



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

## CAMPUS CAMPECHE

POSTGRADO EN BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD  
AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO

**SUSCEPTIBILIDAD DE *Tetranychus merganser* (ACARI:  
TETRANYCHIDAE) A CEPAS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.  
EVALUACIÓN PARA SU USO POTENCIAL COMO CONTROL BIOLÓGICO  
EN EL CULTIVO DE PAPAYO (*Carica papaya*)**

**ELIZABETH ALFARO VALLE**

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

Sihochac, Champotón, Campeche, 2019

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

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe **Elizabeth Alfaro Valle**, Alumna de esta institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor **Joel Lara Reyna** , por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **“Susceptibilidad de *Tetranychus merganser* (Acari: Tetranychidae) a cepas de hongos entomopatógenos. Evaluación para su uso potencial como control biológico en el cultivo de papayo (*Carica papaya*)”** y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos que se pueden derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y La que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta institución.

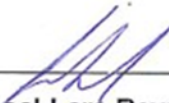
Sihochac, Champotón, Campeche a 14 de Junio de 2019.



---

**Biol. Elizabeth Alfaro Valle**

**Firma**



---


**Dr. Joel Lara Reyna**  
**Vo.Bo. del Consejero**

La presente tesis titulada: **Susceptibilidad de *Tetranychus merganser* (Acari: Tetranychidae) a cepas de hongos entomopatógenos. Evaluación para su uso potencial como control biológico en el cultivo de papayo (*Carica papaya*)** realizada por la alumna: **Elizabeth Alfaro Valle** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN  
BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR


CONSEJERO

  
\_\_\_\_\_  
DR. JOEL LARA REYNA

ASESORA

  
\_\_\_\_\_  
DRA. AIDA MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. GABRIEL OTERO COLINA

Sihoac, Champotón, Campeche, junio de 2019

**SUSCEPTIBILIDAD DE *Tetranychus merganser* (ACARI: TETRANYCHIDAE) A  
CEPAS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS. EVALUACIÓN PARA SU USO  
POTENCIAL COMO CONTROL BIOLÓGICO EN EL CULTIVO DE PAPAYO (*Carica  
papaya*)**

Elizabeth Alfaro Valle, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2019

**Resumen**

La papaya es una fruta tropical originaria del sur de México y Centroamérica cuya demanda ha aumentado en los últimos años; nuestro país se posiciona como el tercer productor mundial. Este cultivo es susceptible a diversas plagas, entre las que destacan los ácaros. *Tetranychus merganser* Boudreaux es una especie poco estudiada debido a que su importancia económica fue reconocida de manera tardía; sin embargo, es considerada una plaga emergente del cultivo de papayo (*Carica papaya* L.). Su control hasta la fecha, está basado en el uso de acaricidas químicos, por lo que se hace necesaria la búsqueda de alternativas sustentables como el control biológico con hongos entomopatógenos.

Se evaluó la susceptibilidad de hembras adultas de *T. merganser* a 31 cepas de cuatro especies de hongos entomopatógenos, tanto nativas del estado de Campeche como foráneas. Se encontró que *T. merganser* fue susceptible a 30 de 31 cepas a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/ml, las cuales mostraron infectividad sobre huevos. Una cepa de *Beauveria bassiana* y cinco de *Metarhizium anisopliae* produjeron 100% de mortalidad entre el cuarto y quinto día, por lo que con ellas se realizaron bioensayos semifinios para determinar la  $CL_{50}$  y  $TL_{50}$ .

Se determinó que las cepas más virulentas fueron Ma005 ( $CL_{50}$   $4.91 \times 10^6$  conidios/ml y  $TL_{50}$  de 3.35 d), Bb016 ( $CL_{50}$   $5.29 \times 10^6$  y 3.77 d) y Ma034 ( $CL_{50}$   $7.19 \times 10^6$  y 3.6 d); estas cepas por lo que mostraron potencial para el control de *T. merganser*.

Se realizó una prueba de verificación de las cepas más virulentas sobre plántulas de papayo infestadas con *T. merganser*, utilizando una sola aplicación de conidios a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/ml, por medio de aspersion. No se encontraron resultados favorables, lo que puede atribuirse a que la humedad relativa no fue suficiente para disparar el mecanismo de germinación de las esporas y al corto tiempo que transcurre entre muda y muda, lo que no permite que la espora penetre la cutícula.

Con este trabajo podemos concluir que las hembras adultas de *T. merganser* son altamente susceptibles a las cepas probadas de hongos entomopatógenos, pero se necesitan más estudios sobre la aplicación y evaluación de estos microorganismos en campo para poder diseñar estrategias efectivas de aplicación y evaluación, ya que las cepas evaluadas muestran un buen potencial de control para esta especie.

**Palabras clave:** ácaros fitófagos, entomopatógenos nativos, capa residual en hoja, control microbiano, Campeche

**SUSCEPTIBILITY OF *Tetranychus merganser* (ACARI: TETRANYCHIDAE) TO STRAINS OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI. EVALUATION FOR ITS POTENTIAL USE AS BIOLOGICAL CONTROL IN PAPAYA CROP (*Carica papaya*)**

Elizabeth Alfaro Valle, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2019

**Abstract**

Papaya is a tropical fruit native to southern Mexico and Central America whose demand has increased in recent years; our country is the third largest producer in the world. This crop is susceptible to various pests, among which mites stand out. *Tetranychus merganser* Boudreaux is a little studied species because its economic importance was recognized late; however, it is considered an emerging pest of papaya (*Carica papaya* L.). Its control to date, is based on the use of chemical acaricides, so it is necessary to search for sustainable alternatives such as biological control with entomopathogenic fungi.

We evaluated the susceptibility of adult females of *T. merganser* to 31 strains of four species of entomopathogenic fungi, both native to the state of Campeche, as well as foreign ones. We found that *T. merganser* was susceptible to 30 of 31 strains at a concentration of  $1 \times 10^8$  conidia/ml, which showed infectivity to eggs. A strain of *Beauveria bassiana* and five of *Metarhizium anisopliae* produced 100% mortality between the fourth and fifth day, so semifine bioassays were carried out to determine the  $CL_{50}$  and  $TL_{50}$ .

The most virulent strains were Ma005 ( $CL_{50}$   $4.91 \times 10^6$  conidia/ml and  $TL_{50}$  de 3.35 d), Bb016 ( $CL_{50}$   $5.29 \times 10^6$  y 3.77 d) and Ma034 ( $CL_{50}$   $7.19 \times 10^6$  y 3.6 d), showing potential for control of *T. merganser*.

A verification test of the most virulent strains was carried out on papaya seedlings infested with *T. merganser*, using a single application of conidia at a concentration of  $1 \times 10^8$  conidia/ml, by spraying. No favorable results were found, a fact that is attributed to the relative humidity that was not enough to trigger the germination mechanism of the spores, as well to the short time elapsed between molts, which does not allow the spore to penetrate the cuticle.

With this work we can conclude that adult females of *T. merganser* are highly susceptible to the proven strains of entomopathogenic fungi, but more studies are needed on the application and evaluation of these microorganisms in the field in order to design effective strategies for application and evaluation, given that strains evaluated strains show good control potential for this species.

**Keywords:** Phytophagous mites, native entomopathogens, microbial control, residual layer in leaf, Campeche

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de este posgrado.

Al Dr. Joel Lara Reyna por toda la confianza que me brindó desde el primer momento en que llegue, me dio todas las facilidades y la libertad de trabajar en su laboratorio “*ad libitum*”, lo cual fue una experiencia de autoaprendizaje y crecimiento profesional muy enriquecedora. Gracias doctor!.

Al Dr. Gabriel Otero Colina por todas sus enseñanzas con la subclase Acari, por la paciencia que me tuvo y porque a pesar de la distancia siempre estuvo al pendiente de mí.

A la Dra. Aída Martínez Hernández por sus críticas constructivas al trabajo y por su rigor científico.

Al Dr. Ariel W. Guzmán Franco por aceptar ser mi sinodal y por sus atinadas observaciones para la mejora de este manuscrito.

Al Dr. Everardo Aceves Navarro por ver en mi a una mujer inteligente y capaz de realizar todo lo que se proponga. Gracias por sus consejos, apoyo y el cariño brindado.

Al M. en C. Arturo Reyes Montero por todo el apoyo y la asesoría brindada durante mi estancia en el campus, por todos tus consejos, pero sobre todo, por tu amistad.

Al M. en C. Christian Pech, quien desde que llegué al laboratorio me adoptó y brindó toda su ayuda en los laboratorios de control microbiano y biología molecular. Gracias por tus consejos, por brindarme tu amistad y por ser mi colega de discusión científica.

A los productores de papaya de la región, quienes depositaron su confianza en nosotros para poder realizar los muestreos necesarios, e incluso destinar algunas hileras para las pruebas en campo.

Al M. en C. Víctor García Méndez por su apoyo en el manejo del programa Minitab para el análisis de los datos obtenidos en esta investigación.

A mis amigos, con los que comencé esta aventura: Laura, Hilda, Edgar, José, Susy, Misael, Mauricio, Javier y Ricardo con quienes compartí experiencias inolvidables.

A mis compañeros del laboratorio de control microbiano de plagas: Marí, Pablo, Lupita, Naye y Joaquín.

A todos los trabajadores de campo del campus quienes me apoyaron con el manejo de la parcela experimental (don Cesar, don Pedro, Erick, Esteban, Rich, los dos Diegos), pero además aprendí de ustedes y me divertí mucho.

A todos los que en algún momento se acercaron a mi preguntando por el estatus de este trabajo y claro, por mí, ¡muchas gracias!.

## **Dedicatoria**

Todas las horas de clase, bajo el microscopio, en la campana, leyendo, escribiendo, de trabajo de campo, de esfuerzo y dedicación las dedico con mucho amor y cariño a mi familia, pilar importante de mi vida.

A mi padre, el señor José Guadalupe Alfaro por depositar tu confianza en mí, por apoyarme en todo momento y motivarme siempre a alcanzar mis metas.

## CONTENIDO

	Página
<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>2. Revisión de literatura</b> .....	3
2.1 Generalidades del papayo <i>Carica papaya</i> .....	3
2.2 Importancia de los ácaros en la agricultura .....	4
2.3 Acarofauna asociada al cultivo de papaya en México .....	5
2.4 Control de ácaros .....	6
2.5 Alternativas de control: control biológico .....	7
2.5.1 Uso de depredadores .....	7
2.5.2 Uso de hongos entomopatógenos .....	9
2.5.2.1 Hongos entomopatógenos asociados con la familia Tetranychidae .....	10
2.5.2.2 Evaluación en campo de hongos entomopatógenos para el manejo de ácaros .....	12
2.6 ¿Qué características hacen susceptibles a los ácaros fitófagos ante el ataque de patógenos fúngicos? .....	12
2.7 El empleo de herramientas moleculares para la identificación de patógenos fúngicos .....	13
<b>3. Justificación</b> .....	16
<b>4. Hipótesis</b> .....	17
<b>5. Objetivos</b> .....	17
5.1 General .....	17
5.2 Particulares .....	17
<b>6. Metodología</b> .....	18
6.1 Colecta e identificación de los ácaros asociados al cultivo de papayo.....	18
6.1.2 Sitios de colecta .....	18
6.1.3 Colecta de los ácaros asociados al papayo .....	18
6.1.4 Identificación taxonómica .....	19
6.2 Establecimiento de la colonia de <i>T. merganser</i> .....	19
6.3 Evaluación de hongos entomopatógenos en condiciones de laboratorio	20
6.3.1 Resiembra y activación de cepas de hongos entomopatógenos .....	20
6.3.2 Infectividad de las cepas de hongos entomopatógenos sobre <i>T.</i> <i>merganser</i> .....	22



6.3.2.1 Determinación y establecimiento del ensayo .....	22
6.3.2.1.1 a) Inmersión de hojas infestadas .....	22
6.3.2.1.2 b) Inmersión en portaobjetos .....	22
6.3.2.1.3 c,d) Película residual en caja Petri y tubo de ensaye .....	22
6.3.2.1.4 e) Aspersión de conidios .....	22
6.3.2.2 Ensayo establecido .....	23
6.3.3 Evaluación de agresividad (obtención de CL <sub>50</sub> y TL <sub>50</sub> ) .....	24
6.4 Verificación de las cepas de hongos entomopatógenos sobre plántulas de papayo infestadas .....	25
6.4.1 Producción escalada de hongos entomopatógenos .....	25
6.4.1.1 Preparación del sustrato sólido (arroz) .....	25
6.4.1.2 Producción de conidios .....	25
6.4.2 Preparación de concentraciones para ensayo de infectividad en plántulas .....	26
6.4.3 Obtención de plántulas de papayo .....	26
6.4.4 Evaluación .....	26
6.5 Identificación molecular de las cepas de <i>Lecanicillium</i> sp. ....	28
6.5.1 Producción de micelio para la extracción de DNA .....	28
6.5.2 Extracción de DNA .....	28
6.5.3 Amplificación por PCR utilizando diferentes marcadores moleculares .....	28
6.5.4 Purificación de los productos de amplificación .....	29
6.5.5 Secuenciación y análisis de las secuencias .....	29
<b>7. Resultados</b> .....	<b>30</b>
7.1 Identificación de los ácaros asociados al cultivo de papayo .....	30
7.2 Cría de <i>Tetranychus merganser</i> .....	31
7.3 Susceptibilidad de <i>T. merganser</i> a hongos entomopatógenos .....	31
7.4 Determinación de la virulencia de las cepas de hongos entomopatógenos sobre <i>T. merganser</i> .....	33
7.5 Verificación sobre plántulas de papayo infestadas con <i>T. merganser</i> .....	36
7.6 Identificación molecular de <i>Lecanicillium</i> sp. ....	37
7.6.1 Extracción de DNA .....	37
7.6.2 Amplificación por PCR de los diferentes genes empleados .....	37
7.6.3 Purificación de los ampicones.....	38

7.6.4 Análisis de las secuencias y comparación con Blast para la identificación molecular .....	39
<b>8. Discusión</b> .....	42
8.1 Verificación sobre plántulas .....	46
8.2 Identificación molecular de <i>Lecanicillium</i> sp. ....	47
<b>9. Conclusiones</b> .....	48
<b>10. Perspectivas</b> .....	59
<b>11. Anexos</b> .....	50
<b>12. Literatura citada</b> .....	55

## LISTA DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1.-</b>	Huertos de papayo muestreados en el estado de Campeche durante 2017 y 2018. ....	18
<b>Figura 2.-</b>	Plántulas de frijol de 15 días después de la germinación (izquierda); jaula con malla antiáfidos la cual no permite la entrada ni salida de organismos (derecha).....	20
<b>Figura 3.-</b>	a) Arena montada: base de la caja, esponja-hoja; b) hembras de <i>T. merganser</i> sobre el disco de hoja tratado. ....	24
<b>Figura 4.-</b>	Disposición de las plántulas de papayo dentro de la jaula, de izquierda a derecha: control, T1(HMa003), T2(HMa034), T3 (HMa005). ....	27
<b>Figura 5.-</b>	Algunas formas del edeago en el género <i>Tetranychus</i> , a) <i>Tetranychus urticae</i> ; b) <i>Tetranychus merganser</i> . ....	30
<b>Figura 6.-</b>	Plantas de frijol ( <i>P. vulgaris</i> ) con síntomas del ataque de <i>T. merganser</i> . a) zonas cloróticas debido a la alimentación de los ácaros; b) las flechas rojas señalan la presencia de ácaros en el envés de las hojas. ....	31
<b>Figura 7.-</b>	Mortalidad acumulada (%) de las hembras de <i>T. merganser</i> provocada por las diferentes cepas probadas con una concentración de $1 \times 10^8$ conidios/ml a) Mortalidad provocada por <i>B. bassiana</i> al quinto día post-infección. b) Mortalidad provocada por <i>M. anisopliae</i> al cuarto día post-infección. * infectividad en huevos. ....	32
<b>Figura 8.-</b>	Mortalidad acumulada (%) de las hembras de <i>T. merganser</i> provocada por los aislamientos de <i>Lecanicillium</i> sp. al sexto día post-infección a una concentración de $1 \times 10^8$ conidios/ml. ....	32
<b>Figura 9.-</b>	Infección causada por diferentes cepas de hongos entomopatógenos sobre <i>T. merganser</i> . A) <i>M. anisopliae</i> 005, A´) Ma003, A´´) huevos infectados con Ma; B) <i>B. bassiana</i> 016, B´) Bb005, B´´) huevos infectados con Bb ; C) <i>Lecanicillium</i> sp. 28, C´) <i>Lecanicillium</i> sp. 9, C´´) Abundante crecimiento del micelio en el disco de hoja <i>L. sp.</i> 54. La barra de escala corresponde a 200 $\mu$ m. ..	34
<b>Figura 10.-</b>	Líneas de respuesta generadas del logaritmo de la concentración contra la mortalidad provocada a las hembras de <i>T. merganser</i> con las diferentes cepas del hongo <i>M. anisopliae</i> . ....	35

<b>Figura 11.-</b>	Líneas de respuesta generadas del logaritmo de la concentración probada contra la mortalidad provocada a las hembras de <i>T. merganser</i> con las diferentes cepas del hongo <i>B. bassiana</i> . .....	35
<b>Figura 12.-</b>	Gel de agarosa al 1% mostrando las bandas de ADN obtenidas de los diferentes aislamientos de <i>Lecanicillium</i> sp. ....	37
<b>Figura 13.-</b>	Amplificación por PCR de los genes ITS y 18S de los nueve aislamientos de <i>Lecanicillium</i> sp. 1- Lec3, 2- Lec8, 3-Lec9, 4-Lec28, 5-Lec25, 6-Lec26, 7-Lec34, 8-Lec50, 9-Lec54. Marcador de peso molecular 1kb plus Invitrogen. ....	38
<b>Figura 14.-</b>	Amplificación por PCR del gen FE1- $\alpha$ de los nueve aislamientos de <i>Lecanicillium</i> sp. 1- Lec3, 2- Lec8, 3-Lec9, 4-Lec28, 5-Lec25, 6-Lec26, 7-Lec34, 8-Lec50, 9-Lec54. Marcador de peso molecular 1kb plus Invitrogen. ....	38
<b>Figura 15.-</b>	Características generales del género <i>Lecanicillium</i> . a) Conidióforo verticilado, b) conidióforos solitarios, c) conidióforo bifurcado con cabezas globosas, d) conidióforo con conidios maduros.....	41
<b>Figura 16.-</b>	a) tipos de conidios: macroconidios (*) y microconidios; b) cristales octaédricos presentes en el medio de cultivo.....	41
<b>Figura A1.-</b>	Morfología de <i>Neozygites</i> sp. a) aspecto de <i>T. merganser</i> infectado por el hongo, b) cuerpo de una hembra cubierto por esporas de resistencia visto en 10X, c) conidios primarios, d) capiloconidios con capilioespora. ....	53
<b>Figura A2.-</b>	Depredadores de <i>T. merganser</i> sobre papayo, a) coccinélido <i>Stethorus</i> sp., b) díptero <i>Feltiella acarisuga</i> . ....	54

## LISTA DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.-</b> Características principales de las variedades de papayo más importantes en México. ....	3
<b>Cuadro 2.-</b> Registro de hongos entomopatógenos asociados de forma natural y experimentalmente con especies de la familia Tetranychidae. ....	11
<b>Cuadro 3.-</b> Características de las cepas utilizadas en este estudio.....	21
<b>Cuadro 4.-</b> Secuencia de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de tres genes.....	29
<b>Cuadro 5.-</b> Determinación de la CL <sub>50</sub> , TL <sub>50</sub> y otros parámetros estadísticos obtenidos del análisis Probit con un nivel de significancia del 5% para todas las cepas probadas.....	36
<b>Cuadro 6.-</b> Cuantificación de ADN por espectrofotometría (Nanodrop ND-1000) de los amplicones purificados.....	39
<b>Cuadro 7.-</b> Reconstrucción de las secuencias de la región intergénica (ITS) de los nueve aislamientos de <i>Lecanicillium</i> sp.....	40
<b>Cuadro A1.-</b> Huertos de papaya muestreados en el estado de Campeche durante 2017 y 2018.....	51
<b>Cuadro A2.-</b> Condiciones de reacción para los genes ITS y 18S.....	51
<b>Cuadro A3.-</b> Condiciones de reacción para el gen factor de elongación 1 $\alpha$ .....	51

## 1. Introducción

La demanda por frutas tropicales frescas ha crecido de forma sostenida durante las últimas dos décadas, cuya producción corresponde aproximadamente al 75% de la producción mundial de las frutas tropicales principales. El mango es la fruta principal que se produce en todo el mundo, con 38.6 millones de toneladas; en segundo lugar está la piña, con 19.41 millones de toneladas, mientras que la papaya se ha posicionado como el tercer fruto tropical más producido, con 11.22 millones de toneladas (FAO, 2004; Evans y Ballen, 2012).

La papaya se produce en más de 60 países, siendo los principales productores: India, Brasil, Indonesia, Nigeria, México, Etiopía y Guatemala, cuya producción entre 2001 y 2015 osciló alrededor de 1,058,162 t por año (FAO, 2017). En 2017, México se posicionó como el tercer productor mundial de papaya con 961,768 toneladas, lo que representa el 7.3% del volumen total producido en el mundo (SIAP, 2018) y además es el principal exportador donde los destinos más importantes son Estados Unidos (82.07%) y Canadá (17.93%) (SAGARPA, 2017).

En nuestro país, 19 entidades federativas participan en la producción de este fruto, concentrando la mayor parte hacia la región sur-sureste debido a que las condiciones ambientales son favorables para su desarrollo. Los estados de mayor producción son (en ese orden): Oaxaca, Colima y Chiapas (SIAP, 2018).

Los productores de papaya se enfrentan a diferentes retos, entre los que destacan los problemas fitosanitarios, debido a que es un cultivo susceptible a diversas plagas y enfermedades (Valencia *et al.*, 2017).

El principal problema fitosanitario del papayo en México es causado por el virus de la mancha anular (PRSV, por sus siglas en inglés), cuya transmisión se da por varias especies de áfidos, entre los que destacan por su eficiencia *Aphis gossypii*, *Myzus persicae* y *Macrosiphum euphorbiae* (Villanueva-Jiménez y Peña-Martínez, 1991; Evans y Ballen, 2012), y le siguen en importancia los daños provocados por el complejo de diferentes especies de ácaros tetránquidos (*Tetranychus* spp.), comúnmente denominados “arañas rojas” (Abato-Zárate *et al.*, 2011; SDR, 2015).

El género *Tetranychus* se caracteriza por contener organismos de distribución cosmopolita, que tienden a agruparse en colonias cubiertas de seda (“telaraña”) y por su extrema polifagia (Ferragut y Santonja, 1989). En nuestro país se encuentran registradas 14 de las 140 especies conocidas de este género, siendo las que tienen relación con el papayo *T. urticae* y *T. merganser* (Tuttle *et al.*, 1976; Bolland *et al.*, 1998). Esta última especie de gran

interés ya en 2011 se reportó su asociación a este cultivo (Abato-Zárate, 2011; Valencia-Domínguez *et al.*, 2011), por lo que se postula que recientemente se adaptó a parasitarlo (Otero-Colina, 2015).

El control de los ácaros plaga hasta la fecha está basado en el empleo de plaguicidas, pero debido al mal manejo y a su uso intensivo en todo el mundo ha resultado como consecuencia la selección de poblaciones resistentes, siendo en los ácaros un problema muy grave ya que el ácaro *T. urticae* es la especie que tiene resistencia al mayor número de plaguicidas (Whalon *et al.*, 2018). En esta especie en particular, la generación de poblaciones resistentes se ve favorecida por su alta fecundidad, el tipo de reproducción (partenogénesis arrenotoca) y ciclo de vida corto, lo que da como resultado muchas generaciones por año (Cakmak *et al.*, 2003; Van Leeuwen *et al.*, 2009). Además de esto, la preocupación sobre el impacto ambiental que generan y los daños a la salud humana han estimulado la búsqueda de alternativas de control, incluyendo el control biológico como: el uso de ácaros depredadores (Peña *et al.*, 1996; Weintraub *et al.*, 2003) y de varias especies de hongos entomopatógenos (Peña *et al.*, 1996; Maketon *et al.*, 2008).

Los hongos entomopatógenos son importantes enemigos naturales de los artrópodos, su empleo para el control de ácaros plaga ha sido muy poco explorado; sin embargo, existe una variedad de especies fúngicas que atacan a dicho grupo y que pueden utilizarse para su control (Chandler *et al.*, 2000; van der Geest *et al.*, 2000).

Con base en las consideraciones anteriores, la evaluación de nuevos aislamientos fúngicos para el control de *T. merganser* es una tarea primordial, por lo que en este trabajo se realizó la evaluación de cepas fúngicas tanto nativas de sitio de estudio (Campeche, México) como foráneas en laboratorio y de forma directa sobre plántulas de papayo para poder proponer una alternativa sustentable de control a este problema y que además sean accesibles para los productores papayeros de la región.

## 2. Revisión de literatura

### 2.1 Generalidades del papayo *Carica papaya*

El papayo (*Carica papaya*) es una especie herbácea, de crecimiento rápido y ciclo de vida corto, originaria de Mesoamérica, no se sabe exactamente el lugar, pero se tiene la hipótesis de que pudo haberse originado en las tierras bajas de Centroamérica en alguna región entre el sur de México y Nicaragua (Storey, 1969).

El fruto maduro tiene un aroma suave, un agradable sabor y posee alto contenido de vitaminas A, C y B, micronutrientes, fibra y es altamente conocido por su capacidad digestiva (Chan, 2009; ProPapaya, 2009). También es característica su producción de látex que funciona como mecanismo de defensa ante el ataque de depredadores; la composición del látex es principalmente proteica constituida por quitinasas y proteasas a las que se les denomina genéricamente papaína, la cual tiene diversas aplicaciones en la industria como ablandador de carne, clarificador de cerveza, curtidor de cuero y aplicaciones farmacéuticas como digestivo, entre otros (Becker, 1958; Azarkan *et al.*, 1997; El Moussaoui *et al.*, 2001; Scheldeman *et al.*, 2011).

El arbusto de papayo es popular en los traspatios de muchos países en desarrollo, pero cada vez hay más plantaciones comerciales que satisfacen las demandas de los mercados nacionales y de exportación, como es el caso de México y Malasia, debido a diversas características del cultivo como la alta rentabilidad económica que presenta, el corto tiempo para la cosecha de frutos (8 o 9 meses) y el rendimiento que puede variar de 60 a 100 t/ha/año (Chan, 2009; Granados *et al.*, 2015).

A nivel mundial, se cultivan un gran número de variedades, pero en nuestro país destacan: el cultivar Solo, la variedad Maradol y el híbrido Tainung (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Características principales de las variedades de papayo más importantes en México.

Variedad	Origen	Características	Fuente
Solo (Hawaiana)	Barbados, 1911	Fruto pequeño, piriforme de pulpa amarillo-anaranjada, pesa entre 400 y 800 gramos, tamaño ideal para exportación.	Jiménez, 2002; ProPapaya, 2009
Maradol	Cuba. Introducida a México en 1977 por CONAFRUT.	Fruto alargado de gran tamaño, cilíndrico, de pulpa roja o amarilla, que puede llegar a pesar entre 1 y 3 kg. Alta susceptibilidad a las enfermedades.	ProPapaya, 2009



Tainung	Taiwán. Reciente introducción al país.	Desarrolla plantas hermafroditas, por lo que siempre se obtienen frutas alargadas.	García, 2010
---------	--	--	--------------

## 2.2 Importancia de los ácaros en la agricultura

Antes de la segunda guerra mundial, los ácaros que se alimentan de plantas (fitófagos) eran considerados como plagas menores o esporádicas; sin embargo, esto cambió con el uso extensivo de los insumos químicos (insecticidas, herbicidas, fertilizantes, etc.). Se han desarrollado hipótesis que tratan de explicar cómo se han incrementado los brotes de ácaros plaga (Huffaker *et al.*, 1969, 1970). La primera hipótesis, denominada “estimulación de las poblaciones de ácaros por pesticidas y fertilizantes”, sugiere que, al mejorar la nutrición de las plantas por medio del uso de fertilizantes, podas y en general, un buen manejo de la huerta, se propicia una situación que favorece la proliferación de los ácaros en comparación de la situación nutrimental de las plantas de un huerto abandonado. Este fenómeno también es conocido como **trofobiosis** (Huffaker *et al.*, 1970) La segunda hipótesis toma como base la “reducción de los enemigos naturales por pesticidas”, es la más aceptada y se basa en que el uso de pesticidas modernos reduce las poblaciones de enemigos naturales de los ácaros (tanto de insectos como de ácaros), liberándolos de esta presión y por lo tanto ocasionando brotes más frecuentes de los ácaros plaga (Huffaker *et al.*, 1969, 1970). Aunado a esto, se demostró que algunos pesticidas incrementan la tasa de fecundidad de los ácaros plaga, dándose un fenómeno fisiológico que se presenta cuando cierto organismo está expuesto a concentraciones subletales de una sustancia tóxica (**hormoligosis**). Las enzimas desintoxicantes (o de reparación del DNA) juegan un papel fundamental para dicha condición (Luckey, 1968).

La última hipótesis, “escape de la presa al depredador en tiempo y espacio de la interrupción de los pesticidas y fertilizantes”, es correcta para algunas situaciones. La aplicación de productos químicos para el control de insectos plaga puede matar a los depredadores de los ácaros fitófagos sin matar a éstos (el producto es lo suficientemente poco tóxico para la gran mayoría de ácaros y sobreviven en mayor proporción que los depredadores). Este brote de ácaros es denominado **brote secundario** y ocurre porque los pocos depredadores que sobreviven no pueden suprimir la población de ácaros (Huffaker *et al.*, 1970; Hoy, 2011).

Las familias de ácaros que son consideradas de importancia agrícola son Tetranychidae, Tenuipalpidae, Tarsonemidae, así como la superfamilia Eriophyoidea; los ácaros de estas familias utilizan su aparato bucal picador-chupador (estilete) para alimentarse de las células

y tejidos de las plantas. Producto de su alimentación, ocasionan pérdidas severas tanto en cultivos de campo como protegidos (Van Leeuwen *et al.*, 2009).

### **2.3 Acarofauna asociada al cultivo de papaya en México**

El estudio de los ácaros fitófagos que afectan a los cultivos agrícolas y sus formas de control es de reciente interés, principalmente en los países tropicales por el notable aumento de los problemas de importancia económica que causan (Doreste, 1988). En México, esta situación se ha hecho creciente en los últimos años entre los productores de papaya, por lo que este tema tomó importancia y se consideró una línea prioritaria de investigación en el país (CONACYT, 2008).

El cultivo de papaya posee una fauna diversa de ácaros fitófagos, ya que se han citado 30 especies de la familia Tetranychidae en este cultivo a nivel mundial (Bolland *et al.*, 1998). En México, las especies principales son: *Eotetranychus lewisi*, *Eutetranychus banksi*, *T. merganser* y *T. urticae* (todos de la familia Tetranychidae), así como *Calacarus citrifolii* (Eriophyidae), aunque no se excluye que otras especies fitófagas puedan en algún momento agregarse a la lista (Otero-Colina, 2015).

A pesar del problema fitosanitario que representan los ácaros, se ha otorgado poca importancia a la identificación taxonómica de las especies causantes de este problema, primordial para poder entender la relación plaga-hospedero y posteriormente dar paso a las medidas de control.

En el poblado de Libertad, Nayarit, Flores *et al.* (2011) reportaron la presencia de ácaros fitófagos en diversos frutales, entre ellos papaya cv. Maradol, identificaron dos especies, *T. urticae* y *T. cinnabarinus*, siendo la primera la especie que causa mayor daño económico.

Valencia-Domínguez *et al.* (2011) identificaron a los ácaros fitófagos *T. merganser*, *E. banksi*, *C. citrifolii* y *Daidalotarsonemus* sp. en el estado de Yucatán. También definieron a *T. merganser* como el ácaro plaga más dañino para el cultivo de papayo en este estado.

En el estado de Veracruz, Abato-Zárate *et al.* (2014) reportaron las siguientes especies: *E. lewisi*, *E. banksi*, *T. merganser* y *T. urticae*. Encontraron que *E. lewisi* fue la especie con mayor nivel poblacional en los sitios muestreados.

Hay un caso especial con el ácaro blanco *Polyphagotarsonemus latus* (Tarsonemidae), considerado como una plaga muy importante para varios cultivos, incluyendo al papayo en varias regiones (Gerson, 1992). En México, en la región del Soconusco, Chiapas, se reportó la presencia de esta especie por De Coss (1999), pero como se observó en los trabajos anteriores, no se ha vuelto a encontrar a esta especie.

## 2.4 Control de ácaros

El empleo de plaguicidas en la agricultura es el método de control más utilizado por los agricultores, debido a que son productos de fácil aplicación y controlan a las plagas rápidamente (siempre y cuando el organismo blanco no haya desarrollado resistencia a dicho producto) (Ullah *et al.*, 2011).

Hay productos que son recomendados para el control de ácaros con los cuales se busca abatir la población; por ejemplo, Acuña *et al.* (2005) probaron diferentes productos químicos para el control del ácaro blanco (*P. latus*) en cultivo de papaya. Encontraron que los productos abamectina (Vertimec) y dicofol más tetradifon (Acarin T) tuvieron una eficacia superior al 98% hasta los 14 días posteriores a la aplicación, mientras que con azociclotin (Peropal) se presentó el 100% de eficacia a los 14 días.

Abato-Zárate *et al.* (2012) evaluaron la efectividad de diferentes plaguicidas contra el ácaro *T. merganser* en papayo cv. Maradol en el estado de Veracruz, México. Encontraron que después de la tercera aplicación se obtuvieron las poblaciones más bajas de ácaros por hoja (2.6, 3.9, 3.5 y 4.9) con los tratamientos: dicofol en rotación con bifentrina, aceite parafínico de petróleo solo, azufre en polvo y la combinación de aceite parafínico de petróleo y azadiractina 1.2%, respectivamente.

La mayoría de los estudios realizados para el control químico de ácaros fitófagos son enfocados hacia *T. urticae*, ya que es considerada la especie de ácaro más importante en la agricultura mundial, entre otras razones, porque es altamente polífaga; se reporta en 3,877 hospederos incluyendo frutales, algodón, hortalizas y ornamentales (Bolland *et al.*, 1998; Migeon y Dorkeld, 2007). Su control se realiza principalmente con abamectina, la cual pertenece a la clase de lactonas macrocíclicas, cuyo efecto se ejerce sobre el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y en los canales de cloruro regulados por glutamato, causando parálisis y la muerte al organismo (Van Leeuwen *et al.*, 2010). Se tienen reportes de resistencia hacia este compuesto (y otros) por parte de *T. urticae* en diferentes poblaciones de campo (Beers *et al.*, 1998; Cerna *et al.*, 2009; Villegas-Elizalde *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2015). Se han elucidado varios mecanismos de resistencia a nivel molecular en esta especie, particularmente los asociados con alteraciones en el sitio objetivo del acaricida, donde se han identificado mutaciones puntuales en los canales de cloruro regulados por glutamato (GluCl<sub>s</sub>) que están asociadas a la resistencia a la abamectina (Van Leeuwen *et al.*, 2010; Dermauw *et al.*, 2012).

## 2.5 Alternativas de control: control biológico

El control biológico es considerado como una disciplina científica desde el final del siglo XIX, después del exitoso caso de la introducción de la catarinita *Rodolia cardinalis* para el control de la escama algodonosa de los cítricos *Icerya purchasi* en California, E.U. en 1888 (Barrera, 2007).

Esta disciplina es definida como el uso de organismos vivos capaces de reducir la densidad poblacional de un organismo plaga (Eilenberg *et al.*, 2001). Los organismos vivos a los que se hace referencia son: depredadores, parasitoides y patógenos.

Los agentes de control biológico pueden ser usados de diferentes maneras para el control de plagas agrícolas, pudiéndose distinguir cuatro estrategias:

- a) Clásico o introducción: esta estrategia involucra la introducción de un enemigo natural a sitios donde no se encuentra presente naturalmente, con el objetivo de que a largo plazo se establezca y se pueda obtener la supresión de la plaga (Charnley y Collins, 2007); generalmente se utiliza para el control de plagas exóticas.
- b) Inoculativo: aquí se da la liberación intencional de un agente de control con la expectativa de que se multiplicará y controlará a la plaga por un determinado lapso de tiempo (Eilenberg *et al.*, 2001).
- c) Inundativo: el control depende de la liberación de importantes cantidades del enemigo natural para proporcionar control inmediato de la plaga; el control se produce a partir del inóculo liberado y no de su progenie (Kaya y Vega, 2012).
- d) Conservación: involucra la modificación del ambiente o de las prácticas existentes para proteger a los enemigos naturales nativos (Eilenberg *et al.*, 2001).

### 2.5.1 Uso de depredadores

Los ácaros de la familia Phytoseiidae han sido muy estudiados en las últimas cuatro décadas por su potencial como agentes de control biológico de ácaros fitófagos y, más recientemente, de trips en varios cultivos a nivel mundial, tanto en condiciones de campo como en invernadero (McMurty y Croft, 1997). Hay especies que han sido utilizadas ampliamente para este fin, como es el caso de *Phytoseiulus persimilis* que se alimenta exclusivamente de especies del género *Tetranychus*, mostrando su voracidad al comer 34 huevos o 4.8 hembras y 10 juveniles de *T. urticae* por día (McMurty y Croft *op cit.*).

Dentro de los grupos de insectos depredadores, el más utilizado y estudiado es el de los coleópteros, especialmente la familia Coccinellidae. Dentro de ella, la tribu Stethorini (con los géneros *Stethorus* y *Parasthethorus*) está especializada en alimentarse de ácaros, principalmente tetraníquidos. Esta tribu es cosmopolita y se encuentra presente en

diferentes agroecosistemas de frutales (incluyendo al papayo), ornamentales, hortícolas, etc. (Biddinger *et al.*, 2009).

Existen pocos estudios sobre el control de ácaros plaga de papaya, entre los que destacan los siguientes:

Raros y Haramoto (1974) realizaron algunas observaciones en campo sobre la biología del coccinélido *Stethorus siphonulus* en Oahu, Hawái. Este depredador establece una relación estrecha con tres especies de ácaros, *T. cinnabarinus*, *T. tumidus* y *E. banksi*; se encuentra más frecuentemente en plantaciones de papaya, algodón de seda (*Calotropis gigantea*), croto (*Codiaeum variegatum*) y el árbol del coral (*Erythrina cristagalli*). Los mismos autores en condiciones de laboratorio encontraron que el tercer estadio larval del depredador es el más activo y ágil para atrapar a su presa, ya que durante el tiempo que pasa en este estadio (1.2 días) consumió 36.3% de huevos, 41.3% larvas y ninfas y 22.4% de adultos del ácaro tetránquido *T. cinnabarinus*. Además, el tiempo promedio de consumo de un escarabajo adulto fue de 9.9 s para devorar un huevo; 52.5 s, una larva; 80.9 s, una ninfa; y 210.9 s, un ácaro adulto.

Por otro lado, Rosenheim *et al.* (2004) realizaron observaciones de la comunidad de artrópodos presentes en papayo (*C. papaya*) en Hawái; encontraron que el herbívoro dominante es un ácaro, la araña carmín *T. cinnabarinus*, una especie que forma densas colonias en telarañas. Asociado a este ácaro, se encontraron dos depredadores, al comienzo de la primavera se presentó como dominante el escarabajo *S. siphonulus*, y al final de la temporada este escarabajo fue desplazado por un segundo depredador, el ácaro fitoseido *Phytoseiulus macropilis*. La evidencia experimental indicó que *P. macropilis* controla de mejor manera la población del herbívoro que *S. siphonulus*.

Collier *et al.* (2007) utilizaron al ácaro depredador *Neoseiulus idaeus* como agente de control contra el ácaro fitófago *T. urticae* en papaya. El estadio adulto de las hembras de *N. idaeus* tuvo una duración de 14 días y su tiempo generacional, así como su tasa intrínseca de crecimiento poblacional, fueron muy similares a los que presentó *T. urticae*; de lo anterior se infiere que este ácaro es una presa adecuada para *N. idaeus*.

Cheng *et al.* (2009) evaluaron la capacidad de búsqueda y consumo del crisópido *Mallada basalis* (Neuroptera: Chrysopidae) sobre dos especies de ácaros plaga en papayo, *Tetranychus kanzawai* y *Panonychus citri*. Registraron que el tercer estadio larval del depredador puede consumir aproximadamente 68 adultos y 311 huevos de *T. kanzawai* en dos horas, mientras que en el mismo periodo consume 114 adultos y 303 huevos de *P. citri*. En general, todos los estadios larvales de *M. basalis* consumieron más individuos de

*P. citri* que de *T. kanzawai*, aunque se encontraron diferencias estadísticas significativas solo para los adultos.

Cheng *et al.* (2010) evaluaron la preferencia alimenticia de los tres estadios larvales del crisópido *M. basalis* sobre los diferentes estadios de desarrollo de los ácaros *T. kanzawai* y *P. citri*, plagas importantes del papayo en Taiwán. Ninguno de los estadios larvales tuvo preferencia por alguna especie de ácaro ni entre sus estadios, todos tuvieron una alta aceptabilidad de las presas.

López-Bautista *et al.* (2016) probaron el efecto de dos especies de ácaros depredadores, *Neoseiulus californicus* y *Amblyseius swirskii*, para el control de *T. merganser* en papaya. Reportaron que la reducción de la población de *T. merganser* es muy clara con ambos depredadores, especialmente cuando 12 ácaros son introducidos por planta; *A. swirskii* fue más efectivo al reducir la población del ácaro plaga en comparación con *N. californicus*.

### **2.5.2 Uso de hongos entomopatógenos**

Los hongos constituyen un grupo diverso de organismos que se encuentran en todos los hábitats del planeta. Son reportados como patógenos o parásitos de humanos, animales, plantas, endófitos de plantas, como componentes de la microbiota del suelo, así como simbiontes de raíces (micorrizas) y de artrópodos; esta última asociación es de gran interés en la agricultura por encontrar aquí a los entomopatógenos, término que se refiere a hongos que causan enfermedades a los insectos (micosis) (Alexopoulos *et al.*, 1996; Charnley y Collins, 2007).

Las micosis por entomopatógenos son comunes y ampliamente distribuidas en poblaciones de insectos plaga, pueden regular o causar una alta mortalidad en poblaciones insectiles, mediante epizootias. Por esta característica es que se han enfocado diversos trabajos con fines de utilizarlos como micoinsecticidas. Se han descrito alrededor de 750 especies de hongos entomopatógenos agrupadas en aproximadamente 100 géneros, y el aislamiento de nuevas cepas se reporta continuamente (Roberts, 1989; Goettel *et al.*, 1990; Vega *et al.*, 2012).

El uso de hongos entomopatógenos tradicionalmente se ha enfocado en el control de insectos, mientras que las enfermedades en Acari han recibido mucha menor atención. Debido al tamaño pequeño de los ácaros se dificulta el diagnóstico de la enfermedad; sin embargo, los ácaros ofrecen un modelo de estudio muy interesante para seguir un estudio detallado de epizootiología, debido a que son relativamente fáciles de criar (van der Geest *et al.*, 2000).

### 2.5.2.1 Hongos entomopatógenos asociados con la familia Tetranychidae

De forma natural, se encuentran patógenos específicos de Acari como son *Neozygites* spp. e *Hirsutella thompsonii*. Los miembros del orden Entomophthorales (división Zygomycetes) son conocidos por infectar varias especies de insectos como mosquitos y áfidos, pero también ácaros, en particular a los “ácaros araña” (Tetranychidae). Los hongos de este grupo son capaces de causar epizootias que diezman las poblaciones de artrópodos. *N. floridana* ha sido reportada infectando de manera natural al menos a 18 especies de ácaros, todos pertenecientes a la familia Tetranychidae (Chandler *et al.*, 2000; van der Geest *et al.*, 2000; Lopes *et al.*, 2009).

Dentro de los Hyphomycetes, *H. thompsonii* es un patógeno fúngico específico de ácaros, principalmente de eriófidos como el arador de los cítricos *Phyllocoptruta oleivora* (Acari: Eriophyidae), aunque también existen reportes de su infección en tetraníquidos (Samson *et al.*, 1980).

Por otro lado, los patógenos que no se encuentran asociados de forma natural con su hospedero (artrópodo) pueden ser utilizados para probar su patogenicidad contra diferentes especies de interés en el laboratorio (Hall y Papierok, 1982).

A pesar de la cantidad de especies de hongos entomopatógenos que se han descrito, únicamente cinco especies (*Beauveria bassiana*, *Hirsutella thompsonii*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* y *Lecanicillium lecanii*) han sido estudiadas ampliamente, e incluso, están registradas para su uso como agentes de control biológico en productos comerciales (Espinel *et al.*, 2018).

El éxito de su empleo radica en que tienen una amplia gama de hospederos, tan solo *B. bassiana* tiene una lista de 700 hospederos incluidos en todos los órdenes de la clase Insecta, mientras que *M. anisopliae* se ha registrado en 300 hospederos (Li, 1988; Monzón, 2001). Con estas especies, se pueden llevar a cabo infecciones experimentales en condiciones controladas para probar la actividad patogénica de diferentes aislamientos con el objetivo de desarrollar agentes de control biológico para una plaga de interés (Maniania *et al.*, 2008). En el cuadro 2 se muestran los reportes que se tienen tanto de hongos asociados de forma natural como los evaluados en laboratorio sobre ácaros de la familia Tetranychidae, que fueron revisados ampliamente por Chandler *et al.* (2010) y van der Geest *et al.* (2010).

Cuadro 2.- Registro de hongos entomopatógenos asociados de forma natural y experimentalmente con especies de la familia Tetranychidae.

Patógeno fúngico Zygomycota	Hospedero	Patógeno fúngico Hyphomycetes	Hospedero
<b>Basidiobolus sp.</b>	<i>Tetranychus urticae</i>	<b>Acremonium strictum</b>	<i>Tetranychus</i> spp.
<b>Conidiobolus obscurus</b>	<i>Mononychellus tanajoa</i> <i>Tetranychus bimaculatus</i> <i>T. urticae</i>	<b>Aspergillus sp.</b>	<i>Mononychellus</i> sp. <i>Mononychellus tanajoa</i> <i>Oligonychus gossypii</i>
<b>Conidiobolus thromboides</b>	<i>Tetranychus urticae</i>	<b>Aspergillus depauperatus</b>	<i>Tetranychus urticae</i>
<b>Neozygites sp.</b>	<i>Mononychellus</i> sp. <i>Mononychellus tanajoa</i> <i>Panonychus citri</i> <i>Tetranychus evansi</i> <i>Tetranychus pacificus</i> <i>Tetranychus tumidus</i> <i>Tetranychus turkestanii</i> <i>Tetranychus urticae</i>	<b>Beauveria bassiana</b>	<i>Bryobia rubrioculus</i> <i>Mononychellus</i> sp. <i>Tetranychus urticae</i>
<b>Neozygites floridana</b>	<i>Bryobia</i> sp. <i>Eotetranychus sexmaculatus</i> <i>Eutetranychus banksi</i> <i>Mononychellus tanajoa</i> <i>Oligonychus gossypii</i> <i>Oligonychus hondoensis</i> <i>Oligonychus pratensis</i> <i>Panonychus citri</i> <i>Tetranychus cinnabarinus</i> <i>Tetranychus ludeni</i> <i>Tetranychus urticae</i>	<b>Fusarium sp.</b>	<i>Mononychellus</i> sp. <i>Mononychellus tanajoa</i> <i>Oligonychus gossypii</i>
<b>Neozygites tetranychii</b>	<i>Tetranychus urticae</i>	<b>Hirsutella sp.</b>	<i>Mononychellus</i> sp.
<b>Zoophthora radicans</b>	<i>Tetranychus urticae</i>	<b>Hirsutella necatrix</b>	<i>Tetranychus cinnabarinus</i>
		<b>Hirsutella thompsonii</b>	<i>Eutetranychus sexmaculatus</i> <i>Eutetranychus banksi</i> <i>Eutetranychus orientalis</i> <i>Mononychellus tanajoa</i> <i>Oligonychus gossypii</i> <i>Oligonychus ulicus</i> <i>Panonychus citri</i> <i>Tetranychus cinnabarinus</i> <i>Tetranychus turkestanii</i> <i>Tetranychus urticae</i>
		<b>Paecilomyces eriophyes</b>	<i>Panonychus ulmi</i>
		<b>Paecilomyces terricola</b>	<i>Tetranychus cinnabarinus</i> <i>Tetranychus urticae</i>
		<b>Verticillium lecanii</b>	<i>Tetranychus urticae</i>

\*Cuadro modificada a partir de Chandler *et al.* (2000) y van der Geest *et al.* (2000).



### **2.5.2.2 Evaluación en campo de hongos entomopatógenos para el manejo de ácaros**

Se han llevado a cabo pocos trabajos donde se evaluó la efectividad de estos hongos en condiciones de campo. Mikunthan y Manjunatha (2010) evaluaron el efecto de *Fusarium semitectum* (ARSEF 7233) y un acaricida (monocrotofós) para el control del ácaro blanco *P. latus* en cultivo de chile en India. Se probaron cuatro tratamientos, entre los que destacan la combinación del monocrotofós (0.05 y 0.025%) con *F. semitectum*, el cual fue formulado en una emulsión y ajustado a una concentración de  $10^8$  esporas/ml. Los resultados mostraron que tanto el hongo solo como en combinación con el acaricida fue efectivo para suprimir el efecto del ácaro blanco, teniendo mejores resultados en la combinación con la concentración 0.025% del acaricida.

Gatarayiha *et al.* (2011) probaron la eficacia de *B. bassiana* cepa R444 en una plantación de berenjena (*Solanum melongena*) en Ukulinga, Sudáfrica, utilizando una concentración de  $0.7 \times 10^{12}$  conidios/ha que fueron asperjadas cada 1, 2, 3 y 4 semanas. Los autores hacen la recomendación de que, para suprimir la población de *T. urticae* y prevenir los daños en berenjena, la aplicación del hongo debe hacerse cada dos semanas.

Zhang *et al.* (2016) realizaron la evaluación en campo del hongo *Isaria cateniannulata* en parcelas de pepino (*Cucumis sativus*), frijol, (*P. vulgaris*) y berenjena contra *T. urticae*, aplicándolo con un pulverizador eléctrico a una concentración de  $2 \times 10^7$  conidios/ml. A partir del segundo día post tratamiento, la densidad poblacional de *T. urticae* disminuyó significativamente en todos los cultivos y hacia el décimo día la mortalidad de dicho ácaro fue de 88.6% en pepino, 83.8% en berenjena y 83% en frijol.

## **2.6 ¿Qué características hacen susceptibles a los ácaros fitófagos ante el ataque de patógenos fúngicos?**

Teóricamente, los ácaros fitófagos son buenos hospederos para los hongos entomopatógenos debido a que la mayoría de ellos poseen una cutícula delgada y, además, el ambiente en el que se encuentran (hojas) proporciona un microclima húmedo ideal para su desarrollo (Ferro y Southwick, 1984; Chandler *et al.*, 2010; Van der Geest *et al.*, 2010). La susceptibilidad difiere en los diferentes estadios de desarrollo de los ácaros y se le ha atribuido principalmente a las propiedades fisicoquímicas de la cutícula (Butt *et al.*, 2016).

La cutícula determina en gran medida la forma y apariencia del insecto, es la capa más externa del integumento, la cual es secretada por la epidermis. Está formada por dos capas: a) la epicutícula, conformada por varias capas; en ella se pueden encontrar grasas y ceras. Mothes-Wagner y Seitz (1984) determinaron que la epicutícula de *T. urticae* está

compuesta de cuatro capas: cemento, cera, cuticulina y una “densa capa”. Como responsable de tener propiedades hidrofóbicas y de diferenciación superficial se ha sugerido a la capa cerosa.

b) La procutícula, que forma el 95% del espesor de la cutícula, es responsable de su rigidez, está compuesta predominantemente por quitina y diversas proteínas, pero también se pueden encontrar lípidos, pigmentos, materiales inorgánicos y pequeñas moléculas orgánicas. Esta es la capa que actúa como barrera física ya que es impermeable a las secreciones de patógenos, es resistente a la degradación por enzimas y es mecánicamente resistente a la penetración. La mayoría de las propiedades generales de la cutícula dependen de la cantidad y la organización de sus componentes, así como de la interacción entre estos (Andersen, 1979; Filshie, 1992; Hajek y Legger, 1994).

La procutícula de *T. urticae* consta de una exocutícula sin lamelas, la cual es de estructura desconocida, y en el interior, una endocutícula lamelada. Ambas capas llegan a esclerotizarse en varios grados en las diferentes regiones del cuerpo, donde se encuentra la quitina (Mothes-Wagner y Seitz, 1984; Krantz y Walter, 2009). En los estudios realizados en *T. urticae* no se encontraron canales de poros, que son típicos en los insectos (Gibbs y Morrison, 1959; Mothes-Wagner y Seitz, 1984).

Por otra parte, Soto *et al.* (2011) encontraron que los compuestos cuticulares externos más abundantes de los ácaros *T. evansi* y *T. urticae* son: ácido palmítico, ácido linoleico, metil linoleato y ácido oleico.

Andersen (1979) realizó una revisión en donde comparó diferentes propiedades de la cutícula de varios insectos y concluyó que existen diferencias muy marcadas en las propiedades mecánicas, aunque a nivel químico y estructural no son tan radicales. Si estas propiedades varían de forma importante dentro de la clase Insecta, es de esperarse que estas propiedades difieran en cierto grado con un taxón distinto como la subclase Acari y que además, estas diferencias se vean reflejadas en el grado de susceptibilidad ante el ataque de patógenos.

## **2.7 El empleo de herramientas moleculares para la identificación de patógenos fúngicos**

La vasta mayoría de las especies fúngicas pueden ser identificadas usando características morfológicas por medio de claves taxonómicas especializadas. La correcta identificación se basa en la observación adecuada de la morfología de los conidios, la célula conidiógena y el proceso de conidiogénesis, para lo cual hay diferentes métodos como la elaboración de preparaciones temporales, permanentes, microcultivos, etc. (Inglis *et al.*, 2012); sin

embargo, para algunos grupos fúngicos las características morfológicas resultan insuficientes para la delimitación entre especies (Wang *et al.*, 2013). Por esta razón, el uso de métodos moleculares ha surgido como una herramienta que ayuda a resolver los problemas asociados con el sistema de identificación fenotípica. El análisis filogenético de secuencias de nucleótidos proporciona una herramienta poderosa para investigar las delimitaciones entre especies, identificar especies nuevas y establecer relaciones evolutivas entre los taxa (Fernández-Ortuño *et al.*, 2010).

Los datos moleculares (secuencia de ADN) se han convertido en un recurso clave en la identificación de hongos, proporcionando el beneficio de que independientemente de su fenología y plasticidad morfológica, pueden analizarse. Como resultado, los últimos años han visto un progreso sustancial hacia una comprensión integral de los hongos en términos de taxonomía, sistemática y ecología (Shenoy *et al.*, 2007; Henrik *et al.*, 2014).

Una de las regiones más comúnmente utilizadas para taxonomía molecular es el espaciador interno de la transcripción (ITS) del ADN ribosomal el cual ha mostrado ser útil para resolver relaciones a nivel de especie por lo que ha sido propuesto como un código de barras universal para este grupo (Rentería, 2007; Fernández-Ortuño *et al.*, 2010). Otros marcadores (secuencias) empleados en la identificación de hongos son las regiones de genes que codifican para las subunidades de RNA polimerasa II (RPB1 y RPB2), el factor de elongación de la traducción 1- $\alpha$  y la  $\beta$ -tubulina (Inglis *et al.*, 2012).

La técnica de PCR, o reacción en cadena de la polimerasa, es una tecnología utilizada para sintetizar *in vitro* fragmentos específicos de ADN con la finalidad de amplificar una secuencia o un gen de interés en el genoma del individuo de estudio para detección, diagnóstico o posterior secuenciación. Se basa en la amplificación de fragmentos de ADN a partir de secuencias de nucleótidos denominadas cebadores (primers), que son capaces de reconocer una secuencia blanco para la cual son complementarios (Garibyan y Avashia, 2013).

El método implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos térmicos, cada uno de los cuales involucra la desnaturalización del DNA, la unión del cebador con la cadena desnaturalizada y la síntesis, a partir del cebador, de una doble cadena mediante la acción de la polimerasa. Lo anterior resulta en una acumulación exponencial de un fragmento específico de ADN (Garibyan y Avashia, 2013).

Después de la amplificación del fragmento de interés, se secuencia por el método de Sanger, el cual se utiliza un solo iniciador y se agregan dideoxinucleótidos (ddNTPs) que carecen del grupo hidroxilo 3' y están marcados con radiactividad o con fluoróforos. Cuando se incorpora un dideoxinucleótido a la cadena en elongación, se termina su

amplificación, de tal manera que al final, se tienen fragmentos de diferente longitud terminado en un ddNTPs (Sanger *et al.*, 1977).

Una vez obtenida la secuencia de interés, esta puede ser comparada con secuencias de referencia depositadas en bases de datos públicas, lo que permite la identificación o caracterización del hongo. La forma más fácil de análisis es por medio de la herramienta BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool) dentro de las bases de datos de secuencias como GeneBank del National Center of Biotechnology Information (NCBI); así, los nombres asociados con estas secuencias idealmente permiten la identificación del organismo en cuestión o puede al menos proporcionar los nombres de las especies más relacionadas (Inglis *et al.*, 2012).

### **3. Justificación**

En los últimos años, los productores de papaya en el estado de Campeche han incrementado las quejas de daños en sus cultivos por ácaros como la “araña roja” y el “ácaro blanco”. A pesar de que a nivel nacional se cuenta con estudios taxonómicos sobre acarofauna asociada a este cultivo (Flores *et al.* 2011, Valencia-Domínguez *et al.*, 2011; Abato-Zárate *et al.*, 2014), en el estado no se tienen identificadas a las especies que afectan directamente esta actividad.

La alta incidencia de ácaros plaga y la baja efectividad de los acaricidas comerciales han obligado a los productores a buscar alternativas al control químico que les ayuden a reducir las poblaciones de ácaros para mitigar los daños a sus plantaciones. Por todo lo anterior, se hace prioritario identificar al complejo de ácaros presente en las principales zonas papayeras del estado para dirigir la investigación hacia su control y, de esa forma, ofrecer a los productores un producto efectivo, seguro de usar y que no cause daños al ambiente ni a la salud.

#### **4. Hipótesis**

La mayor diversidad de hongos entomopatógenos se encuentran en el grupo Hyphomycetes, encontrados de forma natural en cadáveres de artrópodos; sin embargo, este grupo no es reportado de manera frecuente como patógeno natural de tetránquidos.

Considerando que este grupo fúngico posee una amplia gama de hospederos se espera que, independientemente de la fuente de aislamiento del patógeno, *Tetranychus merganser* sea susceptible en condiciones experimentales a al menos uno de ellos.

#### **5. Objetivos**

##### **5.1 General**

Seleccionar, con base en su infectividad, cepas de cuatro especies de hongos entomopatógenos con potencial de controlar a *Tetranychus merganser*, plaga emergente del papayo.

##### **5.2 Particulares**

1. Identificar a las especies de ácaros presentes en las principales zonas productoras de papaya del estado de Campeche.
2. Determinar por medio de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y el tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) las cepas fúngicas más virulentas contra *T. merganser*.
3. Verificar la efectividad de las cepas más virulentas sobre plántulas de papayo infestadas con *T. merganser*.
4. Realizar la identificación molecular de los aislamientos de *Lecanicillium* sp. por medio de la amplificación de los genes ITS, factor de elongación de la traducción 1-alfa (EF1- $\alpha$ ) y el ribosomal 18S.

## 6. Metodología

### 6.1 Colecta e identificación de los ácaros asociados al cultivo de papayo

#### 6.1.2 Sitios de colecta

El estado de Campeche se ubica geográficamente en la región sureste del territorio nacional. Ocupa la porción poniente y poniente-sur de la Península de Yucatán. La entidad se encuentra ubicada entre los paralelos 20°51' y 17°49' de latitud norte y los meridianos 89°09' y 92°24' de longitud oeste. Fisiográficamente pertenece a la Península de Yucatán y a la llanura costera del Golfo Sur (INEGI, 2017). Cuenta con dos tipos de clima, cálido húmedo con lluvias en verano (Am(w)) y cálido subhúmedo con lluvias en verano (Aw) (García, 1964), con una temperatura media anual de 27°C y una precipitación media anual de 1,356 mm (INEGI, 2017).

Se muestrearon huertos de papayo de junio 2017 a noviembre de 2018, llevando a cabo de dos a tres colectas por huerto en los municipios de Champotón (Hool), Tenabo (Tinún y Nilchí), Candelaria (“El Chelón”) y Campeche (Nohyaxché) (Fig. 1) (ver Anexo 2).

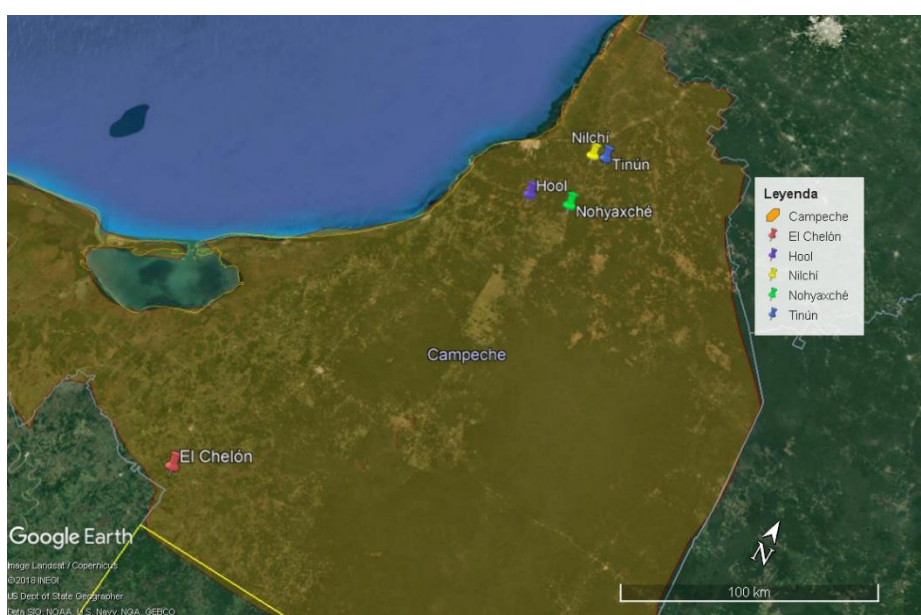


Figura 1.- Huertos de papayo muestreados en el estado de Campeche durante 2017 y 2018.

#### 6.1.3 Colecta de los ácaros asociados al papayo

Dentro de las parcelas, se seleccionaron al azar 15 plantas de las cuales se tomaron dos hojas del estrato bajo (hojas completamente desarrolladas y maduras), estas se colocaron dentro de una bolsa de plástico debidamente etiquetada y se transportaron al Laboratorio de Control Microbiano de Plagas del Campus Campeche del Colegio de Postgraduados.

En el laboratorio, se examinó el material vegetal bajo el microscopio estereoscópico y con ayuda de un pincel muy fino se tomaron todos los ácaros presentes en las muestras. Los ejemplares se colocaron en ácido láctico por siete días para su aclarado y posteriormente se realizó el montaje de los especímenes entre porta y cubreobjetos en líquido de Hoyer con la técnica de Henderson (2001). Las preparaciones se dejaron secar a 55°C por 15 días. Finalmente se sellaron con barniz de uñas transparente y se les colocaron las etiquetas de localidad e identificación taxonómica correspondientes.

#### **6.1.4 Identificación taxonómica**

La identificación a nivel de familia se realizó siguiendo la clave de Gerson *et al.* (2003) y para la determinación de géneros y especies de tetraníquidos se utilizó la clave de Tuttle *et al.* (1976) en donde una de las características taxonómicas determinantes es la forma del edeago. La corroboración de los especímenes la realizó el Dr. Gabriel Otero Colina, especialista en Acari.

Con base en las colectas realizadas, a la severidad de las infestaciones observadas en campo y dada la importancia que representa *T. merganser* para el papayo, se determinó utilizar esta especie para las pruebas con hongos entomopatógenos.

#### **6.2 Establecimiento de la colonia de *T. merganser***

La colonia se estableció sobre frijol (*P. vulgaris*), un hospedero alternativo. En vasos de unicel de 350 ml, se llenaron de tierra previamente humedecida; se hicieron tres hoyos a manera de triángulo en donde se depositaron las semillas de frijol negro variedad Jamapa y se regaron al finalizar.

Los vasos con las semillas se introdujeron en una jaula cubierta con malla antiáfidos donde se garantizó que no se estableciera ningún otro artrópodo (Fig. 2). Una vez que las plantas tuvieron 15 días de germinadas y aproximadamente 20 cm de altura, se inocularon con *T. merganser*, colocando un fragmento de hoja de papaya infestadas en las plantas de frijol; una baja densidad de ácaros fue suficiente para infestar las plantas, ya que los ácaros buscan activamente su fuente de alimento. Las plantas inoculadas se introdujeron a otra jaula para que no llegaran depredadores u otros ácaros que pudieran desplazar la población de la especie de interés.

Cada tercer día se regaron las plantas y se revisó el progreso de la colonia, hasta obtener una densidad poblacional aproximada de 200 ácaros por hoja. Cada dos semanas se introdujeron plántulas nuevas de frijol a la colonia, o antes, de acuerdo al crecimiento de la población.





Figura 2.- Plántulas de frijol de 15 días después de la germinación (izquierda); jaula con malla antiáfidos la cual no permite la entrada ni salida de organismos (derecha).

### 6.3 Evaluación de hongos entomopatógenos en condiciones de laboratorio

#### 6.3.1 Resiembra y activación de cepas de hongos entomopatógenos

Se utilizaron en la evaluación un total de 31 cepas, correspondientes a *B. bassiana* (11) y *M. anisopliae* (10) de la colección de hongos entomopatógenos del Laboratorio de Control Microbiano de Plagas del Colegio de Postgraduados, Campus Campeche, cuya característica es que son aislamientos nativos del estado de Campeche; una cepa de *Hirsutella thompsonii* var. *sinematosa* (CHE-CNRCB 377) proveniente de la Colección de Hongos Entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia del SENASICA y nueve aislamientos de *Lecanicillium* sp. que fueron obtenidas del colémbolo *Onychiurus folsomi* (Collembola: Onychiuridae) en la Ciudad de México (Alfaro-Valle, 2016) (Cuadro 3).

Todos los hongos (con excepción de *H. thompsonii*) se crecieron en medio PDA (papa dextrosa agar) y se incubaron a 28°C; mientras que *H. thompsonii* se creció en medio H y en SDAY (Sabouraud dextrosa agar con extracto de levadura) y se incubó a 26°C junto con los aislamientos de *Lecanicillium* sp. hasta la conidiogénesis.

Cuadro 3.- Características de las cepas utilizadas en este estudio

Especie	Cepa	Fuente de aislamiento	Localidad	Identificación	Referencia	
<i>Beauveria bassiana</i>	Bb005	Suelo	Calakmul, Cam	morf/molecular	Pech-Chuc, 2008	
	Bb014	Larva no identificada	Calakmul, Cam	morf/molecular	Pech-Chuc, 2008	
	Bb015	Suelo	Calakmul, Cam	morf/molecular	Pech-Chuc, 2008	
	Bb016	Suelo	Calakmul, Cam	morf/molecular	Pech-Chuc, 2008	
	Bb017	Suelo	Calakmul, Cam	morf/molecular	Pech-Chuc, 2008	
	Bb018	Suelo	Calakmul, Cam	morf/molecular	Pech-Chuc, 2008	
	Bb019	Suelo	Calakmul, Cam	morf/molecular	Pech-Chuc, 2008	
	Bb020	Coleoptera no identificado	Calakmul, Cam	morf/molecular	Pech-Chuc, 2008	
	Bb021	Suelo	Calakmul, Cam	morf/molecular	Pech-Chuc, 2008	
	Bb022	Suelo	Calakmul, Cam	morf/molecular	Pech-Chuc, 2008	
	Bb023	Suelo	Calakmul, Cam	morf/molecular	Pech-Chuc, 2008	
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Ma002			morf/molecular	Pech-Chuc, 2008
		Ma003			morf/molecular	Pech-Chuc, 2008
		Ma004	Cercopidae	Calakmul, Cam	morf/molecular	Pech-Chuc, 2008
Ma005		Suelo	Calakmul, Cam	morf/molecular	Pech-Chuc, 2008	
Ma006		Cercopidae	Calakmul, Cam	morf/molecular	Pech-Chuc, 2008	
Ma007		Suelo	Calakmul, Cam	morf/molecular	Pech-Chuc, 2008	
Ma008		Suelo	Calakmul, Cam	morf/molecular	Pech-Chuc, 2008	
Ma009		Suelo	Calakmul, Cam	morf/molecular	Pech-Chuc, 2008	
Ma014				morf/molecular	Pech-Chuc, 2008	
Ma034		Cercopidae	Calakmul, Cam	morf/molecular	Pech-Chuc, 2008	
<i>Lecanicillium</i> sp.	Lec 3	<i>Onychiurus folsomi</i> (Collembola: Onychiuridae)	Alvaro Ob., CDMX	Morfológico	Alfaro-Valle, 2016	
	Lec 8	<i>O. folsomi</i>	Alvaro Ob., CDMX	Morfológico	Alfaro-Valle, 2016	
	Lec 9	<i>O. folsomi</i>	Alvaro Ob., CDMX	Morfológico	Alfaro-Valle, 2016	
	Lec 25	<i>O. folsomi</i>	Alvaro Ob., CDMX	Morfológico	Alfaro-Valle, 2016	
	Lec 26	<i>O. folsomi</i>	Alvaro Ob., CDMX	Morfológico	Alfaro-Valle, 2016	
	Lec 28	<i>O. folsomi</i>	Alvaro Ob., CDMX	Morfológico	Alfaro-Valle, 2016	
	Lec 34	<i>O. folsomi</i>	Alvaro Ob., CDMX	Morfológico	Alfaro-Valle, 2016	
	Lec 50	<i>O. folsomi</i>	Alvaro Ob., CDMX	Morfológico	Alfaro-Valle, 2016	
	Lec 54	<i>O. folsomi</i>	Alvaro Ob., CDMX	Morfológico	Alfaro-Valle, 2016	
	<i>Hirsutiella thompsonii</i> var. <i>sinematosa</i>	CHE-CNRCB 377	<i>Phyllocoptruta oleivora</i> (Acari: Eriophyidae)	Ixtlahuacan, Colima	morf/molecular	SENASICA, 2016

Cam: Campeche, Alvaro Ob.: Alcaldía Alvaro Obregón, morf: morfológico

Una vez que alcanzaron la maduración (tiempo variable), se realizó la recuperación de conidios. En condiciones de asepsia se agregaron 10 ml de agua destilada estéril con tritón 0.01% a las cajas maduras, y con ayuda de una varilla de vidrio, se raspó todo el crecimiento fúngico presente para liberar los conidios. Posteriormente, la solución de conidios se colectó en un tubo Falcón de 50 ml estéril y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos. Se eliminó parte del sobrenadante para dejar un volumen final de 5 ml. Se homogenizó con el agitador mecánico y se realizaron diluciones con un factor de 10 hasta  $10^{-5}$  para hacer la cuantificación en la dilución que permitiera mejor el conteo.

La cuantificación de conidios se realizó con una cámara de Neubauer, la cual se llenó con 10  $\mu$ l de la dilución seleccionada y se observó al microscopio de contraste de fases contando los cuadros de las esquinas y el cuadro central; se realizó por quintuplicado. Para calcular la concentración final se utilizó la fórmula de acuerdo al fabricante:

$$C = \frac{(\bar{x})(1 \times 10^6)(\text{dilución})}{80}$$

C: concentración final conidios/ml

$\bar{x}$ : promedio de los cinco conteos

Dilución: factor de dilución utilizada para contar.

A partir de esta concentración se ajustó a las concentraciones a utilizar.

## **6.3.2 Infectividad de las cepas de hongos entomopatógenos sobre *T. merganser***

### **6.3.2.1 Determinación y establecimiento del ensayo**

Previo a la evaluación de infectividad se realizaron una serie de ensayos para determinar el mejor método que permitiera reproducibilidad en las evaluaciones finales. Los métodos seleccionados se escogieron con base en FAO (1974) y fueron: a) inmersión de hojas infestadas, b) inmersión en portaobjetos, c) película residual en caja Petri, d) película residual en tubo de ensaye. Además, se realizaron dos modificaciones a la técnica de aspersión de conidios (e). Se describirán de forma breve a continuación:

#### **6.3.2.1.1 a) Inmersión de hojas infestadas**

Una hoja pequeña de papayo que tuviera una cantidad suficiente de hembras de *T. merganser* se cortó de la planta y se realizó el conteo de las hembras en el estereoscopio (mínimo 20 hembras presentes). Este fragmento se sumergió en la solución de conidios ( $1 \times 10^8$  conidios/ml) por 10 s y se dejó secar sobre papel estroza. Una vez seca, se colocó sobre una esponja saturada de agua dentro de una charola de plástico.

#### **6.3.2.1.2 b) Inmersión en portaobjetos**

Sobre un portaobjetos se colocó un fragmento de cinta adhesiva con la cara adhesiva hacia arriba en uno de los extremos. Al portaobjetos se le colocó una hoja de la colonia de ácaros ejerciendo una ligera presión, de tal forma que los ácaros quedaran adheridos a la cinta. Posteriormente se sumergió por 10 s en la solución de conidios, se retiró el exceso de la solución, se dejó secar sobre papel estroza y se colocó sobre una esponja saturada de agua.

#### **6.3.2.1.3 c,d) Película residual en caja Petri y tubo de ensaye**

Este método consiste en distribuir 1 ml de la solución de conidios por toda la superficie, ya sea en la base de la caja Petri o por toda la pared del tubo y dejar secar completamente. Una vez secos, se pasaron con ayuda de un pincel fino 20 hembras de *T. merganser*, la caja Petri se selló con plastilina para evitar que los ácaros escapen, mientras que el tubo se tapó con papel aluminio.

#### **6.3.2.1.4 e) Aspersión de conidios**

El sistema fue: 1- delimitar el perímetro de la hoja de papayo con vaselina para evitar que los ácaros escapen de la superficie tratada y 2- colocar el fragmento de hoja sobre una esponja saturada de agua inmersa en una charola. Una vez listos los sistemas se colocaron con ayuda de un pincel fino 20 hembras de *T. merganser*.

En la campana de flujo laminar se asperjó 1 ml de la solución de conidios con ayuda de un atomizador de capacidad de 5 ml sobre los ácaros de prueba a una distancia aproximada de 15 cm y se dejó que se secase por completo toda la solución aplicada.

Todos los métodos probados presentaron ventajas y desventajas, cabe mencionar que de algunos métodos como el de inmersión en portaobjeto no se obtuvieron resultados, sin embargo, se logró determinar que el método de capa residual en hoja fue el que presentó los mejores resultados (se describe a detalle más adelante).

### **6.3.2.2 Ensayo establecido**

Con base en las experiencias obtenidas con los diferentes métodos probados y a la principal problemática presentada que fue el crecimiento de hongos saprófitos sobre la superficie foliar, se propuso una técnica de asepsia en combinación con el método seleccionado el cual se describe a continuación:

Una hoja de papayo sana y madura se lavó con agua y jabón retirando el exceso de agua; se cortaron discos de 3 cm de diámetro con un sacabocados y se colocaron en una caja Petri limpia.

En condiciones de asepsia, en un frasco estéril de 500 ml se vertieron 200 ml de agua destilada estéril y se le adicionaron 10  $\mu$ l de jabón líquido Axión y 2 ml de hipoclorito de sodio (Cloralex 6%), para tener una concentración final de 0.06%. Una vez que se incorporó el cloro, se introdujeron con pinzas los discos de hojas, se tapó el frasco y se agitó fuertemente por un minuto. Se decantó el agua jabonosa y se realizó un primer enjuague con agua destilada estéril (ADE) para retirar la mayor parte del jabón, posteriormente los discos se pasaron a otro frasco estéril realizando tres enjuagues adicionales con ADE. Los discos se colocaron sobre una toalla de papel estéril y con el flujo de aire de la campana de flujo laminar se secaron.

Para la aplicación de los conidios se utilizó el método de capa residual en hoja de la FAO (1974) con las siguientes modificaciones: en un vaso de precipitado de 50 ml estéril, se colocaron 2 ml de una concentración  $1 \times 10^8$  conidios/ml de la cepa a evaluar, sumergiendo los discos de hoja secos por 30 s. Estos discos nuevamente se dejaron secar completamente en una toalla de papel estéril.

Por otro lado, en una caja Petri de 5 cm de diámetro se colocó un fragmento rectangular (3.6 x 3.3 x 0.5 cm) de esponja comercial oasis (vermiculita), la cual se saturó con agua destilada y sobre ella se colocó el disco de hoja tratado completamente seco, cuidando que el haz tocara la esponja y el envés quedara por arriba. Se aseguró que el disco quedara completamente adherido a la esponja y se retiró el exceso de agua. Este sistema conformó

una “arena de observación” (Fig. 3a) que fue definida como una unidad experimental. Para el tratamiento testigo, los discos se sumergieron en agua destilada estéril con tritón 0.01%.

En cada unidad experimental se introdujeron 20 hembras adultas de *T. merganser* con ayuda de un pincel muy fino (Fig. 3b). Las unidades experimentales se mantuvieron tapadas a una temperatura de 28°C y se evaluó la mortalidad de los ácaros del tercero al sexto día; considerando el criterio de mortalidad como el crecimiento del micelio a través del cuerpo. Se confirmó la identidad del patógeno, pasando los ácaros micosados a una cámara húmeda estéril para permitir la esporulación del hongo y confirmar la mortalidad por el patógeno.

Se seleccionaron para una segunda evaluación las cepas que causaron por arriba del 75% de mortalidad.



Figura 3.- a) Arena montada: base de la caja, esponja-hoja; b) hembras de *T. merganser* sobre el disco de hoja tratado.

### 6.3.3 Evaluación de agresividad (obtención de CL<sub>50</sub> y TL<sub>50</sub>)

Para estimar la agresividad de las cepas sobre *T. merganser*, se determinó la ventana de respuesta biológica VRB (intervalo en el que se produjo entre cero y 100% de mortalidad) evaluando un total de cinco concentraciones ( $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^4$  conidios/ml) más el testigo mediante la metodología descrita en la sección anterior.

El rango de concentraciones descrito corresponde a un tratamiento y cada tratamiento correspondió a una cepa probada. Se realizaron tres réplicas independientes válidas y se evaluó la mortalidad del tercer al sexto día tomando el mismo criterio de mortalidad y registrando la mortalidad acumulada por día.

Los datos obtenidos de mortalidad acumulada se corrigieron con la fórmula de Abbott y se analizaron con el software Minitab 14, utilizando la función análisis probit de donde se determinó la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y el tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) de cada cepa.

La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) se refiere a aquella concentración calculada estadísticamente que produce el 50% de mortalidad en la población de prueba, mientras que el tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) es el valor medio del intervalo de tiempo calculado estadísticamente, durante el cual se espera que muera el 50% de una población dada tras la administración aguda de un agente químico o físico; en este caso, de los hongos entomopatógenos.

#### **6.4 Verificación de las cepas de hongos entomopatógenos sobre plántulas de papayo infestadas**

##### **6.4.1 Producción escalada de hongos entomopatógenos**

Del análisis probit anterior se escogieron las tres cepas más agresivas contra *T. merganser*, las cuales se pasaron por un proceso de producción que consta de dos fases: en la primera se produce la fase micelial del hongo y en la segunda se utilizó arroz como sustrato para la producción de conidios (Tafoyan, 1999). Para este experimento se omitió la fase de la producción del inóculo fúngico, este se tomó a partir de una caja completamente esporulada del hongo en cuestión, recuperando las esporas como se mencionó en sección de resiembra y activación de cepas de hongos entomopatógenos. Todo este proceso se siguió de acuerdo a lo estandarizado en la Unidad de Producción de Bioinsecticidas (UPBIO®) del Campus Campeche.

###### **6.4.1.1 Preparación del sustrato sólido (arroz)**

En 2 L de agua con 25 ml de hipoclorito de sodio se pusieron a remojar 2 Kg de arroz por 30 minutos agitándolos ocasionalmente, después se enjuagó el arroz con abundante agua para quitar el exceso de cloro y se dejó escurrir. Posteriormente se colocaron porciones de 250 g de arroz ya remojado en bolsas de polipapel, las cuales se esterilizaron por 40 minutos a 15 libras (1.05 kg/cm<sup>2</sup>) de presión.

###### **6.4.1.2 Producción de conidios**

Una vez frías las bolsas de arroz se procedió a inocularles el hongo. Con ayuda de una jeringa de uso veterinario, a cada bolsa se inyectaron 10 ml de las esporas recuperadas, el orificio de la aguja se selló con cinta adhesiva y el inóculo en las bolsas se homogenizó de forma manual. Las bolsas inoculadas se incubaron a 28°C durante 15 d en la zona de maduración.

#### **6.4.2 Preparación de concentraciones para ensayo de infectividad en plántulas**

A 1 L de agua destilada se le adicionó 1 ml de agente adherente LAPA (Nonil fenol polietilénico). Se abrió por una orilla una bolsa con conidios maduros y se le adicionaron 200 ml del agua que se preparó previamente; con esta se lavó el arroz para tratar de recuperar el mayor número de conidios posibles, posteriormente se coló el arroz y se recuperó el filtrado en una botella limpia. Se realizó el mismo procedimiento con dos bolsas más y al finalizar se aforó a 1 L. Una vez obtenidos los conidios, se tomaron tres alícuotas de 1 ml con las cuales se realizó el conteo con la cámara de Neubauer para estimar la concentración obtenida.

#### **6.4.3 Obtención de plántulas de papayo**

Se utilizaron semillas de papayo var. Maradol que fueron donadas por un productor cooperante. En un domo pastelero de plástico rectangular de 45.7 x 33 x 11.4 cm se mezclaron en una proporción 50:50 Peat Moss y suelo estéril, en este sustrato se colocaron 50 semillas dispuestas en cinco hileras de diez semillas cada una, enterrándolas a una profundidad de 0.5 cm. Se cubrieron las semillas con el sustrato y este se humedeció. Se les adicionó agua cada tercer día y se dio seguimiento hasta su germinación. Las plántulas germinadas se dejaron crecer por un mes para su posterior trasplante a bolsas de vivero de 10 kg.

Se utilizó una mezcla de tierra roja y vermiculita (50:50) como sustrato para llenar las bolsas, el cual se preparó de la siguiente manera: después de que la tierra se cernió, se acomodó por capas y a cada capa se le asperjó etanol al 80%, así sucesivamente hasta terminar con toda la tierra formando un montículo. Una vez formado el montículo, se asperjó etanol 80% en todo el derredor y se cubrió perfectamente con un plástico grueso negro. El montículo se situó en un lugar donde el sol llegaba directamente para que el etanol se evaporara por 48 h. Transcurrido el tiempo, se destapó el montículo y se mezcló con la vermiculita, hasta que esta se había incorporado por completo con la tierra, manteniendo la proporción 50:50. Se llenaron las bolsas y las plántulas se trasplantaron individualmente.

Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero (30°C, 86% HR), se regaron cada tercer día y una vez por mes se les aplicó fertilizante foliar 20-30-10. Se dejó que las plantas crecieran por cuatro meses, alcanzaran una altura de 35 cm y desarrollaran 10 hojas.

#### **6.4.4 Evaluación**

Se evaluaron cuatro tratamientos distribuidos en un diseño completamente al azar: tres cepas de hongos (Ma005, Ma034 y Ma003) más el testigo. Cada tratamiento constó de

cinco plantas a las que se inocularon en la quinta hoja 20 hembras de *T. merganser*, permitiendo que la población creciera por 15 días. Las plantas inoculadas se sacaron del invernadero y se colocaron en una jaula de 2 x 1.5 x 1 m cubierta con malla antiáfidos (Fig. 4).

El día previo a la aplicación de los hongos, se prepararon las suspensiones de conidios de las cepas que se pasaron por el proceso de producción escalonada; ajustando a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/ml en 200 ml de volumen final, se mantuvieron por 18 h en refrigeración hasta su uso.

Al día 15 posterior a la inoculación de los ácaros, se realizó la evaluación de la densidad poblacional, contando el número de estadios móviles presentes en la hoja inoculada con ayuda de una lupa de mano con 5X de zoom y posteriormente se realizó la aplicación de los entomopatógenos con un atomizador de plástico de 1000 ml de capacidad, aplicando 30 ml por planta a una distancia de 30 cm, procurando que el rocío bañara por completo ambos lados de las hojas. A las plantas testigo se le aplicó agua común.

Las plantas se mantuvieron dentro de la jaula en condiciones ambientales (26.9°C promedio y 64-70% RH) (SMN, 2019), realizando las evaluaciones al 3°, 5° y 7° día posterior a la aplicación de los entomopatógenos, revisando la presencia de ácaros micosados.

Los datos obtenidos del número total de ácaros micosados por tratamiento se analizaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA) con el software Minitab 14 para distinguir diferencias entre los tratamientos.



Figura 4.- Disposición de las plántulas de papayo dentro de la jaula, de izquierda a derecha: testigo, T1(HMa003), T2(HMa034), T3 (HMa005).



## **6.5 Identificación molecular de las cepas de *Lecanicillium* sp.**

Como se muestra en el cuadro 3, los aislamientos de *Lecanicillium* sp. son los únicos que están identificados a género por medio de características morfológicas, por lo que la confirmación y determinación a especie por medio de la amplificación y secuenciación de tres genes es importante para la comparación de los resultados obtenidos. Además, dicha caracterización es necesaria para que estos aislamientos formen parte de la Colección de Hongos Entomopatógenos del Laboratorio de Control Microbiano de Plagas.

### **6.5.1 Producción de micelio para la extracción de ADN**

En matraces de 250 ml con 30 ml de caldo de papa y dextrosa, se inocularon todos los aislamientos de *Lecanicillium* que se crecieron previamente en PDA. Estos se incubaron a 28°C en agitación constante por 8 d. Posteriormente, se recuperó la biomasa generada por medio de filtración con un papel filtro estéril, lavando perfectamente el micelio con agua destilada estéril hasta eliminar por completo el medio de cultivo. El micelio filtrado se colocó en tubos Eppendorf que se mantuvo a -80°C para su posterior utilización.

### **6.5.2 Extracción de ADN**

Se siguió el protocolo de Reader y Brota (1985) (Anexo 1), el cual utiliza un buffer de extracción con SDS al 0.5%, extracción con fenol-cloroformo y precipitación con isopropanol. Se confirmó el estado físico del ADN recuperado en gel de agarosa al 1%. La concentración obtenida se determinó mediante medición por espectrofotometría en un Nanodrop ND-1000.

### **6.5.3 Amplificación por PCR utilizando diferentes marcadores moleculares**

Para la identificación de los aislamientos se utilizaron oligonucleótidos universales dirigidos a la región espaciadora intergénica (ITS) localizada entre los genes que codifican para las subunidades 18S y 28S de los rADNs fúngicos, el factor de elongación de la traducción 1-alfa (EF1- $\alpha$ ) y el gen ribosomal 18S. Para todos los genes se ajustó a un volumen final de 40  $\mu$ l y se utilizó el kit comercial pre-mezclado PCR Supermix® (High Fidelity) siguiendo las instrucciones del comerciante. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se muestran en el cuadro 4, las condiciones de reacción pueden consultarse en los anexos (3 y 4). Los productos de PCR se verificaron por medio de electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1%, por medio del peso molecular de la banda.

Cuadro 4.- Secuencia de lo oligonucleótidos empleados para la amplificación de tres genes.

Gen	Secuencia oligonucleótidos	Tamaño esperado (pb)	Referencia
<b>ITS</b>	TCCGTAGGTGAACCTGCGG (ITS1)	520-560	White <i>et al.</i> , 1990
	TCCTCCGCTTATTGATATGC (ITS4)		
<b>EF1-<math>\alpha</math></b>	ATGGGTAAGGARGACAAGAC (EF1T)	1200	Rehner y Buckley 2005
	ACHGTRCCRATACCACCSATCTT (1567R)		
<b>18S</b>	GTAGTCATATGCTTGTCTC (NS1)	1744-1760	White <i>et al.</i> , 1990
	GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC (NS6)		

#### 6.5.4 Purificación de los productos de amplificación

Los fragmentos de ADN obtenidos por PCR se purificaron utilizando dos kits: QIAquick® PCR Purification para los ITS y QIAquick® 96 PCR Purification para los fragmentos del 18S y EF1- $\alpha$ , siguiendo las instrucciones del fabricante para su posterior envío para secuenciación.

#### 6.5.5 Secuenciación y análisis de las secuencias

Los fragmentos purificados de los genes amplificados de los aislamientos de *Lecanicillium* se mandaron a secuenciar al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (Langebio), en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Guanajuato.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas se editaron mediante el programa BioEdit 7.0.5.3, donde se eliminaron las zonas de baja calidad y en el caso de las secuencias reversas, se obtuvo el reverso complemento. Después de que las secuencias fueron curadas, se realizó la reconstrucción de secuencias consenso por medio del alineamiento con el programa Clustal X (1.83) y finalmente se realizó la comparación de cada secuencia obtenida con las secuencias depositadas en el Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI) mediante la aplicación BLAST para su identificación.

## 7. Resultados

### 7.1 Identificación de los ácaros asociados al cultivo de papayo

Todos los huertos muestreados cultivaban la variedad Maradol, con excepción de “El Chelón”, donde se registró la variedad Tainung. Las especies de ácaros plaga encontrados fueron *T. urticae* y *T. merganser* (Fig. 5), los que mostraron un comportamiento mutuamente excluyente; es decir, en la localidad donde se registró una especie no se encontró la otra, excepto la localidad Nilchí, en donde se encontraron ambas especies, siendo dominante *T. urticae*.

*Tetranychus urticae* se registró en dos municipios Champotón (Hool) y Tenabo (Tinún y Nilchí), mientras que *T. merganser* se encontró en tres municipios, Candelaria (“El Chelón”), Campeche (Nohyaxché) y Tenabo (Nilchí), además de que las infestaciones más severas que se registraron en campo fueron causadas por este último. Por estas razones se seleccionó a *T. merganser* como la especie en la que se evaluaron los hongos entomopatógenos.

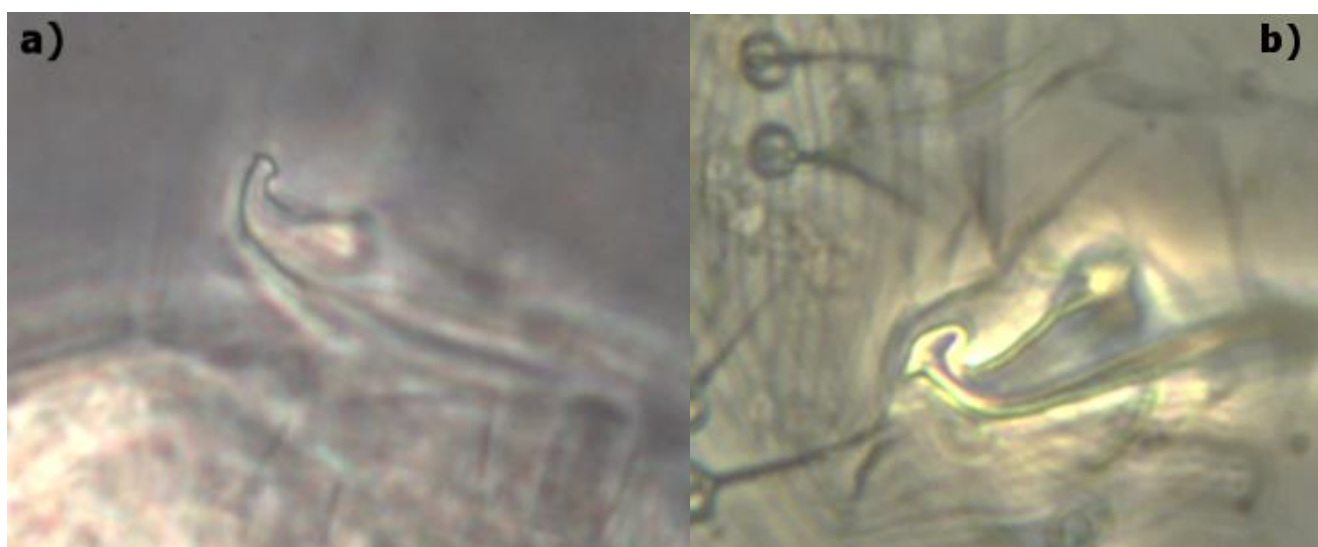


Figura 5.- Algunas formas del edeago en el género *Tetranychus*, a) *Tetranychus urticae*; b) *Tetranychus merganser*.

Además de ácaros fitófagos, también se encontraron ácaros depredadores pertenecientes a la familia Phytoseiidae. Se identificaron dos géneros diferentes: *Neoseiulus* y *Galendromus*. En la localidad de “El Chelón” fue donde se apreció una alta abundancia de estos, llegando a encontrar hasta 24 ejemplares por hoja de *Neoseiulus* y nueve ejemplares de *Galendromus*.

## 7.2 Cría de *Tetranychus merganser*

El método utilizado fue sencillo de montar y se obtuvo una gran cantidad de individuos de diferentes estadios de desarrollo en poco tiempo, ya que en 15 días se podía apreciar el crecimiento de la colonia en las plantas hasta ser detectable el incremento de las hembras adultas, que era señal para poder realizar un bioensayo (Fig. 6). Por sí sola, la colonia llegó a crecer tanto que se pudieron encontrar a los ácaros por ambos lados de las hojas formando telaraña muy densa, agotando en un tiempo de tres semanas todo el material vegetal proporcionado. Por ello, el éxito en el mantenimiento de una colonia fue el constante reemplazo de las plántulas de frijol, con las características que se mencionaron en la sección de métodos.



Figura 6.- Plantas de frijol (*P. vulgaris*) con síntomas del ataque de *T. merganser*. a) zonas cloróticas debido a la alimentación de los ácaros; b) las flechas rojas señalan la presencia de ácaros en el envés de las hojas.

## 7.3 Susceptibilidad de *T. merganser* a hongos entomopatógenos

Las hembras adultas de *T. merganser* resultaron ser susceptibles a todos los aislamientos probados, con excepción de *H. thompsonii*, que a pesar de que se realizaron tres repeticiones en tiempos y concentraciones diferentes ( $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^7$  conidios/ml), no se presentó un solo individuo infectado.

Esta prueba mostró que *T. merganser* es más susceptible a las cepas de *M. anisopliae* que a las de *B. bassiana*, ya que la primera especie fúngica causó porcentajes de mortalidad por arriba del 70% con ocho de las 10 cepas al cabo de cuatro días posteriores a la infección, en contraste con lo ocurrido con *B. bassiana*, donde solo tres cepas causaron este efecto y tardó más tiempo. Cinco cepas de *M. anisopliae* (Ma003-005, Ma014 y Ma034), y una de *B. bassiana* (Bb016) causaron el 100% de mortalidad en los ácaros de

prueba al cuarto y quinto día, respectivamente. Además de esto, se observó infectividad hacia los huevos por la mayoría de las cepas de *M. anisopliae* y algunas cuantas cepas de *B. bassiana* (Fig. 7).



Figura 7.- Mortalidad acumulada (%) de las hembras de *T. merganser* provocada por las diferentes cepas probadas con una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/ml a) Mortalidad provocada por *B. bassiana* al quinto día post-infección. b) Mortalidad provocada por *M. anisopliae* al cuarto día post-infección. \* infectividad en huevos.

*Tetranychus merganser* se presentó como poco susceptible a la infección por los aislamientos de *Lecanicillium* sp. a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/ml. La mortalidad más baja fue de 5% (Lec34 y 50) y la máxima del 60% con el aislamiento Lec54; mientras que cinco de ellos provocaron una mortalidad entre el 35 y 40% (Fig. 8). Al no presentar ninguno de los aislamientos por lo menos el 75% de mortalidad, no se consideraron con potencial de uso para el control de esta especie.

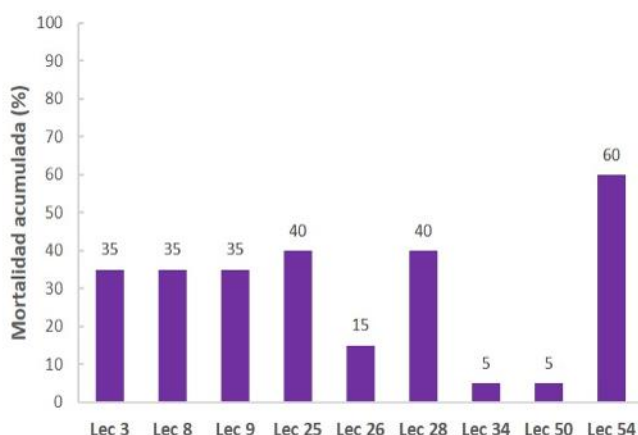


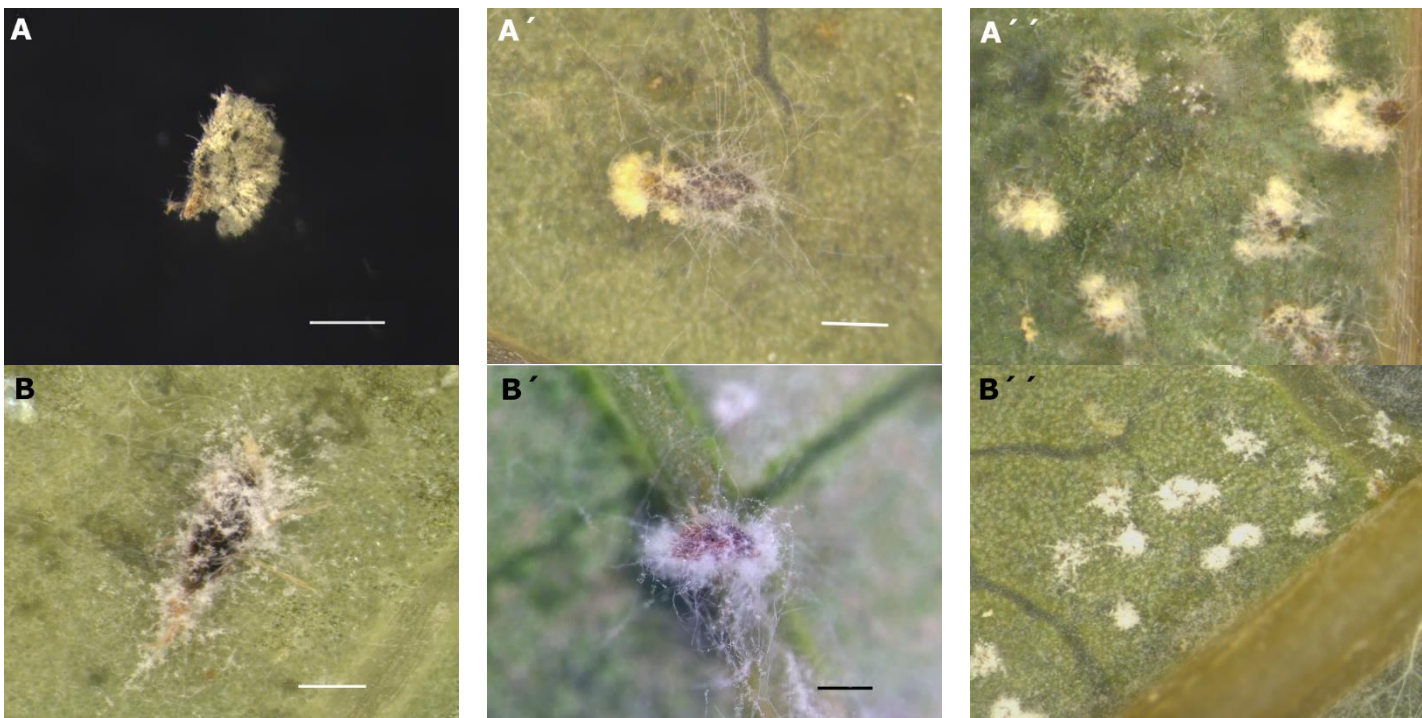
Figura 8.- Mortalidad acumulada (%) de las hembras de *T. merganser* provocada por los aislamientos de *Lecanicillium* sp. al sexto día post-infección a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/ml.



Como observación importante hay que mencionar que la infección con *Lecanicillium* sp. ocurrió de forma tardía en los ácaros, ya que los efectos se visualizaron a partir del cuarto día post-infección; la principal característica fue la momificación completa del ácaro y un largo crecimiento de las hifas. También fue notorio el abundante crecimiento de micelio sobre los discos de hoja (Fig. 9 C-C'), el cual se retiró diariamente con un palillo de tal forma que no dañara el disco, esto con la finalidad de que los ácaros no quedaran por debajo de la masa de micelio y se pudiera llevar a cabo el registro de las muertes. La esporulación en los cadáveres se apreció a partir del día 6 posterior a la infección.

#### 7.4 Determinación de la virulencia de las cepas de hongos entomopatógenos sobre *T. merganser*

La determinación de la virulencia específica de cada cepa sobre *T. merganser* consideró solo a cepas que presentaron mortalidad por arriba del 75% en el ensayo anterior, resultando en seis cepas de *M. anisopliae* (Ma002, Ma003, Ma004, Ma005, Ma014, Ma034) y tres de *B. bassiana* (Bb005, Bb014 y Bb016) las seleccionadas.



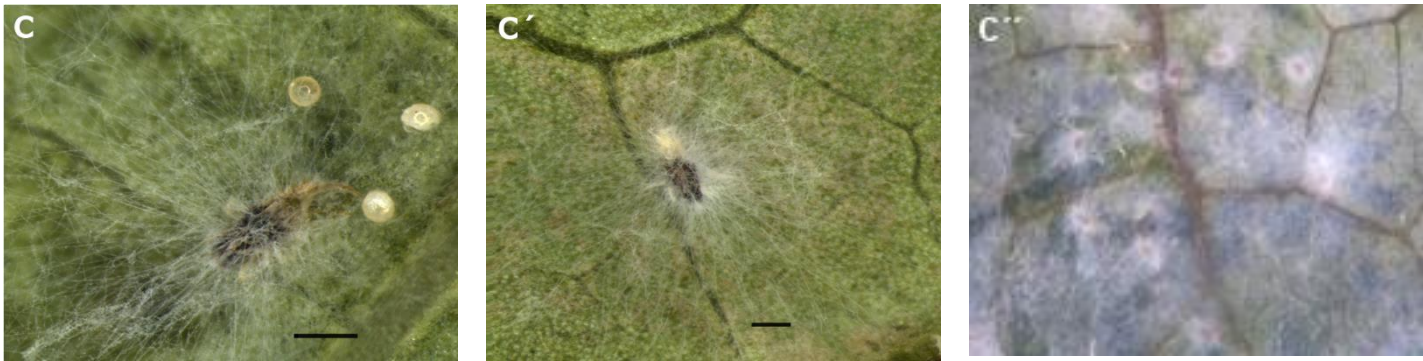


Figura 9.- Infección causada por diferentes cepas de hongos entomopatógenos sobre *T. merganser*. A) *M. anisopliae* 005, A') Ma003, A'') huevos infectados con Ma; B) *B. bassiana* 016, B') Bb005, B'') huevos infectados con Bb ; C) *Lecanicillium* sp. 28, C') *Lecanicillium* sp. 9, C'') Abundante crecimiento del micelio en el disco de hoja *L. sp.* 54. La barra de escala corresponde a 200  $\mu\text{m}$ .

En la figura 10 se presentan las líneas dosis-respuesta para cada una de las cepas indicadas en la gráfica. El valor más bajo de la  $CL_{50}$  y la pendiente de la recta son algunos de los valores que definen a la cepa más agresiva. En el caso de las cepas de *M. anisopliae*, la más virulenta fue Ma005 al presentar la  $CL_{50}$  más baja ( $4.91 \times 10^6$  conidios/ml) y un  $TL_{50}$  de 3.35 días, seguida de Ma034  $7.19 \times 10^6$  conidios/ml que se encuentra en el mismo orden de magnitud que la cepa anterior, mientras que las cepas restantes se encontraron en el orden de  $10^7$ , donde Ma003 es la que presenta el valor más bajo de ese grupo (Fig. 10). Las cepas Ma004 y Ma014 tuvieron la menor agresividad sobre *T. merganser*, con valores para  $CL_{50}$  de  $3.25 \times 10^7$  y  $7.33 \times 10^7$ , respectivamente, y valores de  $TL_{50}$  con 4.11 y 4.77 días (Cuadro 4). Con respecto a la infectividad en huevos, solo se registraron afectaciones en las concentraciones  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^7$  conidios/ml en todas las cepas, registrando mayor cobertura en la concentración más alta (datos cualitativos) (Fig. 9 A-A').

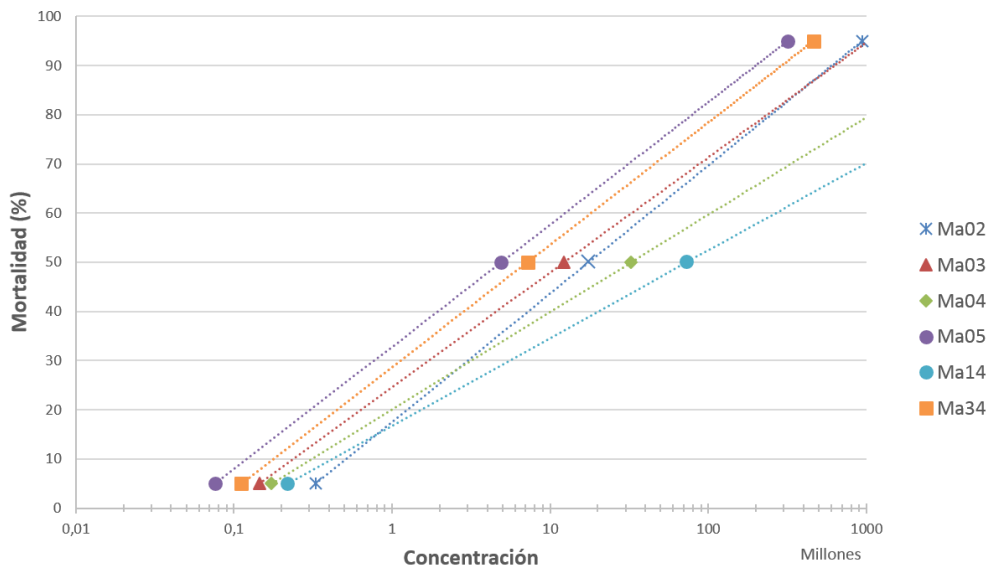


Figura 10.- Líneas de respuesta generadas del logaritmo de la concentración contra la mortalidad provocada a las hembras de *T. merganser* con las diferentes cepas del hongo *M. anisopliae*.

Para *B. bassiana*, como era de esperarse, la cepa Bb016, que en la prueba anterior fue la que causó el 100% de mortalidad en los ácaros de prueba, fue la más virulenta con una  $CL_{50}$  de  $5.29 \times 10^6$  conidios/ml y el menor  $TL_{50}$  estimado (3.77 días), mientras que las dos cepas restantes se registraron en el orden de  $10^7$  y tiempos letales por arriba de los 4.5 días (Cuadro 5, Fig. 11). Cabe resaltar que la cepa Bb016 también fue infectiva en huevos mostrando una amplia cobertura en la concentración  $1 \times 10^8$  y disminuyendo su actividad hasta la concentración  $1 \times 10^6$ . La cepa Bb005 no mostró infectividad en huevos mientras que la cepa Bb014 solo presentó infectividad en la concentración más alta probada (Fig. 9 B-B').

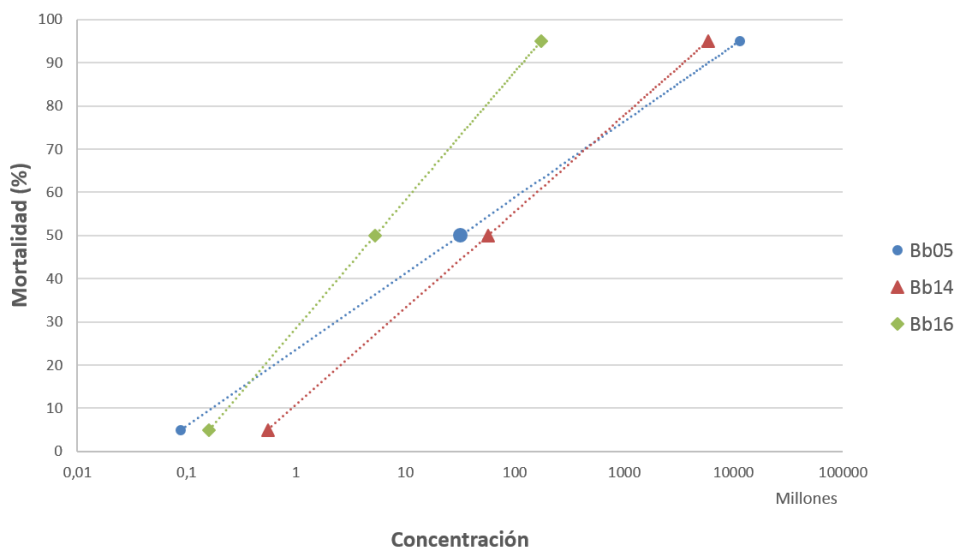


Figura 11.- Líneas de respuesta generadas del logaritmo de la concentración probada contra la mortalidad provocada a las hembras de *T. merganser* con las diferentes cepas del hongo *B. bassiana*.



El cuadro 5 presenta un resumen de los valores más importantes determinados para las cepas evaluadas y que validan cada bioensayo. Las hembras adultas de *T. merganser* resultaron ser más susceptibles a las cepas Ma005, Ma034 y Bb016 que tuvieron los menores valores de CL<sub>50</sub> y TL<sub>50</sub> de todas las cepas. Así mismo, se consideró el valor de la pendiente que representa la respuesta de un individuo a cambios en las concentraciones, siendo (de estas tres cepas) el menor valor para Bb016, lo que significa que *T. merganser* es altamente susceptible a esta cepa.

Cuadro 5.- Determinación de la CL<sub>50</sub>, TL<sub>50</sub> y otros parámetros estadísticos obtenidos del análisis Probit con un nivel de significancia del 5% para todas las cepas probadas.

Cepa	CL <sub>50</sub> conidios/ml	LF <sub>inferior</sub>	LF <sub>superior</sub>	LF <sub>sup</sub> /LF <sub>inf</sub>	X <sup>2</sup>	m ± ee	TL <sub>50</sub> (días)	LF <sub>inf-sup</sub>
Ma005	4.91x10 <sup>6</sup>	3,065,009	8,170,599	2.6657	7.90	2.53± 0.2492	3.35	3.1346 - 3.5399
Ma034	7.19x10 <sup>6</sup>	4,463,249	12,130,970	2.7179	6.01	2.53± 0.2576	3.60	3.3780 - 3.8005
Ma003	1.22x10 <sup>7</sup>	7,359,532	21,866,709	2.9712	1.21	2.69± 0.2938	3.90	3.6229 - 4.1675
Ma002	1.76x10 <sup>7</sup>	10,798,294	30,936,135	2.8649	12.99	2.41± 0.2679	3.75	3.4957 - 3.9834
Ma004	3.25x10 <sup>7</sup>	17,245,458	74,620,110	4.3269	2.17	3.18± 0.3941	4.11	3.7387 - 4.4784
Ma014	7.33x10 <sup>7</sup>	33,444,728	229,959,304	6.8758	4.50	3.53± 0.4870	4.77	4.3570 - 5.3460
Bb016	5.29x10 <sup>6</sup>	3444661	8233756	2.3902	7.08	2.12± 0.2076	3.77	3.5375 - 3.9838
Bb005	3.18x10 <sup>7</sup>	15766445	80514246	5.1066	9.62	3.57± 0.4332	4.55	4.2959 - 4.8252
Bb014	5.7x10 <sup>7</sup>	30584109	133275899	4.3576	13.77	2.81± 0.3739	4.83	4.5618 - 5.1565

Ma: *Metarhizium anisopliae*, Bb: *Beauveria bassiana*, CL<sub>50</sub>: concentración letal media, TL<sub>50</sub>: tiempo letal medio, LF: límite fiducial, X<sup>2</sup>: chi cuadrada, m: pendiente de la curva de regresión ± error estándar.

### 7.5 Verificación sobre plántulas de papayo infestadas con *T. merganser*

La población inicial de *T. merganser* (al día 15) fue 6.8, 10.1, 8.82 y 8.92 ácaros/hoja, respectivamente, para testigo, Ma003, Ma034 y Ma005. En esta primera evaluación el daño provocado por los ácaros ya era evidente en las hojas, e incluso, se encontraron plantas cubiertas por telaraña. La densidad que alcanzó el testigo hasta el final de la evaluación (tres semanas) fue de 141.6 ácaros/hoja.

A pesar de que se utilizó la misma concentración de conidios que en el laboratorio, sobre las plántulas al parecer no hubo efecto, ya que en ninguno de los tres tratamientos en las diferentes revisiones se encontraron ácaros micosados u organismos que presentaran síntomas de esta, aunado a que tampoco se apreció una disminución en la población; al contrario, las poblaciones de los tratamientos se pueden describir como en crecimiento en donde los estadios dominantes fueron protoninfa y deuteroninfa y en menor proporción adultos.

Otra característica fue que las esporas que se depositaron en las hojas germinaron como una masa micelial muy pequeña en muy pocas hojas, por lo que algún factor ambiental no favoreció su crecimiento, muy probablemente la humedad relativa.

## 7.6 Identificación molecular de *Lecanicillium* sp.

### 7.6.1 Extracción de ADN

Se obtuvo la extracción tanto de ADN como ARN con el método empleado. En el gel de agarosa (Fig. 12), no se observaron impurezas ni degradación del ADN genómico, por lo que el ADN aislado resultó con buena calidad e integridad.

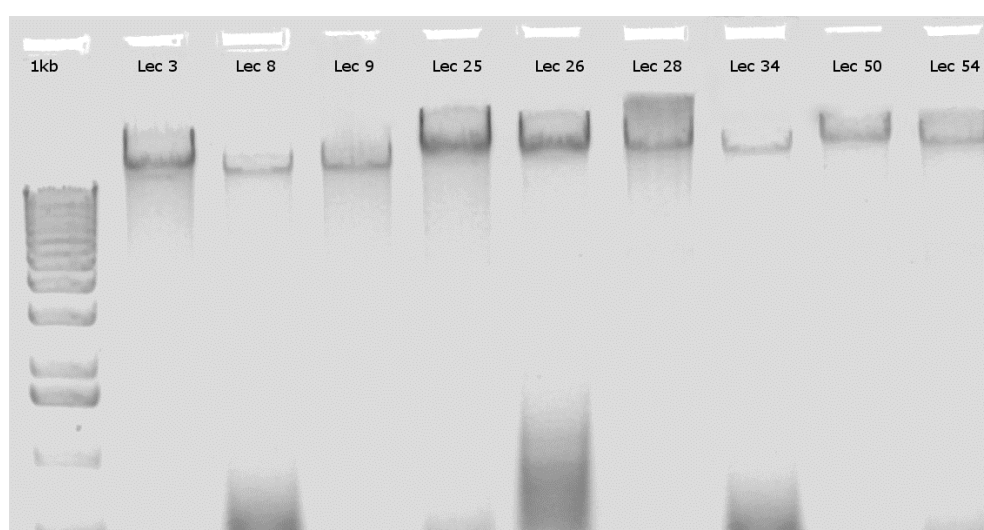


Figura 12.- Gel de agarosa al 1% mostrando las bandas de ADN obtenidas de los diferentes aislamientos de *Lecanicillium* sp.

### 7.6.2 Amplificación por PCR de los diferentes genes empleados

Con todos los aislamientos de *Lecanicillium* utilizados se obtuvieron fragmentos únicos del tamaño esperado para cada uno de los genes amplificados, para ITS una banda de 520 pb y un fragmento de 1744 pb aproximadamente para el gen 18S como lo reportan White *et al.* (1990) (Fig. 13) y bandas tenues del gen FE1- $\alpha$ , pero todos los aislamientos amplificaron del tamaño reportado por Rehner y Buckley (2005) (Fig. 14).

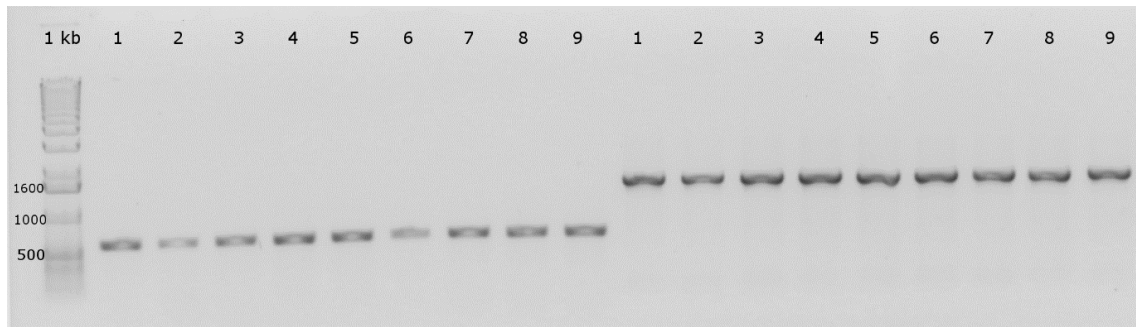


Figura 13.- Amplificación por PCR de los genes ITS y 18S de los nueve aislamientos de *Lecanicillium* sp. 1- Lec3, 2- Lec8, 3- Lec9, 4- Lec28, 5- Lec25, 6- Lec26, 7- Lec34, 8- Lec50, 9- Lec54. Marcador de peso molecular 1kb plus Invitrogen.

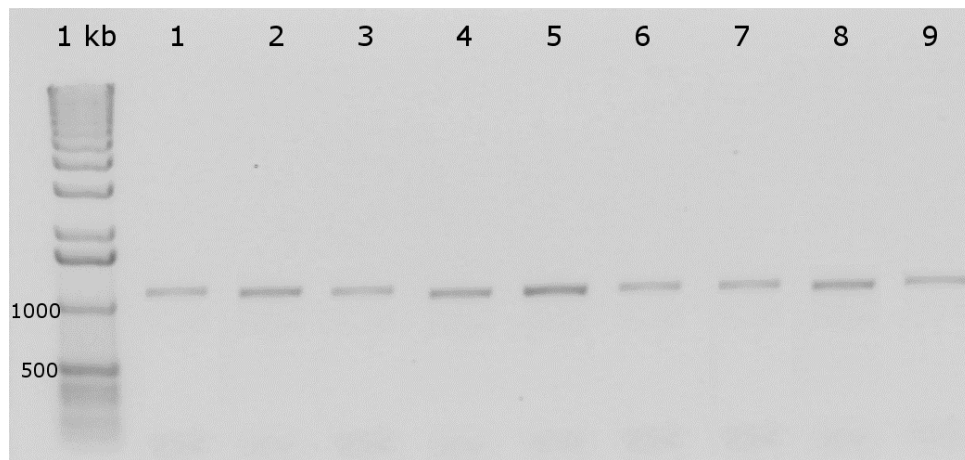


Figura 14.- Amplificación por PCR del gen FE1- $\alpha$  de los nueve aislamientos de *Lecanicillium* sp. 1- Lec3, 2- Lec8, 3- Lec9, 4- Lec28, 5- Lec25, 6- Lec26, 7- Lec34, 8- Lec50, 9- Lec54. Marcador de peso molecular 1kb plus Invitrogen.

### 7.6.3 Purificación de los amplicones

Con ambos métodos de purificación se recuperó suficiente concentración de ADN para la secuenciación, con excepción del gen FE1- $\alpha$  que obtuvo las concentraciones más bajas (Cuadro 6), lo cual se mostró previamente en el gel de agarosa (Fig. 14).

Cuadro 6.- Cuantificación de ADN por espectrofotometría (Nanodrop ND-1000) de los amplicones purificados

Aislamiento	ITS ( $ng/\mu l$ )	18S	FE1- $\alpha$
Lec03	26	38.45	11.48
Lec08	15.5	33.05	6.05
Lec09	25.4	44.32	8.49
Lec25	28.6	53.66	14.44
Lec26	17.2	51.30	12.39
Lec28	13.7	54.04	11.71
Lec34	23.9	42.34	12.41
Lec50	25.7	4.55	9.21
Lec54	16.1	36.20	25.75

#### 7.6.4 Análisis de las secuencias y comparación con Blast para la identificación molecular

A pesar de que se obtuvo una buena concentración de ADN para los genes 18S e ITS, el proceso de secuenciación solo se llevó a cabo satisfactoriamente para la región intergénica. Con estas secuencias se realizó el alineamiento para la identificación molecular con la secuencia reconstruida (fwd y rev).

En los resultados arrojados por BLAST, se encontró el 100% de identidad con 0.0 de expectancia al género *Lecanicillium*, lo cual corresponde con la identificación morfológica, cuyas características se muestran más adelante.

Para la determinación de especie, los nueve aislamientos obtuvieron el 100% de cobertura e identidad con las especies *L. dimorphum* y *L. psalliotae* con 0.0 de expectancia para la mayoría de los aislamientos; sin embargo dos de ellos obtuvieron valores de  $4e^{-113}$  y  $4e^{-149}$  (Cuadro 7) los cuales son sumamente bajos, por lo que la probabilidad de que estos resultados sean erróneos es prácticamente cero, por lo anterior se asume que las secuencias analizadas si corresponden a *L. dimorphum* y *L. psalliotae*. El aislamiento Lec08, tuvo el 99.79% de identidad, debido a un cambio en un nucleótido en la posición 300 (T/C). Las secuencias reconstruidas de cada aislamiento se muestran en el cuadro 7. Con estos resultados, el análisis de la región intergénica fue suficiente para tener una aproximación hacia dos posibles especies, pero insuficiente para discernir entre ellas.





Figura 15.- Características generales del género *Lecanicillium*. a) Conidióforo verticilado, b) conidióforos solitarios, c) conidióforo bifurcado con cabezas globosas, d) conidióforo con conidios maduros.

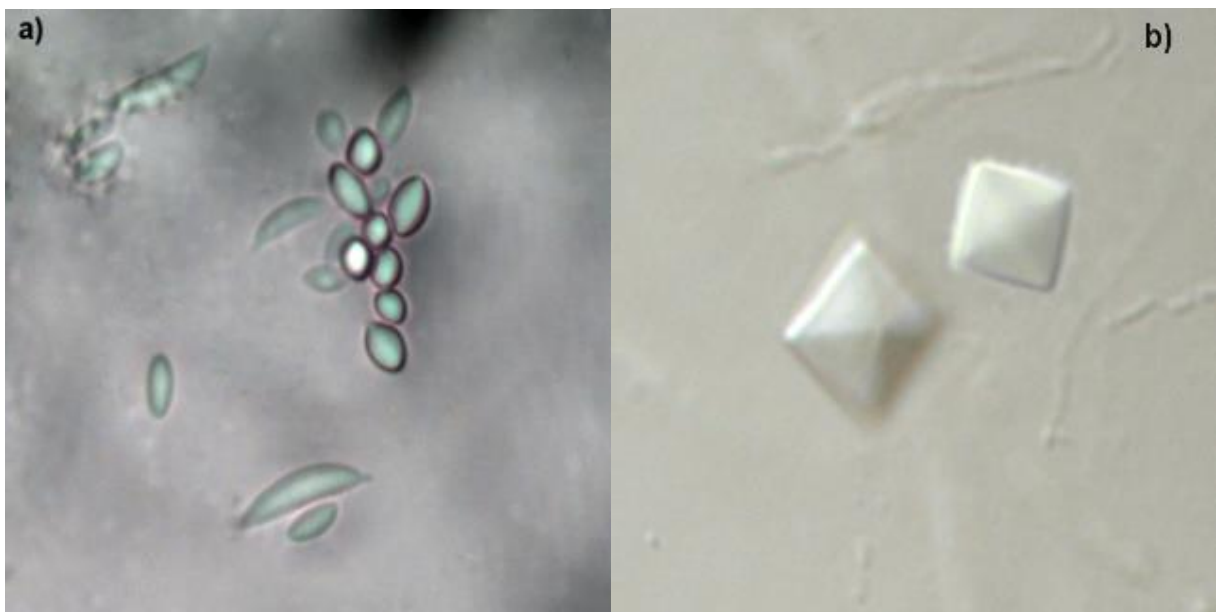


Figura 16.-a) Tipos de conidios: macronidios (\*) y micronidios; b) Cristales octaédricos presentes en el medio de cultivo.

## 8. Discusión

En este estudio solo se encontraron dos especies de ácaros fitófagos, *T. urticae* y *T. merganser*, en los huertos de papayo muestreados en el estado de Campeche, las cuales han sido reportadas en los años 2000 causando afectaciones a este cultivo en otros estados de la república mexicana (Valencia-Domínguez *et al.*, 2011; Abato-Zárate *et al.*, 2014).

El comportamiento de ambas especies en el lugar de estudio aparenta ser mutuamente excluyente, ya que se encontraron infestaciones bastante importantes por *T. merganser*, pero a pesar de la severidad del problema, los productores señalaron que el daño que esta plaga produce es menor al provocado por *T. urticae*.

Este reporte para el estado de Campeche suma un nuevo registro al área de distribución de *T. merganser*, el cual se ha considerado en los últimos años como una especie invasora en proceso de expansión geográfica (Valencia-Domínguez *et al.*, 2011), además de la capacidad que ha mostrado para incrementar su gama de hospederos en nuestro país en poco tiempo, debido a que se registró recientemente tanto en vegetación silvestre como *Moringa oleifera*, *Thevetia ahouai* y *Acacia farnesiana* en Ciudad Victoria, Tamaulipas (Monjarás-Barrera *et al.*, 2015, 2017), así como otros cultivos que no tienen que ver con las familias con las que se le asociaba previamente, como el nopal verdura *Opuntia ficus-indica* en Tlalnepantla, Morelos (Lomelí-Flores *et al.*, 2008).

Por otro lado, la presencia de *T. urticae* en este cultivo era de esperarse debido a sus cualidades de ser una plaga altamente polífaga y cosmopolita (Bolland *et al.*, 1998; Migeon y Dorkeld, 2007). Estos resultados apoyan la idea planteada por Reyes-Pérez *et al.* (2013) sobre la importancia del género *Tetranychus* como organismos adaptados a condiciones cálido-subhúmedas sobre sustratos agrícolas importantes, ya que Campeche cumple con esta condición.

Con respecto a los ácaros depredadores, se registraron dos géneros, los cuales pertenecen al tipo II de acuerdo a la clasificación de McMurtry y Croft (1997); éstos fueron *Galendromus* sp. y *Neoseiulus* sp., que se caracterizan por ser depredadores selectivos de ácaros tetraníquidos, pero más frecuentemente de aquellas especies que producen densas telarañas como *T. urticae*, y en este caso *T. merganser*. Cabe resaltar su importancia en campo, ya que, el encontrarlos en una frecuencia y abundancia alta es indicio de que el control biológico opera de manera natural.

De acuerdo a lo que se observó en la prueba de infectividad, sorpresivamente *T. merganser* fue altamente susceptible a tres de las cuatro especies fúngicas probadas, mostrando mayor susceptibilidad a las cepas nativas del estado de Campeche, que corresponden a *B. bassiana* y *M. anisopliae*, que a las cepas foráneas de *Lecanicillium* sp. e *Hirsutella*.

Prácticamente, el estudio de *T. merganser* como plaga se ha realizado en la última década, ya que hasta ahora es que se reconoce la importancia económica que tiene para el agro; por ello, los trabajos sobre su control son básicamente nulos. Sin embargo, un patrón de comparación importante es su congénere *T. urticae*, que ha sido ampliamente estudiado por todas las razones mencionadas en la sección de antecedentes.

En este trabajo se encontró que las cepas probadas de *M. anisopliae* son más agresivas que las de *B. bassiana* hacia hembras adultas de *T. merganser*, lo cual se reflejó en que dos de las tres cepas más virulentas correspondieron a *M. anisopliae* (Ma005 y Ma034) con una  $CL_{50}$  de  $4.91 \times 10^6$  y  $7.19 \times 10^6$  conidios/ml respectivamente, y una cepa de *B. bassiana* Bb016 con  $CL_{50}$   $5.29 \times 10^6$  conidios/ml.

En otros trabajos donde se han evaluado diferentes especies fúngicas para el control de *T. urticae* también se ha mostrado que las especies de *Metarhizium* (*anisopliae* y *brunneum*) son más agresivas que las cepas probadas de *B. bassiana* (Bugame *et al.*, 2014, Dogan *et al.*, 2017, Shin *et al.*, 2017).

Dogan *et al.* (2017) probaron el efecto de los hongos *M. brunneum* y *B. bassiana* sobre hembras de *T. urticae* a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/ml, encontrando porcentajes de mortalidad del 86.3% y 80.3%, respectivamente, mientras que Shin *et al.* (2017) utilizaron los hongos *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre la misma especie de ácaro pero a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/ml y encontraron que *Metarhizium* provocó el 100% de mortalidad con un  $TL_{50}$  de 2.9 días, mientras que para *B. bassiana* obtuvo el 82% con un  $TL_{50}$  de 4.0 días, siendo estos datos muy parecidos a lo que se encontró en este estudio para *T. merganser*, ya que cinco cepas de *M. anisopliae* causaron el 100% de mortalidad a la misma concentración, el tiempo letal medio más bajo para esta especie fue 3.35 días y al igual que ellos, las cepas que se probaron de *B. bassiana* también registraron un  $TL_{50}$  de cuatro días en adelante, con excepción de la cepa Bb016 que registró 3.77 días siendo la cepa más virulenta de esta especie.

La respuesta que tuvo *T. merganser* hacia las 11 cepas de *B. bassiana* tuvo mayor variación que la respuesta con *M. anisopliae*, ya que en el ensayo de infectividad se registraron mortalidades desde el 20% pasando por el 50%, 75% y solo una cepa provocó el 100% de mortalidad; sin embargo, estas cepas son más infectivas que las cepas de la



misma especie que probaron Wu *et al.* (2016), debido a que la mortalidad más alta que registraron fue del 49.5% a los cuatro días posteriores a la infección para *T. urticae*.

Otro resultado importante que se obtuvo fue la actividad ovicida que mostraron las cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, coincidiendo en gran parte con las cepas que produjeron el 100% de mortalidad, pero no fueron las únicas cepas en presentar dicho efecto. Se ha reportado que los hongos entomopatógenos poseen la capacidad de infectar todos los estadios de desarrollo de los insectos, incluyendo los huevos (Hajek y St. Leger, 1994) y en los ácaros no es la excepción.

La susceptibilidad de los huevos de *T. urticae* a diferentes especies de hongos entomopatógenos se ha evaluado en varios estudios, la respuesta de los huevos varía en función de la cepa utilizada (como en cualquier otro estadio de desarrollo), con cepas que son muy agresivas y cepas que no son infectivas (Shi y Feng, 2004; Bugeme *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Dogan *et al.*, 2017), por lo que se puede considerar que los huevos de *T. merganser* son muy susceptibles a algunas cepas de *M. anisopliae* (Fig. 7), con mejores resultados a concentraciones altas. Este hallazgo es muy importante ya que, al estar infectando a los huevos, no se está permitiendo la regeneración de la población plaga, lo que da la oportunidad de romper el ciclo en el cultivo.

En el caso de *Lecanicillium* sp. todos los aislamientos fueron infectivos a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/ml. Este es un resultado interesante por dos razones: la fuente de donde se obtuvo el aislamiento, el colémbolo *Onychiurus folsomi* (Collembola: Onychiuridae) y el lugar de procedencia: una localidad de la alcaldía Álvaro Obregón en la Ciudad de México (para más detalles ver Alfaro-Valle, 2016).

Tomando en cuenta que las condiciones ambientales de donde fue aislado *Lecanicillium* son completamente diferentes a las condiciones en las que se realizaron las pruebas, el patógeno tuvo la capacidad de crecer, pero además fue infectivo, a pesar de que los dos artrópodos, tanto fuente (colémbolo) como el de interés (ácaro) pertenecen a subphyla diferentes dentro del phylum Arthropoda (Tree of Life, 1995).

Las especies de *Lecanicillium* tienen un amplio rango de hospederos incluyendo escamas, áfidos, otros órdenes de insectos y ácaros (Zare y Gams, 2001). Para el control de *T. urticae* se han evaluado algunas cepas de *L. lecanii* a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/ml sobre hembras adultas; por ejemplo, la cepa UPH-0241 evaluada por Dogan *et al.* (2017) y la cepa 450.99 evaluada por Chandler *et al.* (2005). Con la cepa UPH-0241 se registró una mortalidad del 90.3% a los siete días, mientras que con la otra cepa los autores reportaron una mortalidad del 35.7% al sexto día. Los datos registrados por Chandler *et al.* (2005) son muy similares a los que se registraron para *T. merganser*, ya

que cinco de los nueve aislamientos de *Lecanicillium* sp. probados registraron un rango de mortalidad entre el 35 y 40% en el mismo tiempo y solo uno provocó el 60%.

En el caso de *Hirsutella thompsonii* var. *sinematosa*, la cepa CHE-CNRCB 377 no mostró infectividad hacia *T. merganser*, a pesar de que a este género se le considera como especialista en ácaros (Samson *et al.*, 1980). Una de las posibles causas que expliquen esto es el origen de la cepa, la cual se aisló del ácaro arador de los cítricos *Phyllocoptruta oleivora* que pertenece a la familia Eriophyidae, con la cual se le ha asociado más estrechamente al igual que con la familia Tarsonemidae (Rosas-Acevedo y Sampedro-Rosas, 1990; Cabrera *et al.*, 2005, 2007) que con Tetranychidae. Por ello se podría pensar en que el género *Hirsutella* dentro de Acari presenta algún grado de especificidad por dichas familias.

Como se vio en el análisis de la prueba de infectividad de las especies de hongos entomopatógenos probadas, la agresividad entre cepas de la misma especie y entre especies varía grandemente, siendo influida por diversos factores como: la fuente de donde se obtuvo el aislamiento, debido a que algunas especies pueden presentar cierto grado de especialización hacia un determinado hospedero (Gandarilla-Pacheco *et al.*, 2013), como el caso de la cepa de *Hirsutella* que se probó aquí; y la región geográfica de donde se obtienen, ya que la exposición a diferentes condiciones bióticas y abióticas puede provocar cambios significativos en su agresividad (Erler y Ates, 2015).

Abonando al punto geográfico, en las evaluaciones se pueden considerar cepas tanto locales como foráneas, con las que se pueden obtener diferentes respuestas hacia el organismo que se está probando. La lógica nos lleva a pensar que las cepas nativas podrían presentar mayor agresividad por estar adaptadas a las condiciones específicas en donde se van a aplicar; sin embargo, esta premisa no siempre es correcta. La evidencia muestra que estas cepas pueden ser agresivas y muy virulentas (Chan-Cupul *et al.*, 2010; Rios-Velasco *et al.*, 2014; Ortucu y Algur, 2017) o por el contrario, no mostrar efecto alguno (Topuz *et al.*, 2016). Por otra parte, la introducción de cepas foráneas a una población nativa puede tener diferentes efectos desde no ser infectivas hasta ser más virulentas que las cepas nativas (Hajek *et al.*, 1995; Solter *et al.*, 1997).

Con los datos anteriores, se puede apreciar que la determinación de la agresividad y virulencia de diferentes cepas de hongos entomopatógenos está mediada por la interacción de diferentes factores tanto bióticos como abióticos, por lo que la variabilidad genética entre ellas es un factor importante que se debe de considerar al momento de hacer las evaluaciones de selección.

## 8.1 Verificación sobre plántulas

El no encontrar efecto de las cepas de hongos entomopatógenos probadas sobre la población de *T. merganser* resultó inesperado, después de que en condiciones de laboratorio se obtuvieran buenos resultados. Estos cambios, en los que cepas que en laboratorio fueron muy efectivas pero en campo costó trabajo establecerlas, también los han reportado varios autores (Gardner *et al.*, 1982; Maketon *et al.*, 2008) debido principalmente a que las condiciones ambientales juegan un papel importante para el desarrollo de estos microorganismos, siendo la más importante la humedad relativa (Wraight y Ramos, 2002; Delalibera *et al.*, 2006), que en este experimento estuvo por debajo (64-70%) de la requerida para que las esporas de *M. anisopliae* germinaran e hicieran su función.

Otra posible explicación es que los diferentes estadios de *T. merganser* eliminan las esporas depositadas en su cutícula a través del proceso de ecdisis, pero no como defensa ante el ataque del patógeno, sino como una característica intrínseca de su ciclo de vida, ya que el intervalo de tiempo que transcurre entre muda y muda es muy corto. Reyes-Pérez *et al.* (2013) determinaron que el tiempo de duración entre los estadios inmaduros (larva y ninfas) de *T. merganser* a 27°C y 60% HR va de 1.67 a 2.21 días, por lo que, si una espóra necesita como mínimo 24 horas para germinar y que entre cada estadio de muda hay un periodo de latencia (crisálida), la espóra tiene una amplia probabilidad de ser eliminada en la vieja cutícula, perdiendo así la oportunidad de penetrarla completamente y llegar al hemocele. Para aumentar la probabilidad de que la espóra haga contacto con la cutícula del ácaro se podrían realizar aplicaciones más frecuentes del hongo.

El trabajo de validación en invernadero y/o campo presenta muchas limitantes, como lograr una buena formulación del producto, así como diseñar estrategias de aplicación para el organismo blanco (Maniania *et al.*, 2008), por lo que probar diferentes métodos de aplicación y probar vehículos de dispersión para las esporas debe ser el siguiente paso para poder completar satisfactoriamente esta etapa.

## 8.2 Identificación molecular de *Lecanicillium* sp.

*Lecanicillium dimorphum* y *L. psalliotae* son especies que se encuentran estrechamente relacionadas. Anteriormente, Gams (1971) identificó erróneamente a *L. dimorphum* como *Verticillium psalliotae*, (recordando que, en 2001, el género *Verticillium* fue renombrado como *Lecanicillium*). La principal diferencia morfológica entre ambas especies es que *L. dimorphum* posee afanofialides (Zare y Gams, 2001).

Por medio del análisis de ITS, Zare y Gams (2001) mostraron que el subgrupo de *L. psalliotae* tiene una relación cercana con las especies *L. aphanocladii*, *L. dimorphum* y *Verticillium saksenae*. La relación tan cercana que muestran dichas especies indican que la región ITS no provee información suficiente para discernir entre estas especies cuando se utiliza como único criterio, por lo que es necesaria el empleo de otros genes para dilucidar tal situación, como la NADH deshidrogenasa subunidad 1 y 3 (nad1 y nad3) (Kouvelis *et al.*, 2008). Se analizarán las secuencias del gen FE1-a como posible criterio de separación entre dichas especies para llegar a la identificación.

## 9. Conclusiones

En el estado de Campeche se encuentran al menos dos especies principales de ácaros plaga asociadas a huertos de papayo: *T. urticae* y *T. merganser*. El reporte de *T. merganser* confirma su potencial como plaga emergente de este cultivo.

*Tetranychus merganser* es altamente susceptible bajo condiciones *in vitro* a numerosos aislamientos de al menos tres especies de hongos entomopatógenos (*B. bassiana*, *M. anisopliae* y *Lecanicillium* sp.). Dichas especies fúngicas provienen de diferentes fuentes, por lo que se acepta la hipótesis planteada.

Las cepas que presentaron mayor agresividad hacia *T. merganser* corresponden a las especies *M. anisopliae* y *B. bassiana*. El estadio de huevo fue más susceptible a *M. anisopliae*.

Las cepas más virulentas hacia hembras adultas de *T. merganser* son: Ma005 (CL<sub>50</sub> 4.91x10<sup>6</sup> conidios/ml y un TL<sub>50</sub> de 3.35 días), Bb016 (CL<sub>50</sub> 5.29x10<sup>6</sup> y 3.77 d) y Ma034 (CL<sub>50</sub> 7.19x10<sup>6</sup> y 3.6 d); dichas cepas muestran potencial para el control de esta especie.

Son necesarios más estudios sobre los métodos de aplicación para la evaluación de hongos entomopatógenos en campo y/o invernadero, ya que entender cuáles son los problemas limitantes más importantes será de ayuda para diseñar estrategias efectivas de aplicación y evaluación.

## 10. Perspectivas

Con la experiencia que se tuvo en la aplicación directa de hongos entomopatógenos sobre plántulas, es importante evaluar cómo la temperatura y la humedad influyen en la capacidad infectiva del hongo, ya que de esta forma se pueden seleccionar cepas que tengan un rango de tolerancia más amplio a estas dos condiciones y con ello poder aumentar el éxito de infección en campo.

En los resultados se obtuvo que dos cepas de *M. anisopliae* y una de *B. bassiana* fueron las más virulentas. Tanto en campo como en laboratorio se probaron los efectos individuales de cada cepa, por lo que se podría probar si puede establecer un efecto sinérgico de la combinación de dos cepas esperando obtener mejores resultados para el control de *T. merganser*.

Dado que en campo siempre se van a encontrar todos los estadios de desarrollo de *T. merganser* y que el tiempo que pasan entre estadios es muy corto, es conveniente realizar aplicaciones de hongos entomopatógenos con mayor frecuencia. Se podrían hacer aplicaciones cada tercer o quinto día por cuatro semanas, con lo que se podría evaluar el efecto sobre una generación completa.

Hay mucho que hacer para la caracterización genética de las cepas del cepario, es importante determinar factores de virulencia que afecten preferentemente a ácaros tetraníquidos, factores que determinen la preferencia por ciertos hospederos y de esta forma hacer predicciones sobre la gama de hospederos, etc.

## **11. Anexos**

### **Anexo 1.- Método de extracción de DNA de hongos propuesto por Reader y Broda 1985**

1. Muestras de micelio ultracongeladas se maceran con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y se colocan en tubos eppendorf con 150 mg de micelio.
2. Se agregan 700 µl de buffer de extracción (200mM de tris-HCl pH 8.5, 250mM de NaCl, 25mM de EDTA, 0.5 % de SDS), mezclando de manera homogénea durante 10 minutos en vortex.
3. A la suspensión formada con el buffer y los restos celulares extraídos, se le adiciona 1 volumen de fenol-cloroformo (proporción 25:24). La suspensión contenida en el tubo eppendorf se mantiene en agitación constante durante 10 minutos.
4. Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos.
5. Al término de la centrifugación, la fase acuosa se transfiere a un tubo eppendorf nuevo.
6. Se agrega un volumen de cloroformo para eliminar residuos de fenol, mezclando de manera homogénea con vortex. Se centrifuga por 5 minutos a 12000 rpm.
7. La fase acuosa se recupera en un nuevo tubo eppendorf y se le adicionan 500 µl de isopropanol frío. La solución se centrifuga a 12000 rpm por 5 minutos.
8. Lavar la pastilla dos veces con etanol al 70% y secar en incubadora de 37°C el exceso de etanol.
9. Resuspender en 30 µl de agua ultra pura estéril
10. Verificar la calidad e integridad del DNA obtenido por electroforesis en gel de agarosa al 1% (1h a 90 volts).

## Anexo 2

**Cuadro A1.- Huertos de papayo muestreados en el estado de Campeche durante 2017 y 2018.**

Municipio	Localidad	Variedad	Control de plagas realizado	Latitud N	Longitud O
<b>Candelaria</b>	El Chelón	Tainung	Conservativo	18°01'03.3''	91°00'07.1''
<b>Tenabo</b>	Tinún	Maradol	Convencional	19°53'2.47''	90°11'8.03''
<b>Tenabo</b>	Nilchí	Maradol	Convencional	19°52'9.48''	90°14'9.25''
<b>Champotón</b>	Hool	Maradol	Convencional	19°35'18.04''	90°23'3.83''
<b>Campeche</b>	Nohyaxché	Maradol	Biológico	19°37'31.78''	90°12'50.14''

## Anexo 3

**Cuadro A2.- Condiciones de reacción para los genes ITS y 18S**

	ITS		18S		
	Tem (°C)	Tiempo	Tem (°C)	Tiempo	Ciclos
<b>Desnatu. inicial</b>	94	2 min	95	5 min	1
<b>Desnaturalización</b>	94	1 min	94	40 s	35
<b>Alineamiento</b>	55	1 min	49	40 s	
<b>Extensión</b>	72	1 min	72	45 s	
<b>Extensión final</b>	72	7 min	72	10 min	1

White *et al.*, 1990

## Anexo 4

**Cuadro A3.- Condiciones de reacción para el gen factor de elongación 1 $\alpha$**

	Tem (°C)	Tiempo	Ciclos
<b>Desnatu. Inicial</b>	95	3 min	1
<b>Alineamiento</b>	60-56	30 s	1
<b>Desnaturalización</b>	94	1 min	36
<b>Alineamiento</b>	56	1 min	
<b>Extensión</b>	72	3 min	
<b>Extensión final</b>	72	10 min	1

Rehner y Buckley 2005



### **Anexo 5.- Otros enemigos naturales de *T. merganser***

El mantenimiento de la colonia sobre frijol se llevó a cabo de finales del mes de mayo 2018 a febrero de 2019. En este periodo, durante la temporada de lluvias se registraron algunos efectos sobre la colonia. La temporada de lluvias en la localidad de Sihochac comenzó a partir del 30 de julio 2018, presentándose lluvias diarias de gran duración e intensidad por al menos 20 días seguidos. El exceso de humedad en el interior de las jaulas propició el desarrollo de un patógeno fúngico, el cual fue perceptible cuando en el testigo de un tratamiento murieron todos los ácaros al día siguiente de la aplicación.

Con la presencia de ese patógeno en la colonia, la densidad poblacional disminuyó de tal forma que se tuvieron que buscar estrategias para comenzar una nueva población. Se presenció un segundo brote a finales del mes de noviembre 2018, pero de menor intensidad.

El presunto patógeno se determinó como *Neozygites* Witlaczil 1885 (Entomophthorales, Neozygitaceae).

Los cadáveres que se examinaron estaban cubiertos completamente de esporas de resistencia globosas (Fig. A1a,b). El único micelio externo que se observó fue el de los conidióforos donde se producen los conidios primarios de forma esférica (Fig. 1c). Se observó también la presencia de conidios secundarios de forma piriforme que en la parte apical terminan en una papila adhesiva. Estos conidios son dispersados pasivamente por los capiloconidios (Fig. A1d).

Se trató de aislar al presunto patógeno utilizando la técnica de esporas descendentes; las esporas colectadas se transfirieron al medio agar dextrosa Sabouraud (SDA) suplementado con yema de huevo y leche, el cual es un medio específico para este tipo de hongos. Desafortunadamente, no se pudo realizar el aislamiento.

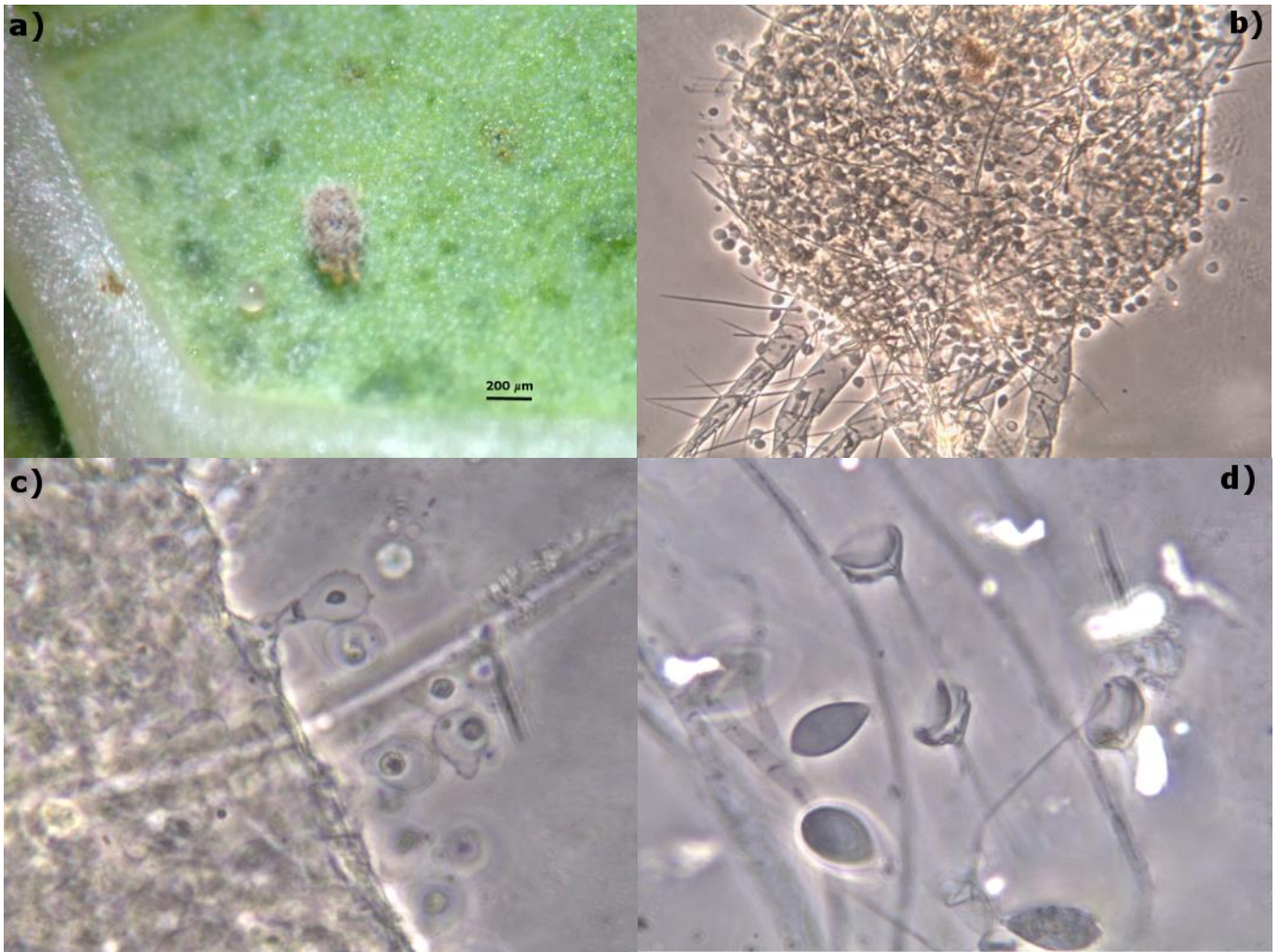


Figura A1- Morfología de *Neozygites* sp. a) aspecto de *T. merganser* infectado por el hongo, b) cuerpo de una hembra cubierto por esporas de resistencia visto en 10X, c) conidios primarios, d) capiloconidios con capilioespora.

Alternativamente a la colonia establecida en frijol, se manejó una pequeña parcela experimental de papaya var. Maradol del 30 de abril 2018 a febrero de 2019. De forma natural se infestó de ácaros, encontrando como especie dominante a *T. merganser*.

Durante el seguimiento de la parcela, se detectaron otros enemigos naturales como el coccinélido *Stethorus* sp. (Coleoptera: Coccinellidae) tanto el estadio larval como el adulto (Fig. A2a) y la larva del díptero *Feltiella acarisuga* (Diptera: Cecidomyiidae) (Fig. A2b). Cabe destacar que, de ambos depredadores, el que tuvo mayor permanencia a pesar de las fluctuaciones poblacionales de *T. merganser* fue *Stethorus* sp.



Figura A2.- Depredadores de *T. merganser* sobre papayo, a) coccinélido *Stethorus* sp., b) díptero *Feltiella acarisuga*.

## 12. Literatura citada

**Abato-Zárate, M. 2011.** Manejo integrado de la acarofauna del papayo y su transferencia en el estado de Veracruz. Tesis Doctoral, Colegio de Postgraduados Campus Veracruz. 126p.

**Abato-Zárate, M., J. A. Villanueva-Jiménez, J. L. Reta-Mendiola, C. Ávila-Reséndiz, G. Otero-Colina y E. Hernández-Castro. 2011.** Simultaneous productive growth groups (SPGG): innovation on papaya mite management. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 13: 397-407.

**Abato-Zárate, M., J.A. Villanueva-Jiménez, G. Otero-Colina, C. Ávila-Reséndiz, E. Hernández-Castro y N. Reyes-Pérez. 2012.** Biological efficacy and selectivity of acaricides in papaya (*Carica papaya* L.). *Tropical and subtropical agroecosystems* 15,SUP2: S118-S125.

**Abato-Zárate, M., J.A. Villanueva-Jiménez, G. Otero-Colina, C. Ávila-Reséndiz, E. Hernández-Castro y N. Reyes-Pérez. 2014.** Acarofauna associated to papaya orchards in Veracruz, Mexico. *Acta Zoológica Mexicana* 30(3): 595-609.

**Acuña, L.E., J.P. Agostini y T.H. Haberle. 2005.** Control químico del ácaro blanco *Polyphagotarsonemus latus* Banks del mamón *Carica papaya* L. *Citrumisiones* 30: 10-20.

**Alexopoulos, C.J., C.W. Mims y M. Blackwell. 1996.** *Introductory mycology*. 4° edición. John Wiley & Sons. Inc. Nueva York. 869 pp.

**Alfaro-Valle, E. 2016.** Identificación de un hongo entomopatógeno asociado a *Onychiurus folsomi* Schaeffer (Collembola: Onychiuridae) y su incidencia en el ciclo de vida. Tesis de licenciatura: Licenciada en Biología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México. 44p.

**Andersen, O.S. 1979.** Biochemistry of insect cuticle. *Ann. Rev. Entomol* 24: 29-61.

**Azarkan, M., A. Amrani, M. Nijs, A. Vandermeers, S. Zaerhouni, N. Smolders y Y. Looze. 1997.** *Carica papaya* latex is a rich source of a class II chitinase. *Phytochemistry* 46(8): 1319-1325.

**Barrera, J.F. 2007.** Introducción, filosofía y alcance del control biológico. En: Rodríguez-del-Bosque, L.A. y Arredondo-Bernal, H.C. (Eds). *Teoría y aplicación del control biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico. México. 1-18 pp.

**Becker, S. 1958.** The production of papain-an agricultural industry for tropical america. *Econ. Bot.* 12:62-79.

- Beers, E.H., H. Riedl y J.E. Dunley. 1998.** Resistance to abamectin and reversión to susceptibility to fenbutatin oxide in spider mite (Acari: Tetranychidae) populations in the pacific northwest. *Journal of Economic Entomology* 91(2): 352-360.
- Biddinger, D.J., D.C. Weber y L.A. Hull. 2009.** Coccinellidae as predators of mites: Stethorini in biological control. *Biological Control* 51: 268-283.
- Bolland, H. R., J. Gutierrez y C. H. W. Flechtmann. 1998.** World catalogue of the spider mite family (Acari: Tetranychidae). Leiden. Boston Köln. Brill. 392 p.
- Bugeme, M.D., M. Knapp, H.I. Boga, S. Ekesi y N.K. Maniania. 2014.** Susceptibility of developmental stages of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) to infection by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *International Journal of Tropical Insect Science* 34(3): 190-196.
- Butt, T.M., C.J. Coates, I.M. Dubovskiy y N.A. Ratcliffe. 2016.** Entomopathogenic fungi: new insights into host-pathogen interactions. En: Lovett, B. y J. St. Leger. *Advances in genetics. Genetics and molecular biology of entomopathogenic fungi*. Elsevier. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.006>
- Cabrera, R.I., Á. García, G. Otero-Colina, L. Almaguel y A. Ginarte. 2005.** *Hirsutella nodulosa* y otros hongos asociados al ácaro tarsonémido del arroz *Steneotarssonemus spinki* (Acari: Tarsonemidae) en Cuba. *Folia Entomol. Mex.* 44(2): 115-121.
- Cabrera, R.I., L. Ayra y E. Martínez. 2007.** Los ácaros fitófagos como hospedantes de especies del género *Hirsutella* Patouillard: biodiversidad, distribución e importancia de los cítricos y otros frutales de cuba. *Levante Agrícola*, 4º trimestre: 408-412.
- Cakmak, I., H. Baspinar y N. Mandanlar. 2003.** The population densities of spider mites and their natural enemies on protected strawberries in Aydin province. *Turk. J. Entomol.* 27: 91-205.
- Cerna, E., Y. Ochoa, L. Aguirre, M. Badii, G. Gallegos y J. Landeros. 2009.** Niveles de resistencia en poblaciones de *Tetranychis urticae* en el cultivo de la fresa. *Revista Colombiana de Entomología* 35(1): 52-56.
- Chan-Cupul, W., E. Ruiz-Sánchez, J. Cristóbal-Alejo, A. Pérez-Gutiérrez, R. Munguía-Rosales y J. Lara-Reyna. 2010.** Desarrollo *in vitro* de cuatro cepas nativas de *Paecilomyces fumosoroseus* y su patogenicidad en estados inmaduros de mosquita blanca. *Agrociencia* 44(5): 587-597.

**Chan, Y.-K. 2009.** Breeding papaya (*Carica papaya* L.). En: Jain, S. M. y Priyadaarshan (Eds). Breeding plantation tree crops: Tropical species. Springer Science+Business Media. Nueva York. 121-159 pp.

**Chandler, D., G. Davidson, J.K. Pell, B.V. Ball, K. Shaw y K.D. Sunderland. 2000.** Fungal biocontrol of Acari. *Biocontrol Science and Technology*. 10 (4): 357-384.

**Chandler, D., G. Davidson y R.J. Jacobson. 2005.** Laboratory and glasshouse evaluation of entomopathogenic fungi against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychida), on tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Biocontrol Science and Technology* 15(1): 37-54.

**Charnley, A.K. y S.A. Collins. 2007.** Entomopathogenic fungi and their role in pest control. En: K. Esser, C.P. Kubicek y I.S. Druzhinina (Eds). *The mycota: A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research*. Vol IV: Environmental and microbial relationships. 2° edición. Springer. Nueva York. 159-187 pp.

**Cheng, L.L., J.R. Nechols, D.C. Margolies, J.F. Campbell, P.S. Yang, C.C. Chen y C.T. Lu. 2009.** Foraging on and consumption of two species of papaya pest mites, *Tetranychus kanzawai* and *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae), by *Mallada basalis* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environ. Entomol.* 38(3): 715-722.

**Cheng, L.L., J.R. Nechols, D.C. Margolies, J.F. Campbell y P.S. Yang. 2010.** Assessment of prey preference by the mass-produced generalist predator, *Malla basalis* (Neuroptera: Chrysopidae), when offered two species of spider mites, *Tetranychus kanzawai* Kishida and *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae), on papaya. *Biological Control* 53: 267-277.

**Collier, S.F.K., G.S. Albuquerque, J.O.G. de Lima, A. Pallini, A.J. Molina-Rugama. 2007.** *Neoseiulus idaeus* (Acari: Phytoseiidae) as a potential biocontrol agent of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) in papaya: performance on different prey stage-host plant combinations. *Exp Appl Acarol* 41: 27-36.

**CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología). 2008.** Términos de referencia de Convocatoria de Investigación Científica Básica 2008. <http://www.conacyt.gob.mx/fondos/FondosSectoriales/SEP/Convocatoria%20200801/Terminos-de-referencia-CB-2008.pdf> Consultada el 28-marzo-2017.

**De Coss, F.M.E. 1999.** Morfología externa de ácaros del género *Polyphagotarsonemus* (Actinedida: Tarsonemidae) procedentes de la región del Soconusco, Chiapas, México.

Tesis Maestría en Ciencias. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores, Campus Monterrey. 114p.

**Delalibera, I., C.G.B. Demétrio, B.F.J. Manly y A.E. Hajek. 2006.** Effect of relative humidity and origin of isolates of *Neozygites tanajoae* (Zygomycetes: Entomophthorales) on production of conidia from cassava Green mite, *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae), cadavers. *Biological Control* 39(3): 489-496.

**Dermauw, W., A. Ilias, M. Riga, A. Tsagkarakou, M. Grbic, L. Tirry, T. Van Leewen y J. Vontas. 2012.** The cys-loop ligand-gated ion channel gene family of *Tetranychus urticae*: Implications for acaricide toxicology and a novel mutation associated with abamectin resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 42: 455-465.

**Dogan, O.Y., S. Hazir, A. Yildiz, T.M. Butt y I. Cakmak. 2017.** Evaluation of entomopathogenic fungi for the control of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and the effect to *Metarhizium brunneum* on the predatory mites (Acari: Phytoseiidae). *Biological Control* 111: 6-12.

**Doreste, E. 1988.** Acarología. Colección Investigación y Desarrollo no 15. San José, Costa Rica. 410p.

**Eilenberg, J., A. Hajek y C. Lomer. 2001.** Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46: 387-400.

**El Moussaoui, A., M. Nijs, C. Paul, R. Wintjens, J. Vincentelli, M. Azarkan y Y. Looze. 2001.** Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 58(4): 556-570.

**Erler, F. y A.O. Ates. 2015.** Potential of two entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, as biological control agents against the june beetle (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of insect science* 15(1): 1-6.

**Espinel, C.C., L.A.T. Torres, L.F.R.Villamizar, A.E. Bustillo, M.V. Zuloaga y A.M. Cortes. 2018.** Hongos entomopatógenos en el control biológico de insectos plaga. En: Cortes, M.A. (Ed). Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros. Vol1 Agentes de control biológico. AGROSAVIA, Mosquera, Colombia.334-367 pp.

**Evans, A.E. y H.F. Ballen. 2012.** Una mirada a la producción, el comercio y el consumo de papaya a nivel mundial. Food and Resource Economics, Servicio de Extensión Cooperativa de la Florida, Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas, Universidad de la Florida (UF/IFAS). FE917.

**FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 1974.** Métodos provisionales para la detección y medición de la resistencia de plagas agrícolas a los plaguicidas. Métodos provisionales para arañas rojas, adultos y huevos de *Tetranychus* spp. y *Panonychus ulmi*. Boletín Fitosanitario de la FAO. Roma, Italia 22(5-6): 10103-107.

**FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2004.** Perspectivas a plazo medio de los productos básicos agrícolas. Proyecciones al año 2010. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/007/y5143s/y5143s13.htm#fn19> consultado el 3 septiembre 2018.

**FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2017.** Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#home> consultado el 1 septiembre 2018.

**Fernández-Ortuño, D., E. Loza-Reyes, S.L. Atkins y B.A. Fraaije. 2010.** The CYP51C gene, a reliable marker to resolve interspecific phylogenetic relationships within the *Fusarium* species complex and a novel target for species-specific PCR. International Journal of Food Microbiology 144: 301-309.

**Ferragut, F. y M.C. Santonja. 1989.** Taxonomía y distribución de los ácaros del género *Tetranychus* Dufour 1832 (Acari: Tetranychidae), en España. Bol. San. Veg. Plagas 15: 271-281.

**Ferreira, B.S.C., F.H.N. Andrade, A.R.S. Rodrigues, H.A.A. Siqueira, M.G.C. Gondim. 2015.** Resistance in field populations of *Tetranychus urticae* to acaricides and characterization of the inheritance of abamectin resistance. Crop Protection 67: 77-83.

**Ferro, D.N. y E.E. Southwick. 1984.** Microclimates of small arthropods: estimating humidity within the leaf boundary layer. Environmental Entomology 13(4): 926-929.

**Filshie, B.K. 1992.** Fine structure of the cuticle of insects and other arthropods. En: King, R.C. y Akay H. (Eds). Insect ultrastructure. Springer. Boston. MA. 281-312pp.

**Flores, C.J.R., A.N. Isiordia, R.A. Bermúdez, A.O. Ortega, G.R. Pérez y Q.A. Ramos. 2011.** Ácaros fitófagos asociados a frutales en la zona centro de Nayarit. Revista Fuente 2(7): 25-33.

**Gams, W. 1971.** *Cephalosporium-artige* Schimmelpilze (Hyphomycetes). [*Cephalosporium*-like mould fungi (Hyphomycetes)]. Mycologia 65(1): 253-257.

**Gandarilla-Pacheco, F.L., J.I. López-Arroyo, L.J. Galán-Wong y I. Quintero-Zapata. 2013.** Patogenicidad de hongos entomopatógenos nativos de la zona citrícola de México



sobre ninfas de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). Southwestern Entomologist 38(2): 325-337.

**García, A. M. 2010.** Guía técnica del cultivo de la papaya. Programa MAG-CENTAFRUTALES. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. Cd. Arce, El Salvador. 40 p.

**García, E. 1964.** Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Serie Libros Núm 6. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 98p.

**Gardner, A.W., R.D. Oetting y G.K. Storey. 1982.** Susceptibility of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, to the fungal pathogen *Hirsutella thompsonii* Fisher. Florida Entomologist 65(4): 458-465.

**Garibyan, L. y N. Avashia. 2013.** Research Techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). J Invest Dermatol 133(3): 1-8.

**Gatarayiha, C.M., M.D. Laing y R.M. Miller. 2011.** Field evaluation of *Beauveria bassiana* efficacy for the control of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). J.Appl. Entomol 135: 582-592.

**Gerson, U. 1992.** Biology and control of the broad mite, *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (Acari: Tarsonemidae). Experimental & Applied Acarology 13: 163-178.

**Gerson, U., R.L. Smiley y R. Ochoa. 2003.** An illustrated key to the relevant acarine families. En: Gerson, U., R.L. Smiley y R. Ochoa (Eds). Mites (Acari) for pest control. Blackwell Science Ltd. Reino Unido. 26-68pp.

**Gibbs, K.E. y F.O. Morrison. 1959.** The cuticle of the two-spotted spider mite, *Tetranychus telarius* (Linnaeus) (Acarina: Tetranychidae). Can. J. Zool. Vol. 37: 633-637.

**Granados, R. R., R. L. Salceda, L. Blanco, Ma. del Pilar. 2015.** Situación actual y perspectivas tecnológicas para la papaya (*Carica papaya* L.) en el distrito de Veracruz, Veracruz. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 6(4): 749-761.

**Hajek, A.E. y R.J. St. Leger. 1994.** Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annu. Rev. Entomol. 39: 293-322.

**Hajek, A.E. L. Butler y M.M. Wheeler. 1995.** Laboratory bioassays testing the host range of the gypsy moth fungal pathogen *Entomophaga maimaiga*. Biological Control 5: 530-544.

**Hall, R.A. y B. Papierok. 1982.** Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance. Parasitology 84: 205-240.

- Henderson, C.R. 2001.** Technique for positional slide-mounting of Acari. Systematic & applied acarology. Special publications 7: 1-4.
- Henrik, N.R., K.D. Hyde, J. Pawlowska, M. Ryberg, L. Tedersoo, A.B. Aas, S.A. Alias, A. Alves, C.L. Anderson, A. Antonelli, A.E. Arnold, B. Bahnmann, M. Bahram, J. Bengtsson-Palme, A. Berlin. 2014.** Improving ITS sequence data for identification of plant pathogenic fungi. Fungal diversity 67(1): 11-19.
- Hoy, M.A. 2011.** The strategy of integrated mite management. En: Hoy, M.A (Ed). Agricultural Acarology, Introduction to integrated mite management. CRS. Press. 47-81 pp.
- Huffaker, B.C., M. van De Vrie y J.A. McMurtry. 1969.** The ecology of tetranychid mites and their natural control. Annu. Rev. Entomol. 14: 125-174.
- Huffaker, C.B., M. van de Vrie y J.A. McMurtry. 1970.** Ecology of tetranychid mites and their natural enemies: a review. II Tetranychid populations and their possible control by predators: An Evaluation. Hilgardia 40(11): 391-458.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2017.** Anuario estadístico y geográfico de Campeche. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México. 399 p.
- Inglis, D.G., J. Enkerli y M.S. Goettel. 2012.** Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. En: Lacey, A.L. (Ed). Manual of techniques in invertebrate pathology. 2° ed. Academic Press. Nueva York. 189-252 pp.
- Jiménez, D. A. J. 2002.** Manual práctico para el cultivo de la papaya hawaiana. Earth. Guácimo, Costa Rica. 108 p.
- Kaya, K.H. y F.E. Vega. 2012.** Scope and basic principles of insect pathology. En: F.E. Vega y H.K. Kaya (Eds). Insect Pathology. 2° edición. Academic Press-Elsevier. 1-12 pp.
- Kouvelis, N.V., A. Sialakouma y M.A. Typas. 2008.** Mitochondrial gene sequences alone or combined with ITS region sequences provide firm molecular criteria for the classification of *Lecanicillium* species. Mycological Research 112: 829-844.
- Kranstz, G.W. y D.E. Walter. 2009.** A manual of acarology. 3ra edición. Texas Tech University Press. 805 p.
- Li, Z.Z. 1988.** A list of insect host of *Beauveria bassiana*. En: Li, Y.W., Z.Z. Li, Z.Q. Liang, J.W. Wu, Z.R. Wu y Q.F. Xi (Eds). Study and application of entomogenous fungi in China. Academic Periodical Press, Beijing, China. 241-255 pp.

- Lomelí-Flores, J.R., E. Rodríguez-Leyva, G. Otero-Colina, G. Mora-Aguilera y F. Esquivel-Chávez. 2008.** Primer reporte de *Tetranychus merganser* (Acari: Tetranychidae) sobre *Opuntia ficus-indica* L. en Tlalnepantla, Morelos. Entomología Mexicana 7: 21-25.
- Lopes, R.E.A., M.G.C. Gondim Jr., E. Calderan y I. Delalibera Jr. 2009.** Host range of *Neozygites floridana* isolates (Zygomycetes: Entomophthorales) to spider mites. Journal of invertebrate pathology 102: 196-202.
- López-Bautista, E., Ma.T. Santillán-Galicia, J. Suárez-Espinosa, N. Cruz-Huerta, N. Bautista-Martínez y J.A. Alcántara-Jiménez. 2016.** Damage caused by mite *Tetranychus merganser* (Trombidiformes: Tetranychidae) on *Carica papaya* (Violales: Caricaceae) plants and effect of two species of depredatory mite. International Journal of Acarology DOI: 10.1080/01647954.2016.1184714
- Luckey, D.T. 1968.** Insecticide hormoligosis. Journal of Economic Entomology 61(1): 7-12.
- Maketon, M., P. Orosz-Coghlan y J. Sinprasert. 2008.** Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) for control of broad mite *Polyphagotarsonemus latus* (Acari: Tarsonemidae) in mulberry. Exp. Appl. Acarol. 46: 157-167.
- Maniania, K.N., D.M. Bugeme, V.W. Wekesa, I. Delalibera Jr. y M. Knapp. 2008.** Role of entomopathogenic fungi in the control of *Tetranychus evansi* and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), pest of horticultural crops. Exp. Appl. Acarol. 46: 259-274.
- McMurtry, J.A. y B.A. Croft. 1997.** Life-styles of phytoseiid mites and their roles in biological control. Annu. Rev. Entomol. 42: 291-321.
- Migeon, A. y F. Dorkeld. 2007.** Spider mites web: a comprehensive database for the Tetranychidae. Disponible en <http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb/>
- Mikunthan, G. y M. Manjunatha. 2010.** Effect of monocrotophos and the acaropathogen, *Fusarium semitectum*, on the broad mite, *Polyphagotarsonemus latus*, and its predator *Amblyseius ovalis* in the field. En: M.W. Sabelis y J. Bruin (Eds). Trends in Acarology: Proceedings of the 12th international congress. Springer Science+Business. 489-492pp.
- Monjarás-Barrera, J.I., M. Lara-Villalón, M.C. Juárez-Aragón y J.A. Torres-Castillo. 2015.** New report of *Tetranychus merganser* Boudreaux and *Oligonychus punicae* Hirst on *Moringa oleifera* Lam. Southwestern Entomologist Scientific Note. 40(4): 847-849.
- Monjarás-Barrera, J.I., J.C. Chacón-Hernández, A. Mora-Olivo, A. Guerra-Pérez y M.J. Yáñez-Pacheco. 2017.** New record of *Tetranychus merganser* Boudreaux on *Thevetia ahouai* L. y *Acacia farnesiana* (L.) willd at Ciudad Victoria, Tamaulipas, Mexico. Southwestern Entomologist Scientific Note. 42(4): 1103-1105.

**Monzón, A. 2001.** Avances en el fomento de productos fitosanitarios no-sintéticos. Manejo Integrado de plagas (Costa Rica) 65: 95-103.

**Moths-Wagner, U. y K.A. Seitz. 1984.** Fine structure of the cuticle and structural changes occurring during moulting in the mite *Tetranychus urticae*. I. Fine structure of the cuticle. *Acarologia* 25(3): 253-258.

**Ortucu, S. y O.F. Algur. 2017.** A laboratory assessment of two local strains of the *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Against the *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and their potential as a mycopesticide. *Journal of Pathogens* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7628175>

**Otero-Colina, G. 2015.** Ácaros fitófagos asociados al papayo en México. En: Otero-Colina, G., M. Abato-Zárate y J. A. Villanueva-Jiménez (Eds). Ácaros asociados al cultivo de papayo en México. Biblioteca básica de agricultura. 43-72 pp.

**Pech-Chuc, C.M. 2008.** Identificación y caracterización de aislamientos de hongos entomopatógenos nativos del estado de Campeche y primer registro de *Cordyceps cardinalis* para México. Tesis Licenciatura. Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Calkini. 89p.

**Peña, E.J., L.S. Osborne y R.E. Duncan. 1996.** Potential of fungi as biocontrol agents of *Polyphagotarsonemus latus* (Acari: Tarsonemidae). *Entomophaga* 41(1): 27-36.

**ProPapaya. 2009.** Estudio de oportunidades de mercado e inteligencia comercial internacional de la papaya mexicana e identificación de necesidades de infraestructura logística. ProPapaya, Sistema producto papaya. 231p. Disponible en: [http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios\\_promercado/PAPAYA2009.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/PAPAYA2009.pdf) Consultado el 8-02-2017.

**Raros, S.E. y F.H. Haramoto. 1974.** Biology of *Stethorus siphonulus* Kapur (Coccinellidae: Coleoptera), a predator of spider mites, in Hawaii. *Proceedings, Hawaiian Entomological Society* 21(3): 457-465.

**Raeder, U. y P. Broda. 1985.** Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1: 17-20.

**Rehner, S.A. y E. Buckley. 2005.** A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97(1): 84-98.

**Rentería, A.M. 2007.** Breve revisión de los marcadores moleculares. En: Eguiarte, E.L., V. Souza y X. Aguirre (Comp). Ecología molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales- Instituto Nacional de Ecología- Universidad Nacional Autónoma de México- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. 541-566 pp.

**Reyes-Pérez, N., J.A. Villanueva-Jiménez, M. de la Cruz Vargas-Mendoza, H. Cabrera-Mireles y G. Otero-Colina. 2013.** Parámetros poblacionales de *Tetranychus merganser* Boudreaux (Acari: Tetranychidae) en papayo (*Carica papaya* L.) a diferentes temperaturas. Agrociencia 47: 147-157.

**Rios-Velasco, C., D.A. Pérez-Corral, M.A. Salas-Marina, D.I. Berlanga-Reyes, J.J. Ornelas-Paz, C.H. Acosta-Muñiz, J. Cambero-Campos y J.L. Jacobo-Cuellar. 2014.** Pathogenicity of the Hypocreales fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against insect pest of tomato. Southeastern entomologist 39(4): 739-750.

**Roberts, D.W. 1989.** World picture of biological control of insects by fungi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 84, Supl. III: 89-100.

**Rosas-Acevedo, J.L. y M.L. Sampedro-Rosas. 1990.** Parasitismo de *Hirsutella thompsonii* Fisher sobre *Phyllocoptruta oleivora* (Ashm) y *Aceria guerreronis* Keifer. Boletín Soc. Mex. Entomol. 9: 42-45.

**Rosenheim, A.J., D.D. Limburg, R.G. Colfer, V. Fournier, C.L. Hsu, T.E. Leonardo y E.H. Nelson. 2004.** Herbivore population suppression by an intermediate predator, *Phytoseiulus macropilis*, is insensitive to the presence of an intraguild predator: an advantage of small body size?. Oecologia 140: 577-585.

**Samson, A.R., C.W. McCoy y K.L. O'Donnell. 1980.** Taxonomy of the acarine parasite *Hirsutella thompsonii*. Mycologia 72(2): 359-377.

**Sanger, F., S. Nicklen y A.R. Coulson. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 74(12): 5463-5467.

**SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2017.** Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. Papaya mexicana. SAGARPA. CDMX, México. 16p.

**Scheldeman, X., T. Kyndt, G.C. d'Eeckenbrugge, R. Ming, R. Drew, B.V. Droogenbroeck, P.V. Damme y P.H. Moore. 2011.** *Vasconcellea*. En: Kole, C. (Ed). Wild crop relatives: genomic and breeding resources. Springer. Berlín, Alemania. pp 213-249.

**SDR (Secretaría de Desarrollo Rural). 2015.** Guía para el control de plagas y enfermedades en el cultivo del papayo, en el estado de Colima. Comité Estatal de Sanidad Vegetal (CESAVECOL)-Consejo Estatal de productores de papayo de Colima A.C.-Secretaría de Desarrollo Rural. Colima, México. 46p. Disponible en: <http://seder.col.gob.mx/Doc2015/GUIACONTROLPLAGASPAPAYO.pdf> consultado el: 4-marzo-2017.

**Shenoy, B.D., R. Jeewon y K.D. Hyde. 2007.** Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. *Fungal diversity* 26: 1-54.

**Shi, W.-B y M-G. Feng. 2004.** Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) with a description of a mite egg bioassay system. *Biological Control* 30(2): 165-173.

**Shin, Y.T., S.B. Bae, D.J. Kim, H.G. Yun, S.D. Woo. 2017.** Evaluation of virulence, tolerance to environmental factors and antimicrobial activities of entomopathogenic fungi against two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Mycoscience* 58: 204-212.

**SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2018.** Atlas agroalimentario 2012-2018. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). CDMX, México. 222p.

**SMN (Servicio Meteorológico Nacional). 2019.** Resúmenes mensuales de temperaturas y lluvia. Marzo. Disponible en: <https://smn.cna.gob.mx/es/climatologia/temperaturas-y-lluvias/resumenes-mensuales-de-temperaturas-y-lluvias>

**Solter, L.F., J.V. Maddox y M.L. McManus. 1997.** Host specificity of microsporidia (Protista: Microsporida) from European populations of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) to indigenous North American lepidoptera. *Journal of Invertebrate Pathology* 69: 135-150.

**Soto, G.A., M.D. Moreira y A. Pallini. 2011.** Análisis de la composición química de la cutícula de *Tetranychus evansi* Backer & Pritchard y de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Bol. Cient. Mus. Hist. Nat.* 15(2): 171-190.

**Storey, W. B. 1969.** Papaya (*Carica papaya* L.). En: Ferwerda, F. P. y F. Wit. (Eds.). *Outlines of perennial crop breeding in the tropics*. H. Veenman & Zonen N.V. Wageningen. pp: 389-407.

**Tafoyan, R. G. 1999.** Efecto de dos cofactores de crecimiento sobre el contenido de conidias producidas por *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin en un sistema tradicional

sólido de producción bifásica. Tesis de licenciatura: Ingeniero Agrónomo Fitotecnista. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro". Saltillo, Coahuila. 71p.

**Topuz, E., F. Eler y E. Gumrukcu. 2016.** Survey of indigenous entomopathogenic fungi and evaluation of their pathogenicity against the carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus* (Boisd.), and the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B. *Pest Manag Sci* 72: 2273-2279.

**Tree of Life. 1995.** Web projet. Arthropoda. Disponible en: <http://www.tolweb.org/Arthropoda/2469>

**Tuttle, M.D., E.W. Baker y M.J. Abbatiello. 1976.** Spider mites of Mexico (Acari: Tetranychidae). *Intl. J. Acar.* 2(2): 1-102.

**Ullah, M.S., D. Moriya, M. Kongchuensin, P. Konvipasruang y T. Gotoh. 2011.** Comparative toxicity of acaricides to *Tetranychus merganser* Boudreaux y *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acari: Tetranychidae). *International Journal of Acarology* 37(6): 535-543.

**Valencia-Domínguez, M.H., G. Otero-Colina, Ma.T. Santillán-Galicia y E. Hernández-Castro. 2011.** Acarofauna en papaya var. maradol (*Carica papaya* L.) en el estado de Yucatán, México. *Entomotropica* 26(1): 17-30.

**Valencia, S. K., Duana, A. D. y Hernández, G. J. T. 2017.** Estudio de mercado de papaya mexicana: un análisis de su competitividad (2001-2015). *Suma de negocios* 8: 131-139.

**van der Geest, L.P.S., S.L. Elliot, J.A.J. Breeuwer y E.A.M., Beerling. 2000.** Diseases of mites. *Experimental and Applied Acarology* 24: 497-560.

**Van Leeuwen, T., J. Vontas, y A. Tsagkaarakou. 2009.** Mechanisms of acaricide resistance in the two spotted spider mite *Tetranychus urticae*. En: Ishaaya, I., Horowitz, A. R. (Eds). *Biorational control of arthropod pests*. Springer, The Netherlands. 347-393 pp.

**Van Leeuwen, T., J. Vontas, A. Tsagkarakou, W. Dermauw y L. Tirry. 2010.** Acaricide resistane mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychis urticae* and other important Acari: A review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40: 563-572.

**Vega, E.F., N.V. Meyling, J.J. Luangsa-ard y M. Blackwell. 2012.** Fungal Entomopathogens. En: Vega, E.F. Y H.K. Kaya. *Insect Pathology*. 2° edición. Academic Press-Elsevier. 171-220pp.

**Villegas-Elizalde, E.S., J.C. Rodríguez-Maciél, S. Anaya-Rosales, H. Sánchez-Arroyo, J. Hernández-Morales y R. Bujanos-Muñiz. 2010.** Resistencia a acaricidas en

*Tetranychus urticae* (Koch) asociada al cultivo de fresa en Zamora, Michoacán, México. *Agrociencia* 44(1): 75-81.

**Villanueva-Jiménez, J.A. y R. Peña-Martínez. 1991.** Áfidos (Homoptera: Aphididae) colectados en “trampas amarillas de agua” en la planicie costera de Veracruz-México. *Agrociencia serie Protección vegetal* 1(2): 7-20.

**Wang, J.J., L. Yang, X. Qiu, Y.-G. Liu, W. Zhou y Y.-J. Wan. 2013.** Diversity analysis of *Beauveria bassiana* isolated from infected silkworm in southwest China based on molecular data and morphological features of colony. *World J. Microbiol Biotechnol* 29: 1263-1269.

**Weintraub, G. P., S. Kleitman, R. Mori, N. Shapira, y E. Palevsky. 2003.** Control of the broad mite (*Polyphagotarsonemus latus* (Banks)) on organic greenhouse sweet peppers (*Capsicum annuum* L.) with the predatory mite, *Neoseiulus cucumeris* (Oudemans). *Biological Control* 27: 300-309.

**Whalon, M. E., Mota-Sánchez, R. M., Hollingworth, R. M. y Duynslager, L. 2018.** Arthropod Pesticide Resistance Database. Disponible en: <https://www.pesticideresistance.org/search.php> Consultada: 8 septiembre 2018.

**White, T.J., T. Bruns, S. Lee y J. Taylor. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky y T.J. White (Eds). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press Inn. California. 315-322 pp.

**Wraight, S.P. y M.E. Ramos. 2002.** Application parameters affecting field efficacy of *Beauveria bassiana* foliar treatments against Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Biological Control*. 23(2): 164-178.

**Wu, S., H. Xie, M. Li, X. Xu y Z. Lei. 2016.** Highly virulent *Beauveria bassiana* strains against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, show no pathogenicity against five phyto-seiid mite species. *Exp. Appl. Acarol* 70: 421-435.

**Zare, R. y W. Gams. 2001.** A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. *Nova Hedwigia* 73:1-50.

**Zhang, L., W.-B. Shi y M.-G. Feng. 2014.** Histopathological and molecular insights into the ovicidal activities of two entomopathogenic fungi against two-spotted spider mite. *Journal of invertebrate pathology* 117:73-78.

**Zhang, X., D. Jin, X. Zou y J. Guo. 2016.** Laboratory and field evaluation of an entomopathogenic fungus, *Isaria cateniannulata* strain 08XS-1, against *Tetranychus urticae* (Koch). *SCI*. DOI 10.1002/ps.4233