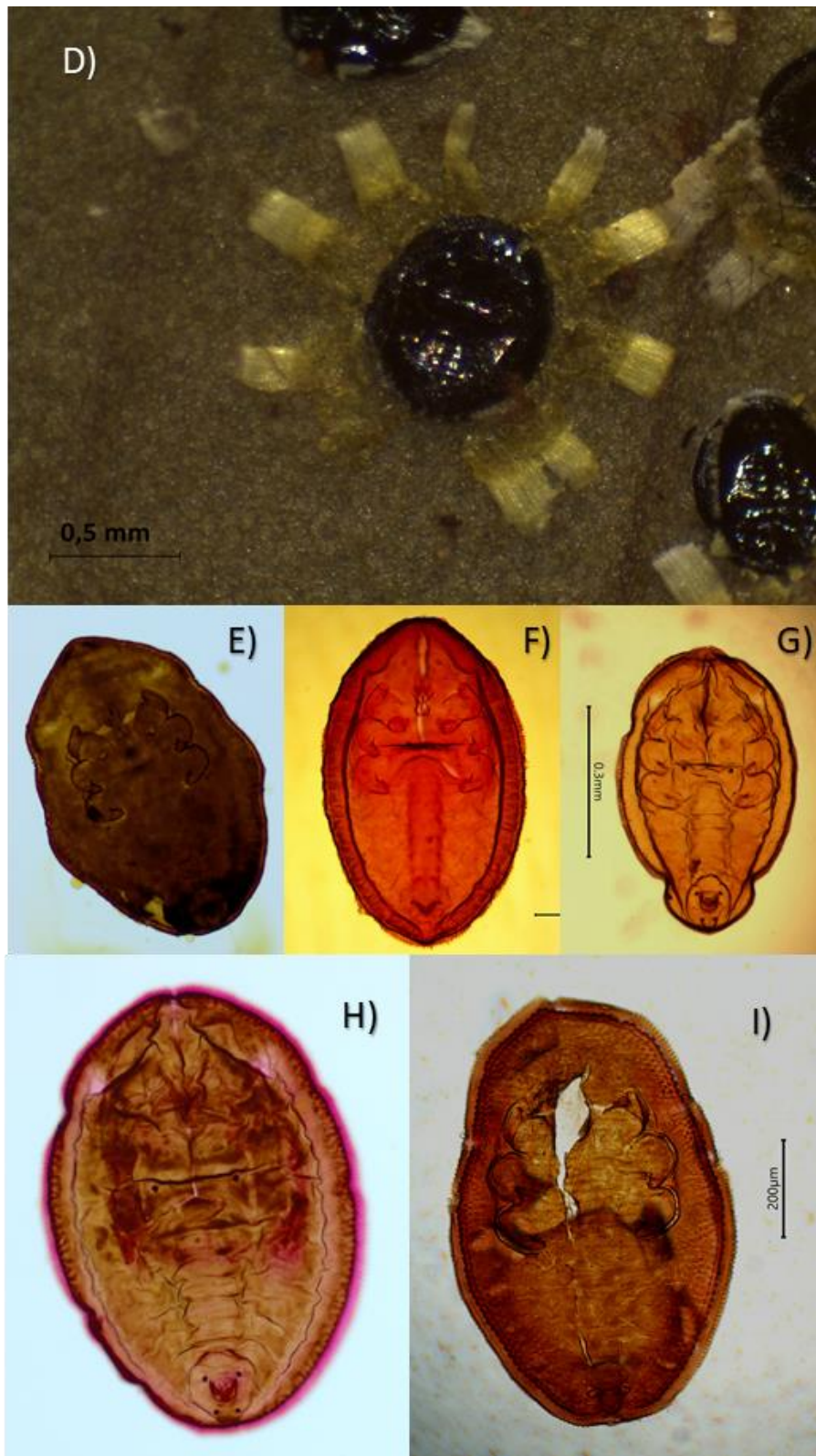


Fig 2. Aleyrodinae. D) *Aleuroplatus* c.f. *vinsonioides*. E) *Aleuroplatus* sp. F) *Aleurotrachelus* sp. G) *Aleurotrachelus* sp.2. H) *Aleurotrachelus* sp.3. I) *Aleurotulus* sp.



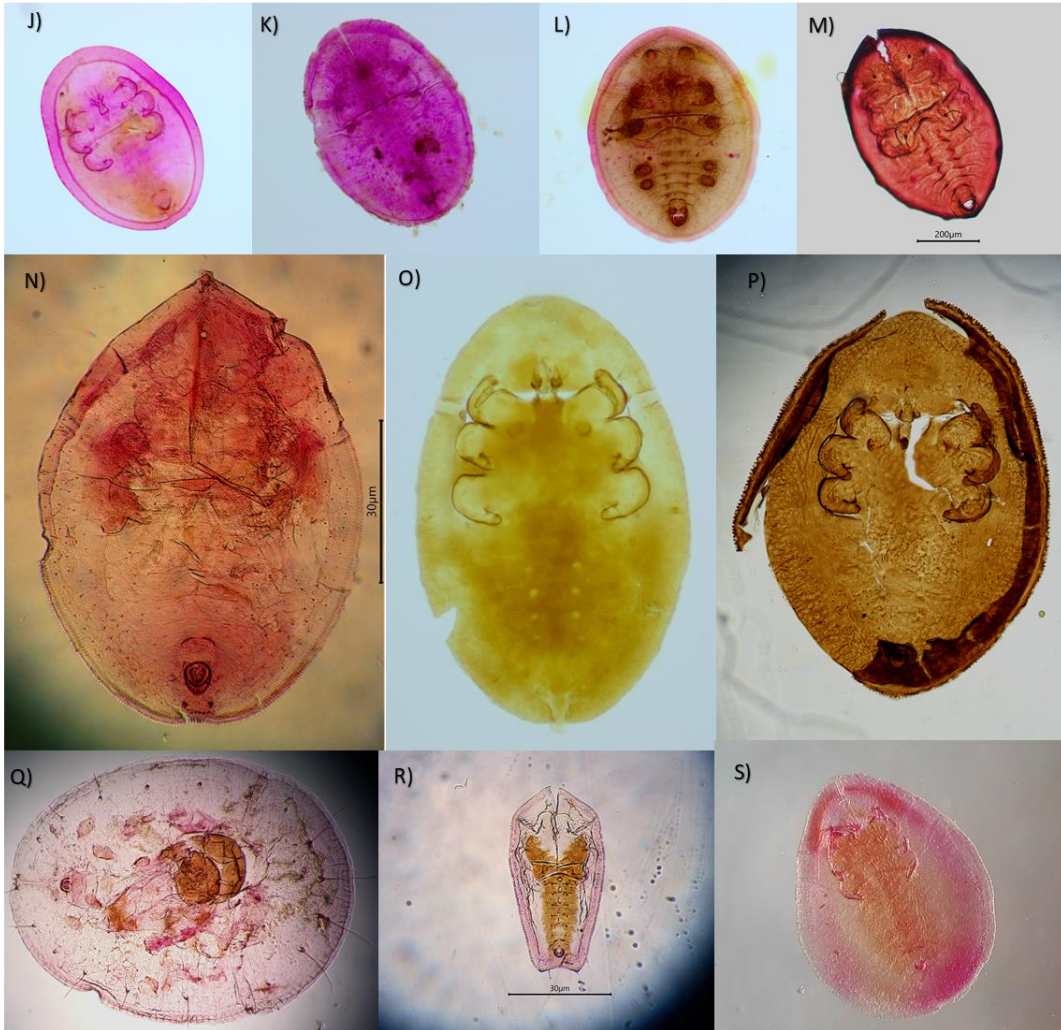


Fig 3. J) *Aleurovitreus* sp.1. K) *Aleurovitreus* sp.2. L) *Aleurovitreus* sp.3. M) *Aleurovitreus* sp.4. N) *Bemisia* sp.1. O y P) Géneros no identificados debido a la falta o daños en el pupario. Q) Género no identificado debido a la presencia de un parasitoide que dificultó ver algunas características. R) Género no identificado porque no calzó con las descripciones de las claves utilizadas. S) *Singhiella* sp.



Fig 4. T) *Tetraleurodes* sp.1. U) *Tetraleurodes* sp.2. V) *Tetraleurodes* sp.5. W) *Tetraleurodes* sp.3. X) *Tetraleurodes* sp.4. Y) *Tetraleurodes* sp.6. Z) *Trialeurodes* sp.1.

## CONCLUSIONES GENERALES

Se caracterizaron varias especies de Hypocreales, entomopatógenos de Aleyrodidae o Coccidae en la RBT, con potencial para ser cultivados y utilizadas en investigaciones como posibles biocontroladores. La identificación de estas especies fue posible por medio de la combinación de caracteres morfológicos y moleculares, en donde la región amplificadora 28S y la base UNITE, mostraron mejores resultados para la identificación de los aislamientos a nivel de especie. Sin embargo, se sugiere el uso de la combinación de todas las herramientas posibles para identificar especies.

Se reportaron y compararon las tasas de crecimiento y germinación de esporas de los aislamientos previos, correspondientes a especies que hasta la fecha han sido poco estudiadas. Las tasas de crecimiento dependieron de la especie de los hongos y de la temperatura. Las especies de hongos con mayores tasas de crecimiento también presentaron los mayores porcentajes de germinación, para todas las temperaturas evaluadas. La temperatura óptima para el crecimiento varió según la especie del hongo. Sin embargo, se deben evaluar más factores que influyan en el desarrollo de los hongos en futuras investigaciones.

Además, los hongos evaluados mostraron una alta susceptibilidad a la exposición de los fungicidas azoxystrobina y clorotalonil, especialmente en cuanto a la germinación de esporas. Esta información debe ser considerada, para efectos de uso adecuado dentro de programas que combinen el control biológico y el control químico.

Las especies de hongos nativos, evaluadas en esta investigación, no tuvieron efecto sobre los huevos de *B. tabaci*. Sin embargo, tres especies demostraron ser patogénicas contra ninfas del cuarto estadio de *B. tabaci* en condiciones de laboratorio: *M. libera*, *M. ochracea* y *M. turbinata*. Entre estas, el aislamiento más virulento resultó ser *M. libera*, la cual causó la mayor mortalidad de las ninfas y posee una  $LC_{50}=1 \times 10^5$  conidios  $ml^{-1}$ , mientras que para las otras dos especies fue de  $LC_{50}=1 \times 10^8$  conidios  $ml^{-1}$ , esto quiere decir que se requiere de una concentración de esporas mayor a la evaluada en este estudio para causar el 50% de la mortalidad de las ninfas. Este estudio, muestra ensayos

preliminares en laboratorio, que brindan información sobre aspectos del ciclo de infección de hongos silvestres, que eran poco o nada estudiados previamente. Conocer esta información permitiría la selección de las cepas más virulentas para ensayos posteriores en invernaderos.

Finalmente, se identificaron 21 morfotipos de Aleyrodidae nativos de Costa Rica, a nivel de género, y sus respectivas especies de plantas hospederas fueron reportadas. Se reporta por primera vez *P. minei* en Costa Rica, una especie potencialmente plaga fuera del Neotrópico, y que por primera vez se reporta también alimentándose en una especie de Rubiaceae. *Tetraleurodes* fue el género con más especies. Sin embargo, la sistemática de Aleyrodidae sigue siendo problemática para algunos grupos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarenkov, K., Nilsson, R. H., Larsson, K. H., Alexander, I. J., Eberhardt, U., Erland,... & Kõljalg, U. (2010). The UNITE database for molecular identification of fungi – recent updates and future perspectives. *New Phytologist*, 186(2), 281-285.
- Abreu, L. M., Moreira, G. M., Ferreira, D., Rodrigues-Filho, E. & Pfenning, L. H. (2014). Diversity of *Clonostachys* species assessed by molecular phylogenetics and MALDI TOF mass spectrometry. *Fungal Biology*, 118(12), 1004-1012.
- Altre, J. A., Vandenberg, J. D. & Cantone, F. A. (1999). Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73, 332-338.
- Amador, R. & Hilje, L. (1993). Efecto de coberturas vivas e inertes sobre la atracción de la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius) al cultivo del tomate. *Manejo Integrado de Plagas*, 29, 14-21.
- Ansari M., Moraiet M. & Ahmad S. (2014). Insecticides: impact on the environment and human health. En A. Malik, E. Grohmann, R. Akhtar (Eds.). *Environmental Deterioration and Human Health* (pp. 99-123). Dordrecht, Springer.
- Bajwa, G. A., Abood, F. & Ibrahim, Y. (2016). Age-specific response of *Atteva sciodoxa* Meyrick (Lepidoptera: Yponomeutidae) to *Beauveria bassiana* (Bals.). *Sarhad Journal of Agriculture* 32, 1-8.
- Baker, J. M. (1937). Notes on some mexican Aleyrodidae. *Anales del Instituto de Biología, Universidad de México*, 8, 599-629.
- Barboza, N., Blanco-Meneses, M., Hallwass, M., Moriones, E., & Inoue-Nagata, A. K. (2014). First report of Tomato yellow leaf curl virus in tomato in Costa Rica. *Plant Disease*, 98(5), 699-699.
- Basu, A. N. (2019). *Bemisia tabaci* (Gennadius): crop pest and the principal whitefly vector of plant viruses. CRC Press.

- Baverstock, J., Roy, H. E., & Pell, J. K. (2009). Entomopathogenic fungi and insect behaviour: from unsuspecting hosts to targeted vectors. En Roy et al. (Eds.), *The ecology of fungal entomopathogens* (pp. 89-102). Dordrecht: Springer.
- Berger, E.W. (1921). Natural enemies of scale insects and whiteflies in Florida. *Florida State Plant Board Quarterly Bulletin*, 5, 141-154
- Bichoff, J. F., Rehner, S. A. & Humber, R. A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101, 512-530.
- Bink-Moenen, R. M. (1983). Revision of the african whiteflies (Aleyrodidae), mainly based on a collection from Tchad. *Monografieën van de Nederlandse Entomologische Vereniging*, 10, 1-211.
- Bink-Moenen, R. M. (1992). Whitefly from mediterranean evergreen oaks (Homoptera: Aleyrodidae). *Systematic Entomology*, 17(1), 21-40.
- Bink-Moenen, R. M and D. Gerling. (1990). Aleyrodidae of Israel. *Bollettino Del Laboratorio Di Entomologia Agraria Filippo Silvestri*, 47,3-49.
- Bondar, G. (1923). *Aleyrodideos do Brazil*. Official State Publisher. Bahia.
- Bondar, G. (1928). Aleyrodideos do Brazil. (2a contribuição). *Boletim do Laboratorio de Pathologia Vegetal do Estado da Bahia*, 5, 1-37.
- Booth, C. (1971). *The genus Fusarium*. Kew, UK: International Mycological Institute.
- Borisade, O. A., & Magan, N. (2014). Growth and sporulation of entomopathogenic *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria farinosa* and *Isaria fumosorosea* strains in relation to water activity and temperature interactions. *Biocontrol Science and Technology*, 24(9), 999-1011.
- Boykin, L. M., Bell, C. D., Evans, G., Small, I., & De Barro, P. J. (2013). Is agriculture driving the diversification of the *Bemisia tabaci* species complex (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodidae)? Dating, diversification and biogeographic evidence revealed. *BMC Evolutionary Biology*, 13(228), 1-10.



- Buntin, D. G., Gilbertz, D. A., & Oetting, R. D. (1993). Chlorophyll loss and gas exchange in tomato leaves after feeding injury by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of economic entomology*, 86(2), 517-522.
- Butt, T. M., & Goettel, M. S. (2000). Bioassays of entomogenous fungi. En A. Navon & K. R. S. Ascher (Eds.), *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes* (pp. 141-195) CABI International.
- Butt, T. M., Jackson, C. W., & Magan, N. (2001). Introduction-Fungal Biological Control Agents. En Butt, T. M., Jackson, C. W. & Magan, N. (Eds.). *Fungi as Biocontrol Agents. Progress, Problems and Potential* (pp.1-8). Wallingford, Inglaterra: CABI Publishing.
- Butt, T. M., Wang, C., Shah, F. A., & Hall, R. (2006). Degeneration of entomogenous fungi. En J. Eilenberg & H. M. T. Hokkanen (Eds.), *An ecological and societal approach to biological control* (pp. 213-226). Dordrecht, Springer.
- Byrne, D. N., & Bellows Jr, T. S. (1991). Whitefly biology. *Annual Review of Entomology*, 36(1), 431-457.
- Caballero, R. (1994). Clave de campo para inmaduros de moscas blancas de Centroamérica (Homoptera: Aleyrodidae). *Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras*, 35(1), 47-50.
- Carruthers, R. I. & Soper, R. S. (1987). Fungal diseases. En J. Fuxa & Y. Tanada (Eds.), *Epizootiology of insect diseases* (pp. 357-416). New York, John Wiley and Sons Inc.
- Cave, R.D. (1996). Parasitoides y depredadores. En L. Hilje (Ed.). *Metodologías para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus* (pp.69-76). Turrialba, Costa Rica: CATIE.
- Chaverri, P., Liu, M. & Hodge, K. T. (2008). A monograph of the entomopathogenic genera *Hypocrella*, *Moelleriella* and *Samuelsia* gen. nov. (Ascomycota, Hypocreales, Clavicipitaceae), and their aschersonia-like anamorphs in the Neotropics. *Studies in Mycology*, 60, 1-66.
- Chaverri, P., & Vilchez, B. (2006). Hypocrealean (Hypocreales, Ascomycota) fungal diversity in different stages of tropical forest succession in Costa Rica 1. *Biotropica*, 38(4), 531-543.

- Clark R. A., Casagrande R. A., Wallace D. B. (1982). Influence of pesticides on *Beauveria bassiana*, a pathogen of the Colorado potato beetle. *Environmental Entomology* 11(1), 67–70.
- Cubillo, D. & Hilje, L. (1996). Repelentes. En L. Hilje (Ed.). *Metodologías para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus* (pp.77-83). Turrialba, Costa Rica: CATIE.
- Da Silva, R. Z., Neves, P. M. O. J. (2005). Techniques and parameters used in compatibility tests between *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill and in vitro phytosanitary products. *Pest Management Science*, 61(7), 667-674.
- Dale, N. S. & Shinde, S. S. (2017). Growth, sporulation and biomass production of native entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin on a suitable medium. *International Journal of Entomology Research* 2, 93-98.
- Dângelo, R. A. C., Michereff-Filho, M., Campos, M. R., Da Silva, P. S., & Guedes, R. N. C. (2018). Insecticide resistance and control failure likelihood of the whitefly *Bemisia tabaci* (MEAM1; B biotype): a Neotropical scenario. *Annals of Applied Biology*, 172(1), 88-99.
- Dar, S. A., Rather, B. A., & Kandoo, A. A. (2017). Insect pest management by entomopathogenic fungi. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5, 1185-1190.
- David, B. V. (1993). The whitefly of Sri Lanka (Homoptera: Aleyrodidae). *Frederick Institute of Plant Protection & Technology, Entomology Series*, 1-32.
- De Barro, P. J., Liu, S. S., Boykin, L. M. & Dinsdale, A. B. (2011). *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annual Review of Entomology*, 56: 1-19.
- Dooley, J. W. (2006). Whitefly Fauna of the World on Lucid Central. Recuperado de <https://keys.lucidcentral.org/keys/v3/whitefly/Aleyrodid%20Pupal%20Key%20to%20the%20Genera.html>
- Dooley, J. W. (2006). *Paraleyrodes*: a key to species on Lucid Central. Recuperado de <https://keys.lucidcentral.org/keys/v3/whitefly/Aleyrodid%20Pupal%20Key%20to%20the%20Paraleyrodes%20spp.html>

- Dorta, B., Ertola, R. J. & Arcas, J. (1994). Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-substrate fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 19, 434-439.
- El-Sayed, G. N., Coudron, T. A., Ignoffo, C. M. & Riba, G. (1989). Chitinolytic activity and virulence associated with native and mutant isolates of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 54: 394-403.
- El-Sayed, G. N., Ignoffo, C. M., Leathers, T. D. & Gupta, S. C. (1993). Effects of cuticle source and concentration on expression of hydrolytic enzymes by an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. *Mycopathologia* 122, 149-152.
- Evans, G. A. (2007). *The whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of the world and their host plants and natural enemies*. USA, USDA/Animal Plant Health Inspection Service (APHIS).
- Evans, H. C. (1988). Coevolution of entomogenous fungi and their insect hosts. En K. A. Pirozynski & D. L. Hawksworth (Eds). *Coevolution of fungi with plants and animals* (pp. 149-171). Nueva York, EEUU: Academic Press.
- Evans H. C. & Hywel-Jones, N. (1990). Aspects of the genera *Hypocrella* and *Aschersonia* as pathogens of coccids and whiteflies. En: *Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control 20-24 ago. 1990* (pp. 111-115). Adelaide, Australia: Society for Invertebrate Pathology.
- Faria, M., Lopes, R. B., Souza, D. A., Wraight, S. P. (2015). Conidial vigor vs. viability as predictors of virulence of entomopathogenic fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 125, 68-72.
- Faria, M. & Wraight, S. P. (2001). Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. *Crop Protection*, 20, 767-778.
- Faria, M. R. & Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control* 43, 237-256.
- Fernandes, E. K. K., Costa, G. L., Moraes, Á. M. L., Zahner, V., & Bittencourt, V. R. E. P. (2006). Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria*

- bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. *Parasitology Research*, 98(4), 324-332.
- Fransen, J. J., Winkelman, K. & Lenteren, J. C. (1987). The differential mortality at various life stages of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae), by infection with the fungus *Aschersonia aleyrodis* (Deuteromycotina: Coelomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology* 50: 158-165.
- Gelman, D. B. & Hu, J. S. (2007). Critical feeding periods for last instar nymphal and pharate adults of the whiteflies, *Trialeurodes vaporariorum* and *Bemisia tabaci*. *Journal of Insect Science*, 7(33), 1-10.
- Gill, R.J. (1990). The morphology of whiteflies. In: Gerling, D. (Ed.) *Whiteflies, Their Bionomics, Pest Status and Management* (pp. 13–46) Intercept, Andover.
- Gilbertson, R. L., Batuman, O., Webster, C. G., & Adkins, S. (2015). Role of the insect supervectors *Bemisia tabaci* and *Frankliniella occidentalis* in the emergence and global spread of plant viruses. *Annual Review of Virology*, 2, 67-93.
- Gräfenhan, T., Schroers, H. J., Nirenberg, H. I., & Seifert, K. A. (2011). An overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of nectriaceous fungi in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella*, and *Volutella*. *Studies in Mycology*, 68, 79-113.
- Griffin, D. H. (1994). *Fungal physiology*. New York: Wiley-Liss.
- Gullan, P. J., & Martin, J. H. (2009). Sternorrhyncha: (jumping plant-lice, whiteflies, aphids, and scale insects). En V. H. Resh & R. T. Cardé (Eds.), *Encyclopedia of Insects* (pp. 957-967). UK, Academic Press.
- Hajek, A. E. & Meyling, N. V. (2018). Fungi. En A.E. Hajek & D.I. Shaphiro-Ilan (Eds.). *Ecology of Invertebrate Diseases* (pp. 327-378). John Wiley & sons.
- Hall, R. A. (1981). The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. En H. D. Burges (Ed.). *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980* (pp. 483-498). Londres, UK, Academic Press.
- Hall, R. A. (1984). Epizootic potential for aphids of different isolates of the fungus *Verticillium lecanii*. *Entomophaga* 29, 311-321.

- Hempel, A. (1922). Algunas especies novas de hemipteros da familia Aleyrodidae. *Notas Preliminares editadas pela redacção da Museu Paulista*, 2, 3-10.
- Hilje, L. (2002). Manejo de *Bemisia tabaci* en América Central y el Caribe: la experiencia de un decenio. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 65, 102-108.
- Hilje, L. (2003). Estatus del manejo de *Bemisia tabaci* en América Latina y el Caribe: ocho preguntas pertinentes. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 70, 78-89.
- Hilje, L. (2008). En busca de coberturas vivas para el manejo de *Bemisia tabaci* como vector de virus en tomate. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 79-80, 98-107.
- Hilje, L., & Arboleda, O. (1993). Las moscas blancas:(Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe. *CATIE, Serie técnica, Informe técnico*, 205, 1-22.
- Hilje, L. & Morales, F. J. (2008). Whitefly bioecology and management in Latin American. En: J. L. Capinera (Ed). *Encyclopedia of Entomology* (pp. 4251-4260). Universidad de Florida, EEUU: Springer Science.
- Hodges, G. S., & Evans, G. A. (2005). An identification guide to the whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of the Southeastern United States. *Florida Entomologist*, 88(4), 518-534.
- Holdridge, L. R. (1979). *Life zone ecology*. Libros y Materiales Educativos (IICA). San Jose, Costa Rica, Tropical Science Center.
- Hu, X., Xiao, G., Zheng, P., Shang, Y., Su, Y., Zhang, X., ... & Wang, C. (2014). Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen speciation and host adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(47), 16796-16801.
- Humber, R. A. (1997). Fungi: identification. En L. A. Lacey (Ed.). *Manual of techniques in insect pathology* (pp. 153–185). Academic Press.
- Hyel-Jones, N., Evans, H., & Jun, Y. (1997). A re-evaluation of the leafhopper pathogen *Torribiella hemipterigena*, its anamorph *Verticillium hemipterigenum* and *V. pseudohemipterigenum* sp. nov. *Mycological Research*, 101(10), 1242-1246.
- Ibrahim, Y. B. & Low, W. (1993). Potential of mass-production and field efficacy of isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces*

- fumosoroseus* against *Plutella xylostella*. *International Journal of Pest Management* 39 (3), 288-292.
- Ibrahim, Y. B., Butt, T. M. & Jenkinson, P. (2002). Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research* 106 (6), 705-715.
- Ibrahim, Y. B., Lim, T. K., Tang M. K. & Ten H. M. (1993). Influence of temperature, pH and selected growth media on germination, growth and sporulation of *Aschersonia placenta* and *Hypocrella raciborskii*. *Biocontrol Science and Technology* 3, 55-61.
- Inbar, M & Gerling, D. (2008). Plant-mediated interactions between whiteflies, herbivores, and natural enemies. *Annual Review of Entomology*, 53, 431-438.
- INDER. (2014). *Caracterización del territorio de Sarapiquí*. Recuperado de <https://www.inder.go.cr/sarapiqui/Caracterizacion-Territorio-Sarapiqui.pdf>
- InfoStat. (2017). InfoStat versión 2008. Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.
- Inglis, G. D., Enkerli, J. & Goettel, M. S. (2012). Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi. En L. A. Lacey (Ed.), *Manual of techniques in invertebrate pathology* (pp. 18-53). Londres, UK, Academic Press.
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M., Strasser, H., Jackson, J., & Magan, N. (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. En T. M. Butt, C. Jackson & N. Magan (Eds.). *Fungi as biocontrol agents: progress problems and potential* (pp. 23-69). Oxfordshire, CABI Publishing.
- Jackson, M. A. & Schisler, D. A. (1992). The composition and attributes of *Colletotrichum truncatum* spores are altered by the nutritional environment. *Applied Environmental Microbiology* 58, 2260-2265.
- Jaronski, S. T. (2010). Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *Biocontrol* 55, 159-185.
- Jaronski, S. T. (2014). Mass production of entomopathogenic fungi: state of the art. En J. A. Morales-Ramos, M. G. Rojas, D. J. Shapiro-Ilan (Eds.), *Mass production of beneficial organisms* (pp.357-413). UK, Elsevier Inc.

- Jaronski, S. T. & Mascari G. M. (2017). Mass production of fungal entomopathogens. En L. A. Lacey (Ed.), (pp. 141-156). *Microbial control of insect and mite pests*. UK, Elsevier Inc.
- Jesudasan, R. W. A. & David, B. V. (1991). Taxonomic studies on indian Aleyrodidae (Insecta: Homoptera). *Oriental Insects*, 25(1), 231-434.
- Jiménez, M. P., Blanco, M., & Guillén, C. (2019). Las cochinillas harinosas (Hemiptera: Pseudococcidae) y su impacto en el cultivo de Musáceas. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1), 281–298.
- Jones, D. R. (2003). Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology*, 109(3), 195-219.
- Kepler, R. M., Humber R. A., Bischoff, J. F. & Rehner S. A. (2014). Clarification of generic and species boundaries of *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia*, 106, 811-829.
- Khan, I., & Wan, F. (2015). Life history of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) biotype B on tomato and cotton host plants. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 3(3), 117-121.
- Klingen, I. & Haukeland, S. (2006). The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. En J. Eilenberg & H. Hokkanen (Eds.). *An ecological and societal approach to biological control* (pp.145-211). Dordrecht, Springer.
- Kouassi, M., Coderre, D. & Todorova, S. I. (2003). Effects of the timing of applications on the incompatibility of three fungicides and one isolate of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina). *Journal of Applied Entomology* 127, 421-426.
- Landa, Z., & Jiranova, R. (1988). A laboratory improvement of entomopathogenic fungi and use of selected strains in IPM programme for greenhouse cucumbers. *Annual Report, Agriculture, University Ceske Budejovice*, pp. 95.

- Lazzarini, G. M. J., Rocha L. F. N., Luz, C. (2006). Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. *Mycological Research*, 110(4), 485-492.
- Malumphy, C., Walsh, K., Suarez, M. B., Collins, D. W., & Boonham, N. (2009). Whitefly species ( Hemiptera : Aleyrodidae ) commonly intercepted in quarantine. *Zootaxa*, 2118, 1-29.
- Marilene, F., & Vendramim, J. D. (2002). Development of *Bemisia tabaci* (Gennadius,1889) biotype B on *Lycopersicon* spp. genotypes. *Scientia Agricola*, 59(4), 665-669.
- Martin, J. H. (1985). The whitefly of New Guinea. *Bulletin of the British Museum (Natural History)*, 50(3), 303-351.
- Martin, J. H. (1987). An identification guide to common whitefly pest species of the world (homopt aleyrodidae). *Tropical Pest Management*, 33(4), 298-322.
- Martin, J. H. (1988). Whitefly of northern Sulawesi, including new species from clove and avocado (Homoptera: Aleyrodidae). *Indo-Malayan Zoology*, 5, 57-85.
- Martin, J. H. (2003). Whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) - their systematic history and the resulting problems of conventional taxonomy, with special reference to descriptions of *Aleyrodes proletella* (Linnaeus, 1758) and *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889). *Entomologist's Gazette*, 54, 125-136.
- Martin, J. H. (2004). Whiteflies of Belize (Hemiptera: Aleyrodidae). Part 1- Introduction and account of the subfamily Aleurodicinae Quaintance & Bake. *Zootaxa*, 681, 101-119.
- Martin, J. H. (2005). Whiteflies of Belize (Hemiptera: Aleyrodidae), part 2 Aleyrodinae. *Zootaxa*, 1098, 1-116.
- Martin, J. H., & Camus, J. M. (2001). Whiteflies (Sternorrhyncha, Aleyrodidae) colonising ferns (Pteridophyta: Filicopsida), with descriptions of two new *Trialeurodes* and one new *Metabemisia* species from south-east Asia. *Zootaxa*, 2(1), 1-19.
- Martin, J. H., & Mound, L. A. (2007). An annotated check list of the world's whiteflies.



*Zootaxa*, 1492, 1-84.

- Martin, J. H. & Polaszek, A. P. (1999). A new genus of Neotropical whitefly, secreting blue-iridescent wax (Sternorrhyncha, Aleyrodidae, Aleurodicinae), and its parasitoids (Hymenoptera, Aphelinidae). *Journal of Natural History*, 33, 1545-1559.
- Martin, J.H. & Watson, G. W. (1998) Emergence of a third pest species of *Aleurodicus douglas* (Homoptera: Aleyrodidae) in the Caribbean. *Journal of Natural History*, 32, 85-98.
- Mascarin, G. M., Jackson, M. A., Kobori, N. N., Behle, R. W., Delalibera Jr., I., (2015). Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. *Journal of Invertebrate Pathology*, 127, 11-20.
- Mascarin, G., Kobori, N. N., Dias-Quintela, E. & Delalibera Jr., I. (2013). The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Homoptera: Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate fermentation. *Biological Control*, 66, 209-218.
- Meekes, E. T. M. (2001). *Entomopathogenic fungi against whiteflies: tritrophic interactions between Aschersonia species, Trialeurodes vaporariorum and Bemisia argentifolii, and glasshouse crops* (Tesis doctoral). Wageningen University, Wageningen, Holanda.
- Meekes, E. T. M, Fransen, J. J. & van Lenteren, J. C. (2002). Pathogenicity of *Aschersonia* spp. against whiteflies *Bemisia argentifolii* and *Trialeurodes vaporariorum*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 81, 1-11.
- Meekes, E. T. M., van Voorst, S., Joosten, N. N., Fransen, J. J., van Lenteren, J. C. (2000). Persistence of the fungal whitefly pathogen, *Aschersonia aleyrodinis*, on three different plant species. *Mycological Research* 104(10), 1234-1240.
- Meganathan, P., & David, B. V. (1994). Aleyrodidae fauna (Aleyrodidae: Homoptera) of Silent Valley, a tropical evergreen rain-forest, Kerala, India. *Fippat Entomology*, 5, 1-83.

- Mehta, P., Wyman, J. A., Nakhla, M. K., & Maxwell, D. P. (1994). Transmission of tomato yellow leaf curl *Geminivirus* by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology*, 87(5), 1291-1297.
- Mohammadbeigi, A. (2013). Virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) passaged through artificial media and an insect host *Uvarovistia zebra* (Orthoptera : Tettigoniidae ). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 6, 1147-1152.
- Moriones, E., & Navas-Castillo, J. (2000). Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research*, 71(1-2), 123-134.
- Mound, L. A. (1963). Host-correlated variation in *Bemisia tabaci* (Gennadius)(Homoptera: Aleyrodidae). *Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology*, 38 (10-12), 171-180.
- Mound, L. A., & Halsey, S. H. (1978). *Whitefly of the world. A systematic catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with host plant and natural enemy data*. Londres, UK, John Wiley and Sons.
- Nahar, P. B., Kulkarni, S. A., Kulye, M. S., Chavan, S. B., Kulkarni, G., Rajendran, A., Yadav, P. D., Shouche, Y. & Deshpande, M. V. (2008). Effect of repeated in vitro sub culturing on the virulence of *Metarhizium anisopliae* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Science and Technology* 18, 337-355.
- Nakahara, S. (1995). Taxonomic studies of the genus *Tetraleurodes* (Homoptera: Aleyrodidae). *Insecta Mundi*, 9, 105-150.
- Neves, P. M. O. J., Hirose, E., Tchujo, P. T. & Moino, A. (2001). Compatibility of entomopathogenic fungi with Neonicotinoid insecticides. *Neotropical Entomology*, 30, 263-268.
- Nicholls, C. I. (2008). *Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico*. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.
- Osborne, L. S. & Z. Landa. (1992). Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *The Florida Entomologist*, 75(4), 456-471.

- Pelizza, S. A., Schalamuk, S., Simón, M. R., Stenglein, S. A., Pacheco-Marino, S. G., Scorsetti A. C. (2018). Compatibility of chemical insecticides and entomopathogenic fungi for control of soybean defoliating pest, *Rachiplusia nu*. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(2), 189-201.
- Peng, L., Yan, Y., Yang, C. H., De Barro, P. J., & Wan, F. H. (2013). Identification, comparison, and functional analysis of salivary phenol-oxidizing enzymes in *Bemisia tabaci* B and *Trialeurodes vaporariorum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 147(3), 282-292.
- Perring, T. M., Stansly, P. A., Liu, T. X., Smith, H. A., & Andreason, S. A. (2018). Whiteflies: biology, ecology, and management. En T. M. Wakil, W. Brust & G.E. Perring (Eds.), *Sustainable Management of Arthropod Pests of Tomato* (pp. 73-110). UK, Academic Press.
- Petch, T. (1921). Studies in entomogenous fungi. The Nectriae parasitic on scale insects. *Transactions of the British Mycological Society*, 7(3), 133-167.
- Qiu, J., Song, F., Mao, L., Tu, J., Guan, X. (2013). Time-dose-mortality data and modeling for the entomopathogenic fungus *Aschersonia placenta* against the whitefly *Bemisia tabaci*. *Canadian Journal of Microbiology*, 59(2), 97-101.
- Quintela, E. D. & MacCoy C. W. (1998). Synergistic effect of imidacloprid and two entomopathogenic fungi in the behavior and survival of larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in soil. *Journal of Economic Entomology*, 91, 110-122.
- Rachappa, V., Lingappa, S., and Patil, R. K. (2007). Effect of agrochemicals on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences* 20, 410-413.
- Rangel, D. E. N., Braga, G. U. L., Fernandes, E. K. K., Keyser, C. A., Hallsworth, J. E., Roberts, D. W. (2015). Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during conidial formation. *Current Genetics* 61, 383-404.

- Rangel, D. E. N., Alston, D. G., Roberts, D. W. (2008). Effects of physical and nutritional conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungi. *Mycological Research* 112, 1355-1361.
- Regu, K. & David, B. V. (1993). Two new species of whiteflies (Aleyrodidae: Homoptera) from India. *Hexapoda*, 5, 53-56.
- Rehner, S. A., & Buckley, E. P. (2003). Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Molecular Ecology Notes*, 3(3), 409-411.
- Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, J. M., Luangsa-ard, J. J., DeVotto, L., & Humber, R. A. (2011). Phylogenetic systematics of the anamorphic, entomopathogenic *Beauveria* (Hypocreales, Ascomycota). *Mycologia*, 103, 1055-1073.
- Rogerson, T. C. (1970). The Hypocrealean Fungi (Ascomycetes, Hypocreales). *Mycologia*, 62(5): 865-910.
- Rombach, M. C. & Gillespie, A. T. (1988). Entomogenous hyphomycetes for insect and mite control on greenhouse crops. *Biocontrol News and Information* 9: 7-18.
- Rosen, R., Kanakala, S., Kliot, A., Pakkianathan, B. C., Farich, B. A., Santana-Magal, N., ... & Ghanim, M. (2015). Persistent, circulative transmission of begomoviruses by whitefly vectors. *Current Opinion in Virology*, 15, 1-8.
- Rosset, P., Meneses, R., Lastra, R. & González, W. (1990). Estimación de pérdidas e identificación del geminivirus transmitido al tomate por la mosca blanca *Bemisia tabaci* Genn. (Homoptera: Aleyrodidae) en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas*, 15, 24-34.
- Rossmann, A. Y. (1983). The phragmosporous species of *Nectria* and related genera. *Mycological Papers* 150, 1-164.
- Rossmann, A. Y. (1996). Morphological and molecular perspectives on systematics of the Hypocreales. *Mycologia*, 88(1), 1-19.

- Rossman, A. Y., & Seifert, K. (2011). Phylogenetic revision of taxonomic concepts in the Hypocreales and other Ascomycota--a tribute to Gary J. Samuels. *Studies in Mycology*, 68, 4-8.
- Roy, H. E., Steinkraus, D. C., Eilenberg, J., Hajek, A. E. & Pell, J. K. (2006). Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod host. *Annual Review of Entomology*, 51, 331–357.
- Roy, H. E., Vega, F. E., Chandler, D., Goettel, M. S., Pell, J., & Wajnberg, E. (Eds.). (2010). The ecology of fungal entomopathogens. Dordrecht: Springer.
- Russell, L. M. (1948). The North American species of whiteflies of the genus *Trialeurodes*. *Miscelanius Publications US Department of Agriculture*, 638, 1-85.
- Safavi, S. A., Shah, F. A., Pakdel, A. K., Reza-Rasoulilian, G., Bandani, A. R., Butt, T. M. (2007). Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letter*, 270(1), 116-123.
- Sahayaraj, K. & Karthick-Raja-Namasivayam, S. (2008). Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. *African Journal of Biotechnology*, 7(12), 1907-1910.
- Sampson, W. W., & Drews, E. A. (1941). Fauna Mexicana IV, a review of the Aleyrodidae of Mexico. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, 2, 143-189.
- Samson, R. A. & McCoy, C. W. (1983). *Aschersonia aleyrodis* a fungal pathogen of whitefly. *Journal of Applied Entomology* 96, (1-5), 380-386.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., & Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109, 6241-6246.
- Shah, F. A. Ansari, M. A., Watkins, J., Phelps, Z., Cross, J. & Butt, T. M. (2009). Influence of commercial fungicides on the germination, growth and virulence of four species of entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology*, 19(7), 743-753.
- Shah, P.A. & Pell, J.K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 413-423.

- Shah, F. A., Wang, C. S. & Butt, T. M. (2005). Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 251, 259-266.
- Shannon, P.J. (1996). Hongos entomopatógenos. En L. Hilje (Ed.). *Metodologías para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus* (pp. 60-68). Turrialba, Costa Rica: CATIE.
- Sparks, T. C., Nauen R. (2015) IRAC: mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 122-128.
- Spatafora, J. W., Sung, G. H., Sung, J. M., Hywel-Jones, N. L., & White Jr., J. F. (2007). Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes. *Molecular Ecology*, 16(8), 1701-1711.
- St Leger, R. J., Joshi, L., Bidochka, M. J. & Roberts, D. W. (1996). Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A*, 93, 6349-6354.
- Stielow, J. B., Levesque, C. A., Seifert, K. A., Meyer, W., Iriny, L., Smits, D., ... & Lomascolo, A. (2015). One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 35, 242.
- Todorova, S., Coderre, D., Duchesne, R. M., Cote, J. C. (1998). Compatibility of *Beauveria bassiana* with selected fungicides and herbicides. *Biological Control* 27(2), 427-433.
- Tumuhaise, V., Ekesi, S., Maniania, N. K., Tonnang, H. E. Z., Tanga C. M., Ndegwa, P. N., Irungu, P. N., Srinivasan, R. & Mohamed, S. A. (2018). Temperature-dependent growth and virulence, and mass production potential of two candidate isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin for managing *Maruca vitrata* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) on Cowpea. *African Entomology* 26(1), 73-83.
- Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., ... Roy, H. E. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*, 2(4), 149-159.

- Vega, F. E., Meyling, N. V., Luangsa-ard, J. J., & Blackwell, M. (2012). Fungal entomopathogens. *Insect Pathology*, 2, 171-220.
- Vilgalys R. & Sun B. L. (1994). Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91, 4599-4603.
- Webber H. J. (1897). Sooty mold of the orange and its treatment. *Bulletin of the U.S. Department of Agriculture Division of Vegetable Physiology and Pathology*, 13, 1-14.
- White T. J., Bruns T. D., Lee S. & Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M. A. Innis et al. (Eds). *PCR protocols: a guide to methods and applications* (pp. 315-322). San Diego, Academic Press.
- Wraight, S. P., Carruthers, R. I., Bradley, C. A., Jaronski, S. T., Lancey, L. A., Wood, P. & Galaini-Wraight, S. (1998). Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Journal Invertebrate Pathology*, 71, 217-226.
- Zafar, J., Freed, S., Khan, B. A., & Farooq, M. (2016). Effectiveness of *Beauveria bassiana* against cotton whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Aleyrodidae: Homoptera) on different host plants. *Pakistan Journal of Zoology*, 48(1), 91-99.
- Zhang, C., Ali, S., Musa, P. D., Wang, X. M., & Qiu, B. L. (2017). Evaluation of the pathogenicity of *Aschersonia aleyrodis* on *Bemisia tabaci* in the laboratory and greenhouse. *Biocontrol science and technology*, 27(2), 210-221.
- Zhu, Y., Pan, J., Qiu, J., & Guan, X. (2008). Optimization of nutritional requirements for mycelial growth and sporulation of entomogenous fungus *Aschersonia aleyrodis* Webber. *Brazilian Journal of Microbiology* 39(4), 770-775.