



# Efecto de *Lecanicillium lecanii* y *Beauveria bassiana* sobre *Planococcus citri* en condiciones de laboratorio

## *Lecanicillium lecanii* and *Beauveria bassiana* effect on *Planococcus citri* under laboratory conditions

Karen L. Avalos Vela y Juan Wilson-Kugg

<sup>1</sup>Tesista Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú.

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT.

### RESUMEN

Se evaluó el efecto de *Lecanicillium lecanii* (Zimm) y *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill sobre *Planococcus citri* (Risso) en condiciones de laboratorio. Se emplearon hojas de limón que fueron infestadas con 20 ninfas de *P. citri* y luego fueron inoculados con *L. lecanii* a las dosis de  $10^6$  y  $10^7$  conidios/mL con ayuda de un aspersor manual, procediendo de la misma forma con *B. bassiana*. Los tratamientos fueron distribuidos aleatoriamente. La muerte de las ninfas de *P. citri* se produjo a las 72 horas después de la aplicación con los siguientes porcentajes de mortandad: 81.5 y 80.0% con *L. lecanii*, y 78.3 y 85.0% con *B. bassiana*, a las concentraciones de  $10^6$  y  $10^7$  conidios/mL, respectivamente (no existe diferencia significativa con los demás tratamientos), aunque sí ( $p < 0,05$ ) con el control que presentó 10.0% de mortandad.

**Palabras clave:** *Lecanicillium lecanii*, *Beauveria bassiana*, *Planococcus citri*, % de mortandad

### ABSTRACT

*Lecanicillium lecanii* (Zimm) and *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill effect on *Planococcus citri* (Risso) under laboratory conditions was evaluated. Lemon leaves were infested with 20 *P. citri* nymphs AND then inoculated with *L. lecanii* at doses of  $10^6$  and  $10^7$  conidia/mL using a hand sprayer, proceeding in the same way with *B. bassiana* is used. The treatments were randomized. The death of *P. citri* nymphs occurred 72 hours after application with mortality following percentages: 81.5 and 80.0% with *L. lecanii*, and 78.3 and 85.0% with *B. bassiana*, at concentrations of  $10^6$  and  $10^7$  conidia/mL, respectively (there is no significant difference with other treatments), although ( $p < 0.05$ ) with the control showed 10.0% mortality.

**Keywords:** *Lecanicillium lecanii*, *Beauveria bassiana*, *Planococcus citri*, % mortality

## INTRODUCCIÓN

Los insectos plaga producen graves daños en la agricultura y, dentro de ellos, *Planococcus citri*, conocida como cochinilla algodonosa o chanchito blanco, es considerada como una de las más perjudiciales en particular para los cultivos de vid, cítricos y plantas ornamentales, no solo por ser fitófago sino también por su capacidad vectorial de virus fitopatógenos<sup>1,2,3,4</sup>.

Cuando la hembra de *P. citri* es fecundada oviposita cientos de huevos en una cubierta algodonosa denominada ovisaco, de donde emergen las ninfas que se alimentan de las raíces, hojas y frutos del vegetal y excretan una mielecilla que favorece el desarrollo de fumagina lo que resta valor comercial a los productos; dependiendo de las condiciones ambientales, puede presentar hasta 10 generaciones al año<sup>5</sup>.

El uso de productos químicos, tales como, buprofezin, pyriproxyfen, flonicamid, acetamiprid, dinotefuran, clotianidina y kinoprene representa una de las principales estrategias de control de la cochinilla algodonosa; sin embargo, éstos no respetan los controladores naturales, factor importante de la regulación natural de esta plaga<sup>6,7</sup>. Por ello, y en un intento por resarcir este daño, se realizan liberaciones inundativas de *Leptomastix dactylopii*<sup>7</sup>, *Spalgis epius*<sup>8</sup>, *Cryptolaemus montrouzieri*<sup>9</sup>, *Leptomastidea abnormis*<sup>10</sup> y *Symphorobius barberi*<sup>11</sup>, siendo los tres últimos los controladores más comúnmente usados. Al mismo tiempo, se han utilizado a los nematodos *Steinernema* spp. y *Heterorhabditis bacteriophora*<sup>12</sup>, feromonas sexuales<sup>13,14</sup> y a los hongos entomopatógenos *Isaria farinosa*<sup>15,16</sup> y *Metarhizium anisopliae*<sup>17</sup>.

En este contexto, la utilización de los hongos entomopatógenos en la agricultura ha ido en aumento en los últimos años debido al gran potencial que tienen en el manejo de plagas, representando una alternativa eficiente al uso de insecticidas químicos, considerados altamente nocivos para la salud del hombre y los ecosistemas<sup>18,19,20</sup>. En efecto, se ha registrado que *Lecanicillium lecanii* controla veinte especies pertenecen a la familia Coccidae<sup>21,22,23</sup>, diez especies a la familia Diaspididae<sup>24</sup>, diez especies a la familia Pseudococcidae<sup>25,26</sup>, una especie a la familia Margarodidae<sup>27</sup> y una especie a la familia Phoenicococcidae<sup>28</sup> y que *Beauveria bassiana* a insectos de los Ordenes Lepidoptera (Pyrilidae) y Coleoptera (Curculionidae, Chrysomelidae y Scolytidae)<sup>29,30</sup>.

En este informe se presentan los resultados de una investigación orientada a determinar el efecto de *L. lecanii* (Zimm) y *B. bassiana* (Bals) Vuill. sobre *P. citri* (Risso), en condiciones de laboratorio.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material de estudio

- Cultivo puro de *Lecanicillium lecanii* proporcionado por el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo.
- Cultivo puro de *Beauveria bassiana* proporcionado por el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo.
- Un núcleo de *Planococcus citri* (conformado por 1g de las colonias del insecto) proporcionado por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú (SENASA).

### Crianza de adultos y obtención de ninfas de *Planococcus citri*:

Se obtuvieron las ninfas del núcleo otorgado por SENASA- Lima luego se colocaron en calabacines de zapallito italiano (*Cucurbita pepo* var. Zucchini grey) previamente lavados y desinfectados. Los calabacines infestados se colocaron en una caja de cartón y fueron mantenidos en el laboratorio, monitoreando la temperatura y la humedad relativa. Los especímenes de *P. citri* fueron puestos en cuarentena realizando cambios periódicos de alimento (calabacines) para evitar la contaminación de la colonia por agentes no deseados como parasitoides y hongos.

### Reactivación de *Lecanicillium lecanii* y *Beauveria bassiana*:

Con el fin de recuperar la actividad metabólica de ambos hongos y se obtener cultivo puro en mayor cantidad se utilizó Agar Sabouraud (ASb), se extrajo micelio del cultivo inicial, se sembró por puntura y se incubó a  $25 \pm 0.1$  °C.

### Propagación, estandarización del inóculo e inoculación

Se preparó una suspensión de *L. lecanii* en solución estéril de Tween 80 al 0.1%, la cual se utilizó para propagar el hongo ASb inclinado (contenido en frascos planos), se utilizó 0.1 ml de la suspensión del hongo, se incubó a  $25 \pm 0.1$  °C hasta la formación de esporas. Posteriormente, se les agregó una solución acuosa de Tween 80 al 0.1%, para obtener las esporas. La suspensión de esporas fue colocada en un matraz estéril. Luego se estandarizó en cámara de Neubauer® a las concentraciones de  $10^6$  y  $10^7$  las que sirvieron de inóculo. Los mismos pasos se siguieron para preparar el inóculo de *B. bassiana*.

La muestra estuvo constituida por 300 de ninfas de *P.citri*, de las cuales 4 grupos de 20 ninfas fueron ejemplares problema y otro de grupo de 20 ninfas fueron ejemplares testigos, realizando un total de 3 repeticiones. A los ejemplares problema se les inoculó por aspersión una suspensión de esporas en Tween 80 al 0,1%, siendo la concentraciones utilizadas  $10^6$  y  $10^7$  esporas/ml de *L. lecanii*. Se siguieron los mismos pasos para el caso de *B. bassiana*. Mientras que, los ejemplares testigo se les inoculó una solución acuosa de Tween 80 al 0,1%. Para este procedimiento se realizó la infestación de hojas de limón con *P. citri* que fue criado en calabacines, estas hojas fueron colocadas en recipientes de plástico adaptado para permitir el intercambio gaseoso y evitar la fuga de los especímenes.

### Evaluación de la actividad entomopatogena

Después de la inoculación se evaluó cada 24 horas la aparición de síntomas y/o signos de la infección micótica que presentaron las ninfas problema en comparación a los testigos. La observación de cada una de las ninfas y el posible progreso de la infección micótica se realizó diariamente anotando la aparición de síntomas como pérdida de apetito, parálisis, pigmentaciones, u otros, que se produjeron durante el ensayo, siendo el tiempo máximo de observación 14 días (tanto problema como testigo).

### Recuperación e identificación de *L. lecanii* y *B. bassiana*

Este procedimiento se realizó con la finalidad de corroborar la causa de la muerte de las ninfas de *P. citri* y consistió en colocar los especímenes muertos en cámara húmeda e incubados a temperatura ambiental, una vez emergido el hongo se extrajo con ayuda de un asa microbiológica y se sembró en un tubo de ensayo con ASb para posteriormente realizar un microcultivo e identificar las estructuras características de *L. lecanii* y *B. bassiana*

### Análisis de datos

Los datos obtenidos se procesaron utilizando el paquete estadístico SPSS v.20, aplicando un análisis de varianza simple para comparar las medias de mortandad producida por el hongo evaluado; aplicándose, un análisis postanova mediante la prueba de Tukey.

## RESULTADOS

Se observaron diversos síntomas y signos, luego la muerte, en las ninfas de *P. citri* luego que fueron inoculadas con *L. lecanii* y *B. bassiana* a las dos concentraciones de conidias prescritas (Tabla 1, Fig. 1). Se encontró, asimismo, diferencia significativa entre control (10%) y los tratamientos, mas no entre los tratamientos (Fig. 2).

Tabla 1. Síntomas y/o signos observados en ninfas de *Planococcus citri* inoculadas con dos concentraciones de *Lecanicillium lecanii* y *Beauveria bassiana*

Síntomas y/o signos observados	Conidios/mL				
	control	<i>Lecanicillium lecanii</i>		<i>Beauveria bassiana</i>	
	0*	$10^6$	$10^7$	$10^6$	$10^7$
Pérdida del apetito	-	+	+	+	+
Escasa movilidad	-	+	+	+	+
Oscurecimiento (melanización)	-	+	+	+	+
Muerte	+	+	+	+	+
Aparición de micelio	-	+	+	+	+
Momificación	-	+	+	+	+

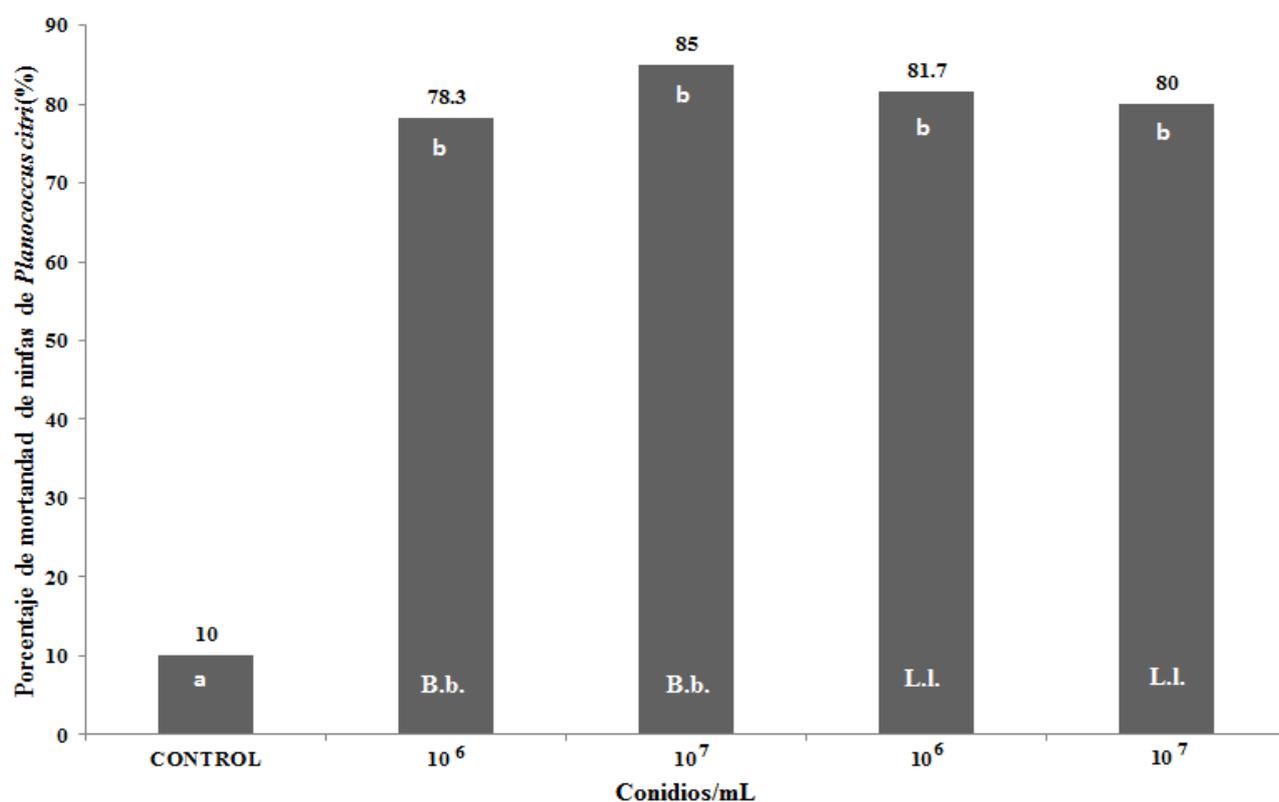
(\*) Representa al control, (-) Sin presencia, (+) Presencia

## DISCUSIÓN

Los síntomas observados en las ninfas de *P. citri* son debido a que los hongos entomopatógenos, a diferencia de otros agentes de control, no necesitan ser ingeridos por el insecto, pudiendo ocurrir la infección por contacto y adhesión de las esporas a las partes bucales, membranas intersegmentales o a través de los espiráculos<sup>31</sup>.



**Fig. 1.** Ninfas de *Planococcus citri* inoculadas con *Lecanicillium lecanii* (Panel izquierdo): a, control; b, muerta con oscurecimiento en la parte ventral; c, momificada y d, cubierta con micelio y con *Beauveria bassiana* (panel derecho): a, control; b, momificada y c, cubierta con micelio.



**Fig. 2.** Porcentaje de mortandad de ninfas de *Planococcus citri* inoculadas con dos concentraciones de *Lecanicillium lecanii* y *Beauveria bassiana* a las 72 horas post-inoculación. (B.b.: *Beauveria bassiana*; L.l.: *Lecanicillium lecanii*; a:  $p < 0.05$ , existe diferencia significativa, b:  $p > 0.05$ , no existe diferencia significativa).

Es así que, la adhesión de los conidios de los hongos entomopatógenos a la cutícula del hospedero es la etapa inicial del proceso patogénico e incluye eventos tanto pasivos como activos<sup>32</sup>, lo cual ha sugerido que iones divalentes como el  $\text{Ca}^{+2}$  y el  $\text{Mg}^{+2}$  reducen las fuerzas de repulsión de la electrostática de la superficie del insecto, por lo que pueden afectar su hidrofobicidad y promover la adhesión del complejo pared celular fúngica-cutícula, creando condiciones favorables para el establecimiento de la espora y la subsecuente invasión del hospedero<sup>31</sup>.

Luego de la adhesión viene la germinación de la espora que se inicia con el hinchamiento de la misma, siendo favorecido por una humedad alta; así mismo la hidratación de la espora es favorecida por la acción anti-desecante de su cubierta mucilaginoso que presenta un alto contenido de aminopeptidasas e hidrofobinas, las cuales favorecen la acción de las enzimas extracelulares sobre la cutícula del insecto., que además funciona como protector ante la presencia de polifenoles tóxicos y enzimas secretadas por el sistema inmune del insecto; luego es estimulada por mensajeros que generalmente son carbohidratos presentes en las proteínas cuticulares del insecto<sup>31</sup>.

Tanto *L. lecanii* como *B. bassiana* logran penetrar la cutícula de las ninfas de *P. citri* debido a que producen enzimas tales como lipasas, proteasas y quitinasas, utilizando una combinación de estas para penetrar en la cutícula<sup>33,34</sup> y acceder al hemocele del hospedero que es rico en nutrientes<sup>32</sup>, lo cual produce disturbios en el organismo del insecto (Tabla 1).

Durante la penetración del hongo desde la cutícula del insecto hasta el hemocele, la hifa queda inmersa en proteínas, quitina, lípidos, melanina, difenoles y carbohidratos; algunos de ellos son nutrimentos pero otros pueden inhibir su crecimiento, sin embargo, los hongos desarrollan una serie de actividades que les permiten evitar este tipo de defensas, tales como cambios en la pared celular y producción de sustancias inmunomoduladoras o toxinas fúngicas<sup>35,36</sup>. Después de la penetración de las hifas, éstas se diseminan vía hemolinfa, producen blastosporas y cuerpos filamentosos de hifas que invaden el sistema inmune del hospedero multiplicándose rápidamente en los tejidos.

Cabe resaltar la producción de micotoxinas dentro de las actividades que realizan los hongos entomopatógenos, *L. lecanii* y *B. bassiana*, las cuales son metabolitos fúngicos secundarios que hacen parte de los mecanismos de infección y pueden dar lugar a una respuesta tóxica en diferentes organismos. Ellos son producidos por una serie de reacciones consecutivas, las cuales son catalizadas por enzimas intermediarias del metabolismo primario<sup>37</sup>.

Además se conoce que *B. bassiana* produce beauvericinas, beauverolidos y destruxinas, la actividad insecticida de la beauvericina fue descubierta por primera vez por Hamill et al.<sup>38</sup> quienes afirman que es el compuesto activo de *B. bassiana* enfrentándolo a *Artimia salina*; posteriormente, fue investigado en *Calliphora erythrocephala*, *Aedes aegypti*, *Lygus* spp., *Spodoptera frugiperda* y *Schizaphis graminum*<sup>39,40,41,42</sup>. A pesar de que la beauvericina por sí sola tiene una fuerte actividad insecticida contra un amplio espectro de plagas, no se ha aplicado como tal debido a, el movimiento de los insectos y a que al aplicar el hongo entomopatógeno este puede propagarse en el cuerpo del insecto y se extenderse ampliamente<sup>42</sup>. A pesar de las similitudes entre las estructuras químicas de beauvericina y otras micotoxinas hexadepsipeptide cíclicos<sup>39</sup> esta puede tener un mecanismo de acción único.

*B. bassiana* también secreta otros compuestos conocidos como beauverolidos L que poseen una fuerte acción inmunomoduladora pero no un efecto insecticida<sup>43</sup>, por otro lado también están las destruxinas que inducen parálisis flácida y la contracción muscular visceral en los insectos; estos efectos citotóxicos en las células epiteliales probablemente sea porque envuelven los canales  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPasa tipo vacuolar<sup>44,45</sup>.

En cambio *L. lecanii* secreta una serie de metabolitos secundarios los cuales se constituyen toxinas que producen una reducción del potencial de progenie y disuaden la actividad alimenticia en *Bemisia tabaci*<sup>46</sup>, insecto que posee un hábito alimenticio similar al de *P. citri*, lo cual sugiere un reacción similar.

Las toxinas que estos organismos producen cumplen una función muy importante dentro de los mecanismos de infección de los hongos entomopatógenos<sup>37</sup> en la lucha por evadir los mecanismos de defensa del insecto. El sistema inmune del insecto se activa a través de los procesos de melanización, fagocitosis, nodulación y encapsulamiento; la melanina sustancia responsable del oscurecimiento del tejido, debido a ello las ninfas tratadas con *L. lecanii* y *B. bassiana* se tornan oscuras en comparación a las del control.

Luego de sobrepasados los mecanismos de defensa del insecto este perece y el hongo entomopatógeno entra en la fase de colonización y al agotar los nutrientes y el agua presentes en el

interior de la ninfa esta se momifica, posteriormente el hongo emerge desarrollando sus hifas en la superficie de ésta. Finalmente, el hongo deja de crecer y comienza a esporular<sup>31,47</sup>.

Mientras ocurren todos los procesos antes mencionado se pueden observar efectos en el comportamiento de las ninfas de *P. citri*, como no poder adherirse y caerse de las hojas que le sirven de alimento, posiblemente por la acción de las toxinas en el sistema nervioso; la pérdida de apetito que se manifiesta por la reducción de nivel de daño en las hojas sobre las que se encontraban, esto ocurre por pérdida de la integridad estructural de las membranas celulares y la consecuente deshidratación de las células causado por pérdidas de fluidos, todo esto ocurre por la acción mecánica de las hifas y la acción química de las toxinas de *L. lecanii* o *B. bassiana*, llevándolas a la muerte<sup>35</sup>.

La aplicación de *L. lecanii* produjo una mortandad de 81.7% y 80% a las concentraciones de  $10^6$  y  $10^7$ , respectivamente, y *B. bassiana* produjo una mortandad de 78.3% y 85% a las concentraciones de  $10^6$  y  $10^7$ , respectivamente; existiendo diferencia significativa con el control sin embargo no existe diferencia significativa entre los cuatro tratamientos. Debemos tener en cuenta que los resultados pueden verse influenciados por muchos factores como la temperatura (que puede afectar la estabilidad del entomopatógeno y perder la patogenicidad), la humedad relativa (puede intervenir en las diferentes fases del ciclo de infección del hongo sobre el huésped), lo relacionado con el hongo (concentración y tiempo de vida media), suelo (textura, pH, cantidad y tipo de microorganismos), agroquímicos (algunos tienen acción fungicida o fungistático) así como la radiación solar, los vegetales y las precipitaciones<sup>45,47</sup>.

En cuanto al porcentaje de mortandad, se observó un 85% al aplicar *B. bassiana* a la concentración de  $10^7$  conidios/mL el cual podemos comparar los resultados<sup>47</sup> donde reportan 80% de mortandad en ninfas de *P. citri* a una dosis de  $10^8$  conidios/mL, donde utilizaron un producto comercial y una dosis superior a la utilizada en el presente trabajo, el 5% de diferencia que se obtuvo puede deberse a la virulencia del aislamiento de *B. bassiana* utilizado, también se observa un menor aumento de la mortandad al utilizar *M. anisopliae* (78%)<sup>17</sup>, e *Isaria farinosa* (50-60%) a la misma concentración ( $10^7$  conidios/mL)<sup>15</sup>.

## CONCLUSIÓN

- *Lecanicillium lecanii* y *Beauveria bassiana* tienen un efecto significativo en el aumento de la mortandad de las ninfas de *Planococcus citri*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Franco JC, Suma P, Borges da Silva E, Blumberg D, Mendel Z. Management strategies of mealybug pest of citrus in mediterranean countries. *Phytoparasitica*. 2004; 32(5): 507-522.
2. Kol-Maimon H, Ghanim M, Franco JC, Mendel Z. Evidence for gene flow between two sympatric mealybug species (Insecta; Coccoidea; Pseudococcidae). *PLoS ONE*. 2014; 9(2): e88433
3. Cabaleiro C, Segura A. Field transmission of grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3) by the mealybug *Planococcus citri*. *Plant dis.* 1997; 81: 283-287.
4. Mani M. Recovery of the indigenous *Coccidoxenoides peregrinus* and the exotic *Leptomastix dactylopii* on *Planococcus citri* in lemon and acid lime orchards. *Biocontrol Sci Techn.* 1994; 4(1):49-52.
5. Morandi Filho WJ, Grützmacher AD, Botton M, Bertin A. Biología e tabela de vida de fertilidade de *Planococcus citri* em diferentes estruturas vegetativas de cultivares de videira. *Pesq agropec bras.* 2008; 43(8): 941-947.
6. Cloyd RA, Dickinson A. Effect of insecticides on mealybug destroyer (Coleoptera: Coccinellidae) and parasitoid *Leptomastix dactylopii* (Hymenoptera: Encyrtidae), natural enemies of citrus mealybug (Homoptera: Pseudococcidae). *J Econ Entomol.* 2006; 99(5):1596-604.
7. Rothwangl KB, Cloyd RA, Wiedenmann RN. Effects of insect growth regulators on citrus mealybug parasitoid *Leptomastix dactylopii* (Hymenoptera: Encyrtidae). *J Econ Entomol.* 2004; 97(4):1239-44.
8. Afifi Ali, El Arnaouty SA, Attia AR, Abd Alla Ael-M. Biological control of citrus mealybug, *Planococcus citri* (Risso) using coccinellid predator, *Cryptolaemus montrouzieri* Muls. *Pak J Biol Sci.* 2010; 13(5):216-22.
9. Dinesh AS, Venkatesha MG. Inter- and intraspecific interactions in two mealybug predators *Spalgis epius* and *Cryptolaemus montrouzieri* in the presence and absence of prey. *Bull Entomol Res.* 2014; 104(1):48-55. doi: 10.1017/S0007485313000485

10. Cadée N, van Alphen JJM. Host selection and sex allocation in *Leptomastidea abnormis*, a parasitoid of the citrus mealybug *Planococcus citri*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 1997, 83: 277–284. doi: 10.1046/j.1570-7458.1997.00182.x
11. Reeve RJ; French JV. Laboratory toxicity of pesticides to the brown lacewing *Symphtherobius barberi*. *South western Entomol*. 1978; 3(2): 121-123.
12. Barbosa Negrisoni CR, Negrisoni Júnior AS, Botton M, Garcia MS, Bernardi D. Evaluation of efficacy of 18 strains of entomopathogenic nematodes (Rhabditida) against *Planococcus citri* (Risso, 1813) (Hemiptera: Pseudococcidae) under laboratory conditions. *Exp Parasitol*. 2013; 134(3):295-8. doi: 10.1016/j.exppara.2013.02.002.
13. Passaro LC, Webster FX. Synthesis of the female sex pheromone of the citrus mealybug, *Planococcus citri*. *J Agric Food Chem*. 2004; 52(10):2896-9.
14. Zada A, Dunkelblum E, Harel M, Assael F, Gross S, Mendel Z. Sex pheromone of the citrus mealybug *Planococcus citri*: synthesis and optimization of trap parameters. *J Econ Entomol*. 2004; 97(2):361-8.
15. Demirci F, Muştu M, Bora Kaydan M, Ülgentürk S. Laboratory evaluation of the effectiveness of the entomopathogen; *Isaria farinosa*, on citrus mealybug, *Planococcus citri*. *Journal of Pest Science*. 2011; 84(3): 337-342.
16. Demirci F, Muştu M, Bora Kaydan M, Ülgentürk S. Effects of some fungicides on *Isaria farinosa*, and in vitro growth and infection rate on *Planococcus citri*. *Phytoparasitica*. 2011; 39(4):353-360
17. Mascarin GM, Pauli G, Lopes RB. Susceptibility of the citrus mealybug, *Planococcus citri*, to *Metarhizium anisopliae*. *Citrus Res Techn*. 2011; 32(3):155-160.
18. Guaharay F, Chaput P. Control Biológico Ayer Hoy y Siempre. En: Cano E, López JA, Carballo M, Fernández O, Gonzáles L, Gruber AK, y otros. Guaharay F, Carballo M [Editores]. *Control Biológico de plagas agrícolas*. Managua, Costa Rica: Catie, 2004.
19. Butt TM, Jackson C, Magan N. Introduction- Fungal Biological Control Agentes: Progress, Problems and Potential. En: Butt TM, Jackson C, Magan N. *Fungal as Biocontrol Agentes: Progress, Problems and Potential*. London, UK: Cabi Publishing, 2001.
20. Téllez-Jurado A, Cruz-Ramírez MG, Mercado-Flores Y, Asaff-Torres A, et al. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Rev Mex Mic*. 2009; 30: 73-80.
21. Evans HC, Hywel-Jones NL. Entomopathogenic fungi. In: Ben-Dov Y, Hodgson CJ (eds.), *Soft Scale Insects: Their Biology, Natural Enemies and Control*, vol. 7B1. New York: Elsevier, 1997.
22. Cavallazzi G, Prieto A, Ariza R. Evaluation of the entomopathogenic *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas in the control of the soft scale *Philephedra tuberculosa* Nakahara & Gill in the Guanabana (*Annona muricata*). *Agronomy Colombiana*. 1998; 15 (2-3), 106–111.
23. Lo PL, Chapman RB. The role of parasitoids and entomopathogenic fungi in mortality of third-instar and adult *Ceroplastes destructor* and *C. sinensis* (Hemiptera: Coccidae: Ceroplastinae) on citrus in New Zealand. *Biocontrol Sci and Techn*. 1998; 8 (4): 573–582.
24. Evans HC, Prior C. Entomopathogenic fungi. En: Rosen D. (ed.) *Armored Scale Insects: Their Biology, Natural Enemies and Control*, vol. B1. Amsterdam: Elsevier, 1990; pp.8-15.
25. Yin FM, Chen QC, Ye Y. Technology study on the control of *Oracella acuta* by *Verticillium lecanii*. *Forest Sci Techn*. 1996; 5: 15–18.
26. Yin FM, Qin CS, Chen QC. Study on the control of *Oracella acuta* by *Verticillium lecanii*. *Forest Sci Techn*. 2000; 16 (1): 41–44.
27. Asensio L, Lopez-Llorca LV, Lopez-Jimenez JA. Use of light, scanning electron microscopy and bioassays to evaluate parasitism by entomopathogenic fungi of the red scale insect of palms (*Phoenicococcus marlatti* Ckll., 1899). *Micron*. 2005; 36 (2): 169–175.
28. Yuan SY, Kong Q, Zhang H, Li ZY, Chen B, Zhu CY. Laboratory assessment of the virulence of *Verticillium lecanii* Viegas to *Trialeurodes vaporariorum* and *Icerya purchasi* maskeli. *China J*. 2007; 32 (1): 111-114.
29. Maurer P, Couteaudier Y, Girard PA, Bridge PD, Riba G. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycol Res*. 1997; 101(2):159-164.
30. Wraight SP, Carruthers RI, Jaronski ST, Bradley CA, et al. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silver leaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biol control*. 2000; 17:203-217.
31. Pucheta M, Flores A, Rodríguez S, de la Torre M. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*. 2006; 31(12):856- 860.
32. Ment D, Gindin G, Rot A, Soroker V, Glazer I, Barel Sh et al. Novel technique for quantifying adhesion of *Metarhizium anisopliae* conidia to the tick cuticle. *Appl Environ Microbiol*. 2012; 76(11):3521-3528.
33. Pedrini N, Ortiz-Urquiza, Huerte-Bonnet C, Zhang S, Keyhani NO. Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Front Microbiol*. 2013; 4(24). doi:10.3389/fmicb.2013.00024.

34. Rocha-Pino Z, Viguera G, Shirai K. Production and activities of chitinases and hydrophobins. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2011; 34:681-686.
35. Mnyone L, Kirby M, Lwetoijera D, Mpingwa M, Knols B, Takken W *et al.* Infection of de Malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, with two species of entomopathogenic fungi: effect of concentration, co-formulation, exposure time and persistence. *Malar J.* 2009; 8:309-320.
36. Wang Ch, St Leger RJ, Acollagenus protective coat enable *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proc Natl Acad Sci.* 2006; 103(17): 6647-6652.
37. Arboleda JW, Delgado F, Valencia A. efecto de la toxina beauvericina sobre *Hypothenemus hampei*. *Manejo integrado de plagas y agroecología.* 2003; 68: 71-76.
38. Hamill, R.L.; Higgins, G.E.; Boaz, H.E.; Gorman, M. The structure of beauvericin, a new desipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrahedron Lett.* 1969, 49, 4255-4258.
39. Grove, J.F.; Pople, M. The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex. *Mycopathologia.* 1980; 70: 103-105.
40. Jestoi M. Emerging Fusarium - Mycotoxins Fusaproliferin, Beauvericin, Enniatins, And Moniliformin - A Review. *Crit Rev Food Sci.* 2008; 48: 21- 49.
41. Fornelli F, Minervini F, Logrieco A. Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). *J Invertebr Pathol.* 2004, 85: 74-79.
42. Leland JE, McGuire MR, Grace JA, Jaronski ST, Ulloa M, Park Y, Plattner RD. Strain selection of a fungal entomopathogen, *Beauveria bassiana*, for control of plant bugs (*Lygus* spp.)(Heteroptera: Miridae). *Biol Control.* 2005; 35: 104-114.
43. Jegorov A, Sedmera P, Matha V, Simek P, Zahradnickova L, Eyal J. Beauverolides L and La from *Beauveria tenella* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Phytochemistry.* 1994; 37:1301-1303.
44. Wang B, Kang Q, Lu Y, Bai L, Wang Ch. Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. *Proc Natl Acad Sci.* 2012; 109(4): 1287-1292.
45. Roberts DW, St Leger RJ. Toxins. En: Roberts DW, St Leger R. *Metarhizium* spp., Cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects. *Adv Appl Microbiol.* 2004; 54: 13- 17.
46. Wang L, Huang J, You M, Guan X, Liu B. Toxicity and feeding deterrence of crude toxin extracts of *Lecanicillium (Veticillium) lecanii* (Hyphomycetes) against sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera:Aleyrodidae). *Pest Manag Sci.* 2007; 63:381-387.
47. Ojeda-Chi M, Rodríguez-Vivas R, Galindo-Velasco E, Lezama-Gutiérrez R, Cruz-Vázquez C. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatígeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Rev Mex Cienc Pecu.* 2011; 2(2): 177-192.