

**Compatibilidad del hongo entomopatógeno  
*Isaria fumosorosea* con la mariquita *Thalassa  
montezumae* para control de la escama verde  
del croton, *Phalacrocooccus howertoni*  
(Hemiptera: Coccidae)**

**Carlos Francisco Sánchez Barahona**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras  
Noviembre, 2015**

ZAMORANO  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Compatibilidad del hongo entomopatógeno  
*Isaria fumosorosea* con la mariquita *Thalassa  
montezumae* para control de la escama verde  
del croton, *Phalacrocooccus howertoni*  
(Hemiptera: Coccidae)**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero Agrónomo en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Carlos Francisco Sánchez Barahona**

**Zamorano, Honduras**  
Noviembre, 2015

**Compatibilidad del hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* con la mariquita *Thalassa montezumae* para control de la escama verde del croton, *Phalacrocooccus howertoni* (Hemiptera: Coccidae)**

Presentado por:

Carlos Francisco Sánchez Barahona

Aprobado:

---

Rogelio Trabanino, M.Sc.  
Asesor principal

---

John J. Hincapié, Ph.D.  
Director  
Departamento de Ciencia y  
Producción Agropecuaria

---

Abelino Pitty, Ph.D.  
Asesor

---

Raúl Zelaya, Ph.D.  
Decano Académico

---

Ronald D. Cave, Ph.D.  
Asesor

---

Pasco B. Avery, Ph.D.  
Asesor

**Compatibilidad del hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* con la mariquita *Thalassa montezumae* para control de la escama verde del croton, *Phalacrocooccus howertoni* (Hemiptera: Coccidae)**

**Carlos Francisco Sánchez Barahona**

**Resumen** La escama verde del croton, *Phalacrocooccus howertoni* Hodges & Hodgson (Hemiptera: Coccidae), es una nueva escama blanda introducida a Florida, Estados Unidos. Este estudio evaluó la compatibilidad de la mariquita *Thalassa montezumae* (Mulsant) y el hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* Wize y su capacidad como agentes biocontroladores para disminuir la incidencia de la escama. El estudio fue desarrollado en el Indian River Research and Education Center de la Universidad de Florida, ubicado en Fort Pierce, Florida, Estados Unidos. El tiempo de sobrevivencia de las larvas y adultos de la mariquita después de ser expuestos a *I. fumosorosea* o agua (control) en el estudio de laboratorio fue evaluado usando cortes de tallos/hojas colocados en jaulas de tubos ventilados y colocados en una cámara de crecimiento a 25 °C bajo un fotoperiodo de 14 horas a 26 ± 2% HR por 21 días. El control de *I. fumosorosea* y larvas de *T. montezumae* contra la escama verde del croton fue probado sobre plantas de croton, *Codiaeum variegatum* L. Rumph bajo invernadero a 24.2 ± 0.2 °C y 91.3 ± 0.51% HR por 10 días. Se usó un análisis ANOVA con pruebas *t*-test y Tukey para el primer y segundo experimento respectivamente. Al aplicar *I. fumosorosea* sobre larvas y adultos de *T. montezumae* a una dosis de 10<sup>6</sup> esporas/mL de agua, el porcentaje de mortalidad para ambas etapas de vida no fue significativamente diferente al aplicar solamente con agua. El tiempo promedio de sobrevivencia para larvas de *T. montezumae* aplicados con *I. fumosorosea* fue mayor a 21 días y para adultos fue 21 días. En el estudio de invernadero, el tratamiento *I. fumosorosea* + *T. montezumae*, obtuvo la mortalidad más alta (89%) comparada a *I. fumosorosea* (61%) o *T. montezumae* (81%). En conclusión, la larva y adulto de *T. montezumae* no presentaron susceptibilidad de infección al ser aplicado con *I. fumosorosea* y el mayor control fue obtenido usando ambos agentes contra la escama verde del croton sobre plantas de croton bajo invernadero.

**Palabras clave:** Control biológico, depredador, Florida, insecto plaga.

**Abstract** The green croton scale *Phalacrocooccus howertoni* Hodges & Hodgson (Hemiptera: Coccidae), is a new soft scale introduced into Florida, United States. This study evaluated the compatibility of the lady beetle *Thalassa montezumae* (Mulsant) and *Isaria fumosorosea* Wize and their capacity as biological control agents to reduce the scale pest population. The study was conducted at the Indian River Research and Education Center, University of Florida, located in Fort Pierce, Florida, United States. The survival time of the beetle larvae and adults after exposure to *I. fumosorosea* or water (control) in the laboratory study was assessed using excised stems or leaves placed in ventilated tube cages and placed in a growth chamber at 25 °C under a 14 h photophase at 26 ± 2% RH for 21 days. The interaction of the entomopathogenic fungus *I. fumosorosea* and the coccinellid *T. montezumae* as biocontroller agents foraging on green croton scale, *Phalacrocooccus howertoni*. The compatibility of *I. fumosorosea* y *T. montezumae* study was conducted in laboratory at 25 °C under a 14 hours light and 10 hours dark photoperiod at 26 ± 2% RH. The compatibility of *I. fumosorosea* and *T. montezumae* larvae against the green croton

scale was also tested on croton plants, *Codiaeum variegatum* L. Rumph, under greenhouse conditions at  $24.2 \pm 0.2$  °C and  $91.3 \pm 0.51\%$  RH for 10 days. After exposure for either the beetle larvae or adult to *I. fumosorosea* at a dose of  $10^6$  blastospores/mL of water, the percent mortality for either treated life stage was not significantly different than those treated with water only, for either life stage reared in the tube cages. Also, the median survival time ( $ST_{50}$ ) time for *T. montezumae* larvae and adults sprayed with *I. fumosorosea* was > 21 and 21 days, and for the control it was > 21 and 19 days, respectively. In the greenhouse study, applying *I. fumosorosea* and releasing *T. montezumae* together obtained the highest scale mortality (89%) compared to either spraying *I. fumosorosea* only (61%) or releasing the beetle only (81%). In conclusion, *T. montezumae* beetle larvae or adults did not exhibit susceptibility to infection compared to the control when sprayed with *I. fumosorosea*, and greater control was obtained using both agents against the green croton scale on croton plants under greenhouse conditions.

**Key words:** Biological control, Florida, pest insect, predator.

## CONTENIDO

Portadilla .....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen .....	iii
Contenido .....	v
Índice de figuras .....	vi
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>4</b>
<b>3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>4 CONCLUSIONES .....</b>	<b>14</b>
<b>5 RECOMENDACIONES .....</b>	<b>15</b>
<b>6 LITERATURA CITADA.....</b>	<b>16</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Larva, pupa y adultos (macho y hembra) del coccinélido <i>Thalassa montezumae</i> (Mulsant). Florida, EEUU, 2015 .....	3
2. Método de infestación utilizado al sujetar hojas/tallos con escama verde a plantas sanas de croton. Florida, EEUU, 2015. ....	4
3. Esporas de <i>Isaria fumosorosea</i> (izquierda) en el producto PFR 97 <sup>®</sup> (derecha). Florida, EEUU, 2015. ....	5
4. Placa Clúster (12 celdas) (izquierda) utilizada para inmersión de una larva/adulto de <i>T. montezumae</i> por hoyo en 0.5 mL de suspensión fúngica/agua y tubo de polipropileno (derecha) utilizado como jaula para cada insecto. Florida, EEUU, 2015. ....	6
5. Porcentaje de mortalidad en larvas de <i>Thalassa montezumae</i> aplicadas con <i>Isaria fumosorosea</i> . Florida, EEUU, 2015. ....	9
6. Porcentaje de mortalidad en adultos de <i>Thalassa montezumae</i> aplicados con <i>Isaria fumosorosea</i> . Florida, EEUU, 2015. ....	10
7. Sobrevivencia de larvas y adultos de <i>Thalassa montezumae</i> expuestos a <i>Isaria fumosorosea</i> comparados al control (agua) por 21 días. * Tratamientos: Ifr= <i>Isaria fumosorosea</i> ; agua (control). Florida, EEUU, 2015. ....	10
8. Efecto del tratamiento <i>Isaria fumosorosea</i> sobre larvas (izquierda) y adultos (derecha) de <i>Thalassa montezumae</i> . Florida, EEUU, 2015. ....	11
9. Número medio de Unidades Formadoras de Colonias en platos con PDA-dodine obtenidas de la aplicación de <i>Isaria fumosorosea</i> sobre <i>Thalassa montezumae</i> (10 <sup>6</sup> esporas/mL). Las barras (media ± Error estándar) son significativamente diferentes ( <i>t</i> -test; <i>P</i> < 0.05). Florida, EEUU, 2015. ....	11
10. Unidades Formadoras de Colonias obtenidas de adultos de <i>Thalassa montezumae</i> caminando sobre medio de cultivo PDA-dodine que fueron aplicados con <i>Isaria fumosorosea</i> . Florida, EEUU, 2015. ....	12
11. Porcentaje de mortalidad de la escama verde del croton infestando sobre plantas de croton expuesta a cuatro tratamientos bajo invernadero por 10 días. Florida, EEUU, 2015. ....	13
12. Efecto del control biológico sobre el daño de la escama verde del croton <i>Phalacrocooccus howertoni</i> en plantas de croton después de ser expuestas a cuatro tratamientos en invernadero por 10 días. Florida, EEUU, 2015. ....	13

## 1. INTRODUCCIÓN

El control biológico es un método que emplea organismos vivos para reducir la densidad de la población de otros organismos plaga. Una plaga es cualquier organismo que produce un daño o reduce la disponibilidad y la calidad de un recurso humano (Hajek 2004). Una de estas plagas en cultivos ornamentales son las escamas blandas que pueden ocasionar un gran daño, especialmente cuando son especies invasivas (Hodges y Hodgson 2010). Las escamas causan pérdidas anuales de millones de dólares en daño en los cultivos (Kosztarab 1977, 1990; Kondo *et al.* 2008).

La introducción de una nueva escama está causando la descoloración de muchos árboles y la defoliación extraña de algunas especies de ornamentales y cítricos en el estado de Florida (Caldwell 2013). *Phalacrocooccus howertoni* Hodges & Hodgson (Hemiptera: Coccidae), la escama verde del croton, es una plaga colectada sobre plantas ornamentales en el estado de Florida, Estados Unidos (Hodges y Hodgson 2010). El daño causado por la escama verde del croton comienza cuando se alimenta de fluidos de la planta y excreta mielecilla que es susceptible a la colonización de hongos, reduciendo la tasa de fotosíntesis que provoca la pérdida de hojas y tallos en la planta, convirtiéndose en un problema para los productores de ornamentales en Florida (Hodges y Hodgson 2010).

El control químico de la escama verde del croton usualmente se hace aplicando insecticidas con ingrediente activo de dinotefuran (Safari™) o imidacloprid (Merit™). La aplicación de insecticidas sistémicos no se hace en plantas productoras de néctar debido a que puede afectar a insectos polinizadores como abejas y mariposas (Caldwell 2013). Este tipo de control ha resultado efectivo para los productores de ornamentales en Florida, pero se han encontrado situaciones en que los insecticidas no son efectivos para controlar la escama. Actualmente el control más efectivo se obtiene con la aplicación de aceites agrícolas sobre el follaje desde que comienza la aparición de los primeros estadios de la plaga; estos aceites evitan que las ninfas del primer estadio se establezcan en las plantas y comiencen a alimentarse. El control químico de esta plaga funciona, pero su aplicación incrementa los costos, el sobreuso puede conducir a la resistencia de insecticidas y contribuye a la contaminación ambiental (Weissling y Howard 1999).

Coccidae es la tercera familia más grande de escamas (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea) con aproximadamente 1200 especies descritas (Ben-Dov 1993). Hay aproximadamente 106 especies de escamas blandas conocidas que provienen de los Estados Unidos y 43 especies han sido encontradas en el estado de Florida (Ben-Dov *et al.* 2009). De 34 familias de plantas, existen aproximadamente 72 plantas conocidas como hospederos para esta plaga (Amarasekare y Mannion 2011; Ben-Dov *et al.* 2014; Hodges y Hodgson 2010; Williams 2010).



*Phalacroccoccus howertoni* ha sido encontrada en Florida desde 2008, es una plaga invasiva que ataca aproximadamente 83 especies de plantas, la alta infestación puede causar la pérdida de hojas y las plantas pequeñas pueden llegar a perderse. Esta especie fue descrita en 2010 basado en los especímenes colectados sobre plantas ornamentales de croton en el estado de Florida (Hodges y Hodgson 2010) y posteriormente fue registrada en Guatemala (Williams 2010) y Barbados (Anonymous 2011).

Actualmente hay muy pocas recomendaciones sobre control biológico para esta plaga (Francis *et al.* 2013). El parasitoide *Metaphycus flavus* (Howard) y el depredador *Laelilla coccidivora* Comstock han sido identificados como enemigos naturales para esta plaga (Etienne *et al.* 2014). El escarabajo depredador, *Thalassa montezumae* (Mulsant) (Coleoptera: Coccinellidae), ha sido identificado alimentándose sobre la escama verde del croton y es reportado específicamente sobre esta escama (Francis *et al.* 2014). El uso de *T. montezumae* podría ser una eficiente vía para lograr el control sostenible de la plaga (Caldwell 2013).

*Thalassa montezumae* (Mulsant) es un coccinélido recientemente establecido en Florida desde el suroeste de los Estados Unidos. El primer espécimen colectado en Florida fue encontrado sobre plantas infestadas con *P. howertoni* en agosto 2009. Desde el primer registro de la escama verde del croton en Florida transcurrió solo un año previo al primer registro de colección de *Thalassa montezumae*, es posible que ambos llegaron simultáneamente (Hodges 2008). Esta especie de coccinélido está presente además en Texas y Arizona.

El ciclo de vida de *T. montezumae* comprende cuatro etapas (huevo, larva, pupa y adulto). La fecundidad por vida es de  $165 \pm 15$  huevos por hembra y son ovipositados típicamente cerca o alrededor de las escamas. Los huevos eclosionan de 7-9 días después de haber sido puestos. El tiempo medio de desarrollo de los huevos a adultos de *T. montezumae* es de 24.7 y 26.5 días para hembras y machos respectivamente. Los cuatro estadios y la etapa de pupa en conjunto toman menos de tres semanas para completar su desarrollo (Francis *et al.* 2014).

La etapa de larva de *T. montezumae* tiene cuatro estadios de los cuales en el tercero aumenta el consumo de alimento (Thomas y Orland 2013). Es característico encontrar canibalismo entre larvas si no se encuentran con la cantidad de alimento necesario. El adulto de *T. montezumae* es de color azul metálico con una mancha amarilla o naranja en el medio de cada élitro que puede ser confundido con otros coccinélidos de Florida. La cabeza y margen anterior son amarillos en machos, oscuro en hembras. Las hembras adultas viven durante más tiempo ( $37.5 \pm 5$  días) que los machos adultos ( $29.8 \pm 3.7$  días). Los adultos y las etapas de larva (Figura 1) son capaces de alimentarse de todas las etapas de la escama verde del croton (Francis *et al.* 2014).



Figura 1. Larva, pupa y adultos (macho y hembra) del coccinélido *Thalassa montezumae* (Mulsant). Florida, EEUU, 2015

*Isaria fumosorosea* Wize pertenece a la clase Ascomyceto y la familia Cordycipitaceae. *Isaria fumosorosea* es un hongo microscópico que infecta y mata un amplio rango de hospederos en unas 25 familias de insectos y muchas especies de ácaros. Este hongo entomopatógeno ha sido usado para el control de plagas creciendo en diferentes plantas para la producción de flores, vegetales y en algunos ornamentales desarrollados en viveros y semilleros (Zhou *et al.* 2010). *Isaria fumosorosea* es conocido mundialmente como un insecticida microbiano debido a su capacidad de fuerte infección y amplio rango de hospederos (Smith 1993).

*Isaria fumosorosea*, al estar en contacto con el insecto, entra en competencia con la microflora cuticular, produciendo un tubo germinativo que atraviesa el integumento del insecto y se ramifica dentro de su cuerpo, secretando toxinas que provocan la muerte del hospedante. Sin embargo, se ha reportado que la exposición de algunos adultos de coleópteros a *I. fumosorosea* demostró la baja tasa de infección en los insectos (Klowden 2007; Montemayor 2010; Michalaki *et al.* 2007). Estos agentes entomopatógenos son económicamente accesibles, no tóxicos, pueden ser producidos a gran escala, de fácil aplicación y su presencia en el ambiente podría ser de control exitoso, reduciendo las poblaciones de plagas y manteniéndolos bajo el umbral económico establecido (Latifian y Rad 2012).

El propósito general de este estudio fue evaluar la compatibilidad del depredador *T. montezumae* y el bioplaguicida a base de *I. fumosorosea* contra la escama *P. howertoni* sobre plantas de croton. Específicamente se realizaron dos experimentos, en el primero se evaluó el tiempo promedio de sobrevivencia en la interacción entre la mariquita *T. montezumae* aplicada con *I. fumosorosea* y en el segundo se evaluó la capacidad individual y en conjunto de ambos agentes para control de la escama verde del croton *P. howertoni*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue desarrollado entre enero y abril del 2015 en el Laboratorio de Contención e Investigación de Control Biológico, en el Indian River Research & Education Center, ubicado en Fort Pierce, estado de Florida, Estados Unidos. Se usaron plantas de croton *Codiaeum variegatum* L. Rumph variedad Red Batick en macetas redondas (Classic 300s 16.51 × 16.83 cm) que contenían medio de sustrato Fafard® y se aplicaron con fertilizante granular (Osmocote®). Las plantas fueron mantenidas dentro de una casa malla bajo condiciones ambientales de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### **Infestación de plantas sanas.**

Se usó una colonia de *Phalacrocooccus howertoni* que fue criada sobre plantas de croton en macetas bajo condiciones ambientales no controladas ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). El método de infestación de plantas sanas consistió en colocar recortes de tallos de croton con escamas adultas y/o ninfas al tallo principal de la planta sana (Figura 2). El periodo de infestación duró de 6-8 semanas para alcanzar un alto nivel de infestación. Las plantas fueron regadas diariamente.



Figura 2. Método de infestación utilizado al sujetar hojas/tallos con escama verde a plantas sanas de croton. Florida, EEUU, 2015.

### **Colonia de *Thalassa montezumae*.**

*Thalassa montezumae* fue criada sobre plantas de croton infestadas con escama verde del croton como fuente de alimento, bajo condiciones ambientales controladas ( $23.3 \pm 0.2^\circ\text{C}$  at  $50 \pm 5\%$  HR). De la cría se seleccionaron adultos de 5-10 días de edad y larvas en tercer estadio para ser usadas en el experimento.

**Suspensión fúngica.** Se preparó la suspensión de esporas de *I. fumosorosea* (*Ifr*) en un beaker y reposó por 30 minutos hasta que el exceso de producto comercial se precipitó en el fondo del beaker. La parte líquida de la suspensión contenía las esporas que son el ingrediente activo de la formulación comercial PFR97® (Figura 3) obtenida de Certis, USAS en Columbia, Maryland. Después de preparar la suspensión, esta se colocó en botes asperjadores para ser aplicada sobre las escamas. Se preparó una suspensión con 0.1 g de formulación comercial de PFR97® en 100 mL de agua destilada estéril. Se hizo el conteo de esporas y se comprobó 100% de viabilidad para la suspensión.



Figura 3. Esporas de *Isaria fumosorosea* (izquierda) en el producto PFR 97® (derecha). Florida, EEUU, 2015.

El estudio tuvo dos fases, una de laboratorio donde se evaluó la compatibilidad de *T. montezumae* e *I. fumosorosea*, y con los resultados obtenidos en laboratorio se evaluó en invernadero el control de ambos enemigos naturales sobre la escama verde del croton.

### **Ensayo 1 – Compatibilidad del coccinélido *Thalassa montezumae* y el hongo *Isaria fumosorosea***

**Tratamientos.** Se evaluó la compatibilidad *I. fumosorosea* sobre larvas y adultos de *T. montezumae* mediante dos tratamientos: (1) larvas aplicadas con *I. fumosorosea* y (2) adultos aplicados con *I. fumosorosea*. Se incluyó un testigo aplicado con agua por tratamiento (control), evaluando ocho repeticiones por tratamiento en tres ensayos con un total de 96 repeticiones.

**Metodología.** Para evaluar la compatibilidad de *I. fumosorosea* y *T. montezumae* se preparó una suspensión fúngica ( $10^6$  esporas/mL), colocando 100  $\mu$ L de la suspensión en cada celda de una placa clúster Corning Costar® para cultivo (Figura 4) y luego la placa fue agitada manualmente para cubrir el fondo de cada celda con la suspensión fúngica. Se utilizó la técnica de inmersión del insecto descrita por Carrillo *et al.* (2014) que consistió en sumergir una larva/adulto de *T. montezumae* dentro de cada celda de la placa clúster con la suspensión fúngica y luego se sacó el insecto para ser secado sobre papel filtro durante 10 segundos. Los insectos utilizados como testigos (control) se aplicaron con agua destilada.

Cada larva/adulto de *T. montezumae* aplicado con la suspensión fúngica o agua posteriormente fue colocado individualmente en tubos de polipropileno modificados según Ammar *et al.* (2013) para mantenerlos durante la evaluación del experimento (Figura 4). Los tubos de polipropileno que contenían una hoja/tallo con *P. howertoni* fueron colocados dentro de una cámara crecimiento a 25 °C bajo un fotoperiodo de 14 horas luz : 10 horas oscuridad y a 26 ± 2% de humedad relativa (HR) durante 21 días. Los insectos fueron alimentados semanalmente con miel diluida (una gota de miel mezclada con dos gotas de agua destilada) aplicada con un pincel sobre el tallo/hoja que contenía cada tubo.

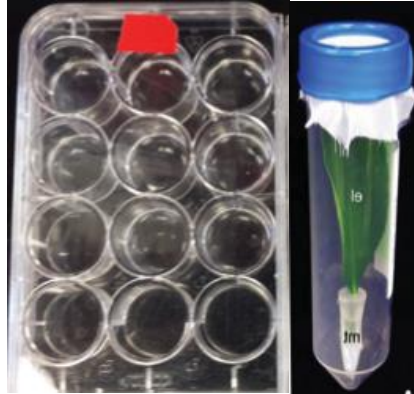


Figura 4. Placa Clúster (12 celdas) (izquierda) utilizada para inmersión de una larva/adulto de *T. montezumae* por hoyo en 0.5 mL de suspensión fúngica/agua y tubo de polipropileno (derecha) utilizado como jaula para cada insecto. Florida, EEUU, 2015.

**Evaluaciones.** Para evaluar la compatibilidad del hongo entomopatógeno *I. fumosorosea* y la mariquita *T. montezumae* se midió el porcentaje de mariquitas muertas, porcentaje de mariquitas muertas parasitadas por el hongo entomopatógeno y la adquisición y dispersión de esporas de *I. fumosorosea* aplicadas sobre *T. montezumae*. El ensayo constó con ocho repeticiones por tratamiento en tres ensayos con una duración de 21 días para determinar los días de sobrevivencia de la mariquita.

**Porcentaje de mariquitas muertas.** El porcentaje de mortalidad se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Mortalidad} = (\text{MM}/\text{MV}) \times 100$$

Donde:

**MM**=Número de mariquitas muertas

**MV**=Número de mariquitas vivas al inicio del experimento

**Evaluación de las causas de mortalidad de las mariquitas.** Una vez muertas las mariquitas fueron evaluadas para determinar si la causa de muerte fue ocasionada por el hongo entomopatógeno o no, para lo cual se procedió a esterilizar cada mariquita muerta utilizando el proceso descrito por Lacey (1997). La técnica consiste en esterilizar la superficie del insecto muerto al introducirlo sucesivamente en etanol al 65-70% durante 5-

10 segundos, enjuagado brevemente en tres cambios de agua destilada y luego se dejó secar sobre papel filtro esterilizado.

**Adquisición y dispersión de esporas de *I. fumosorosea* aplicadas sobre *T. montezumae*.** Cuatro larvas y adultos del segundo estadio de *T. montezumae* fueron sumergidos con *I. fumosorosea* según la técnica de inmersión descrita anteriormente (Carrillo *et al.* 2014). Después de la infección con el hongo, cada mariquita (larva/adulto) fue sumergido en 15 mL del adherente Triton X-100 al 0.1% contenido en un tubo de centrifuga y agitado por 15 segundos. Se cultivaron 100- $\mu$ L de la solución obtenida en platos Petri con medio PDA y fungicida dodine, sellado con Parafilm e incubado bajo las mismas condiciones descritas para el experimento de mortalidad.

Al determinar la dispersión de *I. fumosorosea* por *T. montezumae* se siguió el protocolo de infección con *I. fumosorosea* descrito. Para esta prueba las mariquitas no fueron agitadas, pero fueron colocadas durante 2-3 segundos sobre papel filtro antes de ser colocadas en agar. Se colocaron las mariquitas en los platos Petri con tapas, pero no se sellaron y fueron transferidas a la cámara incubadora bajo 25 °C bajo un fotoperiodo de 14 horas luz : 10 horas oscuridad y a 26  $\pm$  2% de humedad relativa. Los insectos fueron incubados por 24 horas, después se retiraron y los medios de cultivo infestados se sellaron con Parafilm e incubaron hasta el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

## **Ensayo 2 – Efectividad de *Isaria fumosorosea* y *Thalassa montezumae* como controladores biológicos sobre la escama verde del croton.**

**Tratamientos.** Se evaluó la efectividad de *I. fumosorosea* y *T. montezumae* como agentes biocontroladores individualmente y combinados sobre la escama verde del croton *Phalacroccoccus howertoni* usando tres tratamientos: (1) *T. montezumae* (T) solo, (2) *I. fumosorosea* (Ifr), (3) la combinación de *T. montezumae* más *I. fumosorosea* (T+Ifr).

**Metodología.** Las evaluaciones se realizaron en invernadero usando cinco plantas de croton infestadas con *P. howertoni* por tratamiento. Los tratamientos con *I. fumosorosea* fueron asperjados con 20 mL de suspensión fúngica (suspensión de 10<sup>6</sup> esporas/mL) por planta y 20 mL de agua para el tratamiento control (testigo). Las plantas se asperjaron de arriba hacia abajo cubriendo totalmente la planta y posteriormente se dejaron secar. Luego se introdujo una planta por cada jaula de tela y para los tratamientos con *T. montezumae* se colocaron dos larvas de *T. montezumae* por planta. El ensayo duró 10 días, regando diariamente con 200 mL de agua al suelo de cada planta y evaluando la mortalidad de *P. howertoni* al día 10. El ensayo se repitió en tres ocasiones.

**Evaluaciones.** Al día 10, se evaluó el número total de escamas muertas y escamas infestadas con *I. fumosorosea*. Las características evaluadas fueron: (1) Parasitismo del hongo sobre la escama, (2) signos de daño por alimentación de la mariquita sobre la escama y (3) escamas muertas por causas desconocidas (edad).

El parasitismo del hongo sobre la escama se evaluó tomando una muestra de una rama infestada con *P. howertoni* que se colocó dentro de una bolsa plástica sellada y con papel húmedo para mantener la humedad dentro de la bolsa. La rama se dejó por siete días y luego se verificó la infección de *I. fumosorosea* sobre *P. howertoni*. El porcentaje de infección

del hongo *I. fumosorosea* fue determinado utilizando la siguiente formula según Avery *et al.* 2008:

$$\% \text{Infección} = (\text{Escamas infectadas por } I. \text{fumosorosea} / \text{Total escamas expuestas}) \times 100$$

### **Diseño experimental y análisis estadístico.**

En el ensayo de compatibilidad del coccinélido y el hongo entomopatógeno se usó un arreglo con dos estadios (larva y adulto), comparando las medias de sobrevivencia con el ANOVA ( $P < 0.05$ ). La prueba de *t*-test ( $P < 0.05$ ) fue usada para evaluar la significancia entre medias de Unidades Formadoras de Colonias en la adquisición y dispersión de esporas de *I. fumosorosea* y luego transformadas a la raíz cuadrada ( $n + 0.01$ ). Para determinar la efectividad de los controladores biológicos sobre la escama, se usó un análisis de GLM por el ANOVA y separación de medias por la prueba Tukey ( $P < 0.05$ ) después de ser transformados a arcoseno de la raíz cuadrada ( $n + 0.01$ ). La prueba *t*-test fue procesada usando el programa PROC TTEST. Todos los análisis estadísticos fueron procesados usando el programa “Statistical Analysis System” SAS 9.3

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Compatibilidad del hongo *Isaria fumosorosea* en conjunto con *Thalassa montezumae*.

*T. montezumae* presentó compatibilidad con *I. fumosorosea* en los tres experimentos al no demostrar evidencias de infección por *I. fumosorosea*. La tendencia de mortalidad de las larvas de *T. montezumae* aumentó progresivamente en el tratamiento con *I. fumosorosea*, pero no fue diferente a la mortalidad en el control. Al final de la evaluación de los 21 días, 46% de las larvas aplicadas con hongo murió mientras que el control presentó 42% de mortalidad (Figura 5).

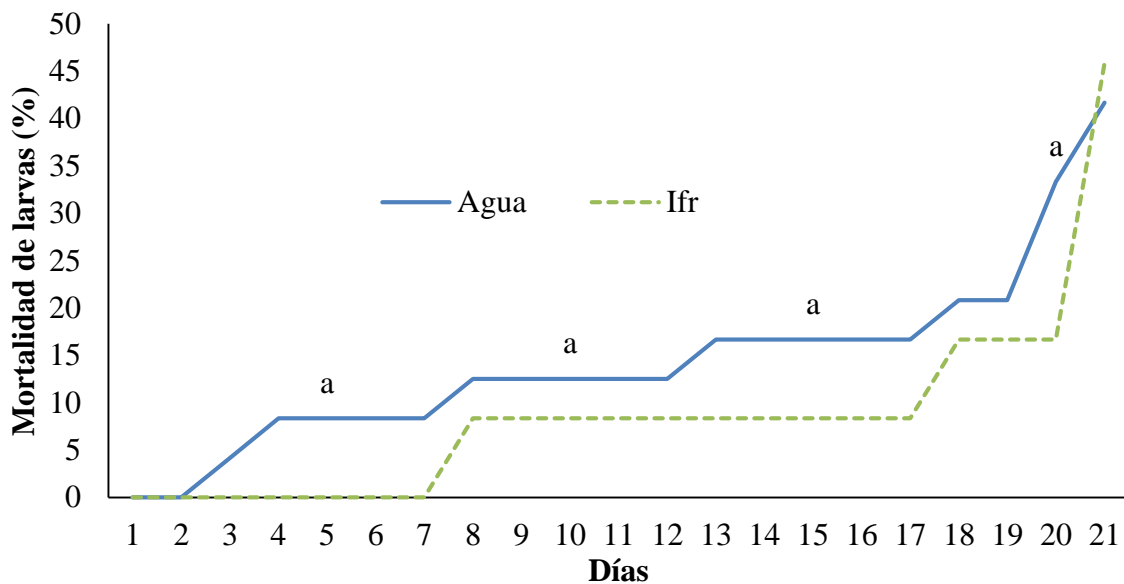


Figura 5. Porcentaje de mortalidad en larvas de *Thalassa montezumae* aplicadas con *Isaria fumosorosea*. Florida, EEUU, 2015.

La mortalidad de adultos de *T. montezumae* tratados con *I. fumosorosea* aumentó progresivamente, pero no mostró diferencia significativa a la mortalidad presentada en el control (Figura 6). Al final de 21 días se determinó que el 50% de los adultos de *T. montezumae* aplicados con hongo murieron de causas naturales al igual que los adultos de *T. montezumae* que fueron aplicados con agua (58%). Al ser evaluados, no se encontró *I. fumosorosea* (Figura 8).



Las larvas/adultos de *T. montezumae* muertos durante los experimentos de *T. montezumae* aplicados con *I. fumosorosea* fueron esterilizados superficialmente, puestos en incubación (a 24 °C durante 10-15 días) (Figura 8). Por lo tanto, la mortalidad de los insectos no fue ocasionada por el hongo.

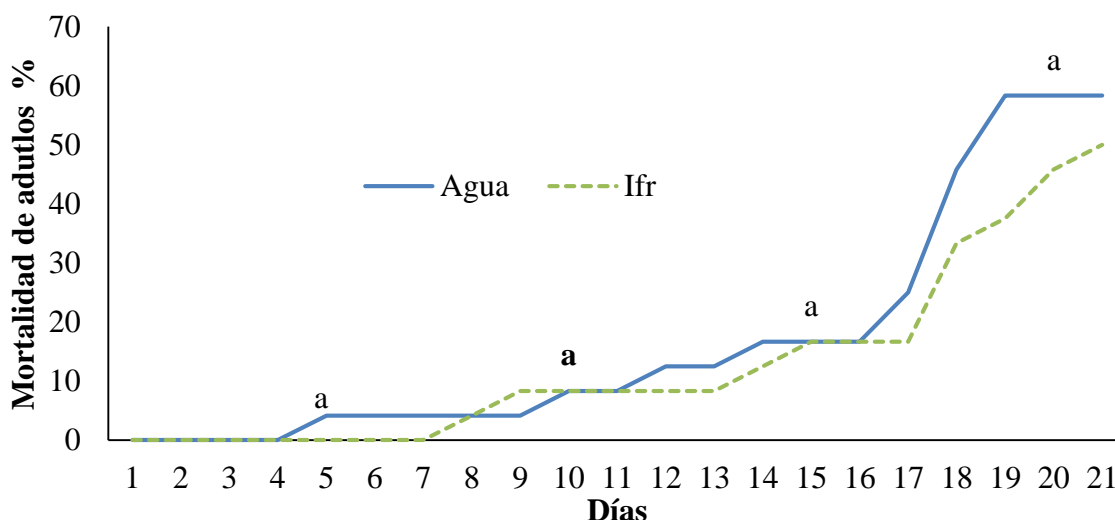


Figura 6. Porcentaje de mortalidad en adultos de *Thalassa montezumae* aplicados con *Isaria fumosorosea*. Florida, EEUU, 2015.

**Determinación del tiempo de sobrevivencia.** No se presentó diferencia significativa en tiempo de sobrevivencia por 21 días entre larvas y adultos de *T. montezumae* aplicados con *I. fumosorosea* en comparación a los aplicados con agua (control) (Figura 7). El tiempo de sobrevivencia en días para larvas de *T. montezumae* aplicadas con *I. fumosorosea* fue de  $19.7 \pm 0.8$  y para el control fue de  $18.5 \pm 1.1$ , mientras que para adultos fue de  $18.8 \pm 0.8$  comparado a  $18.0 \pm 0.8$ , respectivamente.

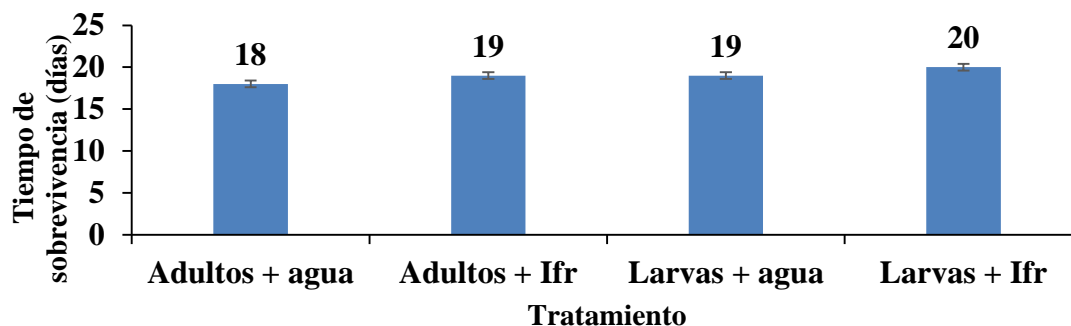


Figura 7. Sobrevivencia de larvas y adultos de *Thalassa montezumae* expuestos a *Isaria fumosorosea* comparados al control (agua) por 21 días. \* Tratamientos: Ifr= *Isaria fumosorosea*; agua (control). Florida, EEUU, 2015.

Del total de *T. montezumae* muertos durante el experimento, al ser colocado cada uno en cámaras húmedas ninguno presentó infección de *I. fumosorosea* al hacer la esterilización de la superficie e incubadas por 7 días (Figura 8).



Figura 8. Efecto del tratamiento *Isaria fumosorosea* sobre larvas (izquierda) y adultos (derecha) de *Thalassa montezumae*. Florida, EEUU, 2015.

**Adquisición y dispersión de esporas de *Isaria fumosorosea* aplicadas sobre *Thalassa montezumae*.** Un número significativamente mayor de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) resultó sobre los adultos de *T. montezumae* aplicados con *I. fumosorosea* comparado a las larvas aplicadas (Figura 9). No se encontraron UFC en los platos del control.

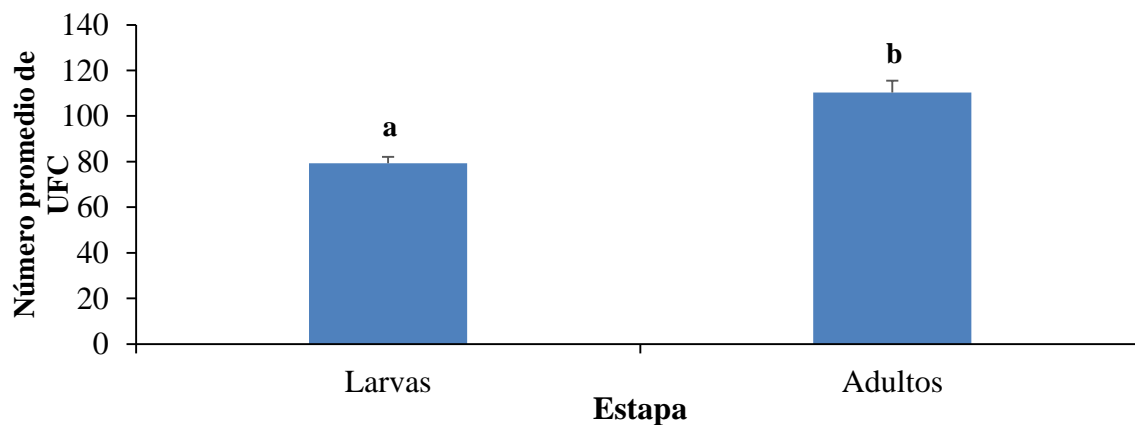


Figura 9. Número medio de Unidades Formadoras de Colonias en platos con PDA-dodine obtenidas de la aplicación de *Isaria fumosorosea* sobre *Thalassa montezumae* ( $10^6$  esporas/mL). Las barras (media  $\pm$  Error estándar) son significativamente diferentes (*t*-test;  $P < 0.05$ ). Florida, EEUU, 2015.



Figura 10. Unidades Formadoras de Colonias obtenidas de adultos de *Thalassa montezumae* caminando sobre medio de cultivo PDA-dodine que fueron aplicados con *Isaria fumosorosea*. Florida, EEUU, 2015.

Los puntos rosados de UFC en el medio de cultivo indican que en el desplazamiento de *T. montezumae* las esporas adheridas al insecto se dispersan y caen a la superficie de agar. Los platos del exterior muestran otros hongos y bacterias contaminantes que hospedaban previamente sobre el insecto antes de ser contaminado con *Isaria fumosorosea*.

**Uso de la mariquita *Thalassa montezumae* y el hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* contra infestaciones de la escama verde del croton.**

Los índices de control de la escama verde del croton en los tres tratamientos con agentes biocontroladores fueron significativamente más altos ( $P < 0.05$ ) que en el tratamiento control. Se obtuvieron índices de control de *P. howertoni* de 61, 81 y 89% para los tratamientos *I. fumosorosea*, *T. montezumae* y *T. montezumae* + *I. fumosorosea* respectivamente (Figura 11). El tratamiento que presentó mayor mortalidad de *P. howertoni* fue la combinación de *T. montezumae* más la aplicación de *I. fumosorosea*. Se presentó diferencia entre el tratamiento *I. fumosorosea* comparado a *T. montezumae* + *I. fumosorosea*, pero estos no son diferentes a *T. montezumae*. El tratamiento control se mantuvo con una mortalidad por debajo del 20% ya que solo fueron aplicados con agua.

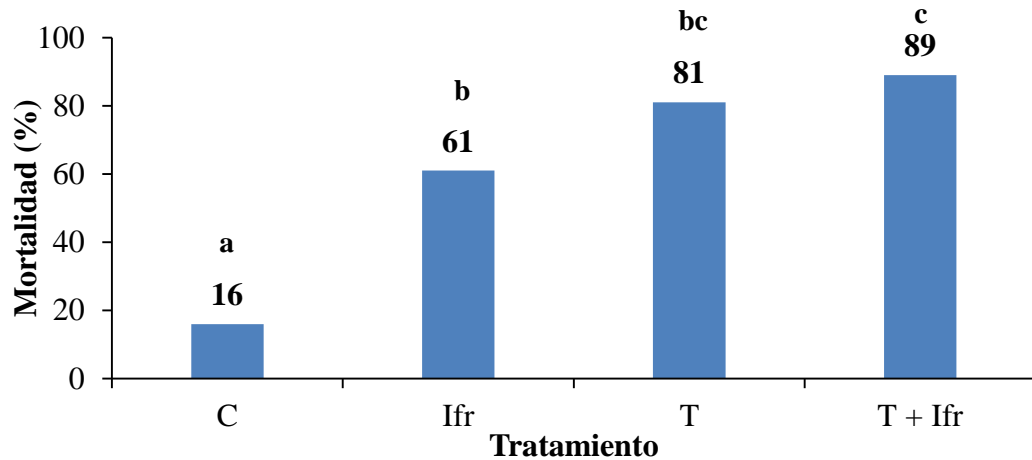


Figura 11. Porcentaje de mortalidad de la escama verde del croton infestando sobre plantas de croton expuesta a cuatro tratamientos bajo invernadero por 10 días. \*Tratamientos: C = control (solo agua aplicada); Ifr = *Isaria fumosorosea*; T = agua aplicada primero y luego colocadas dos larvas de *Thalassa montezumae* por planta; Ifr + T = combinación de la aplicación de *I. fumosorosea* más dos larvas de *T. montezumae* por planta. Tratamientos con igual letra no difieren entre sí ( $P < 0.05$ ). Florida, EEUU, 2015.

La diferencia en crecimiento de las plantas de croton no expuestas a tratamiento es visualmente clara. La defoliación y reducción de tamaño es menor en plantas de croton expuestas a los tratamientos (Figura 12).



Figura 12. Efecto del control biológico sobre el daño de la escama verde del croton *Phalacroccoccus howertoni* en plantas de croton después de ser expuestas a cuatro tratamientos en invernadero por 10 días. Florida, EEUU, 2015.

\*Tratamientos: 1 = control (testigo aplicado con agua); 2 = *Isaria fumosorosea*; 3 = agua aplicada primero y luego dos larvas de *T. montezumae* colocadas por planta; 4 = combinación de *I. fumosorosea* aplicada primero y luego dos larvas de *T. montezumae* colocadas por planta.

#### 4. CONCLUSIONES

- *Isaria fumosorosea* no causa patogenicidad sobre larvas ni adultos de *Thalassa montezumae*.
- El control biológico de la escama verde del croton puede ser efectivo utilizando *T. montezumae* + *I. fumosorosea*, los que muestran altas tasas de mortalidad y posiblemente disminuyendo la necesidad de utilizar control químico.
- *Isaria fumosorosea* causa significativamente menor tasa de mortalidad que *I. fumosorosea* + *T. montezumae*.

## 5. RECOMENDACIONES

- Replicar el estudio de eficiencia de los agentes de control biológico de la escama verde del croton con una duración mayor a los 10 días.
- Hacer muestreos de la escama verde del croton en plantaciones de cítricos y Euphorbiaceae para realizar liberaciones de *Thalassa montezumae*.
- Evaluar el control del hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* sobre *Phalacroccoccus howertoni* hasta el día 15-20.
- Evaluar la susceptibilidad de la escama verde del croton expuesta a otros hongos entomopatógenos utilizados en el control biológico.

## 6. LITERATURA CITADA

Amarasekare, K.G., y C.M. Mannion. 2011. Life history of an exotic soft scale insect *Phalacrocooccus howertoni* (Hemiptera: Coccidae) found in Florida. *Florida Entomologist* 94(3): 588-593.

Ammar, E.D, A.J Walter, y D.G. Hall. 2013. New excised-leaf assay method to test inoculativity of asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) with *Candidatus liberibacter asiaticus* associated with citrus huanglongbing disease. *Journal of Economic Entomology*, 106(1): 25-35.

Anonymous. 2011. Another new insect pest discovered in Barbados. BGIS Barbados, 23 August 2011, 1 p.

Avery, P.B., J. Faull, M.S.J. Simmonds. 2008. Effects of *Paecilomyces fumosoroseus* and *Encarsia formosa* on the control of the greenhouse whitefly: preliminary assessment of a compatibility study. *BioControl*. 53: 303-316.

Ben-Dov, Y. 1993. A systematic catalogue of the soft scale insects of the world. *Flora and Fauna Handbook*. Gainesville : Sandhill Crane Press 9: 536.

Ben-Dov, Y., D.R. Miller, y G.A.P Gibson. 2009. A Database of the Scale Insects of the World, In United States Department of Agriculture (USDA). (En línea). Disponible en <http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm>.

Ben-Dov, Y., D.R. Miller, y G.A.P Gibson. 2014. ScaleNet: a database of the scale insects of the world. (En línea). Disponible en: <http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm>

Caldwell, D. 2013. Croton Scale in South Florida *Phalacrocooccus howertoni*. *Naples Daily News*, Collier, Florida, Estados Unidos, octubre, 11: 2.

Carrillo, D., R.E. Duncan, J.N. Ploetz, A.F. Campbell, R.C. Ploetz, y J.E. Peña. 2014. Lateral transfer of a phytopathogenic symbiont among native and exotic ambrosia beetles. *Plant Pathology* 63: 54-62.

Etienne, J., D. Matile-Ferrero y T. Kondo. 2014. *Phalacrocooccus howertoni* Hodges & Hodgson (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae), nuevo registro de una escama blanda para la isla de Guadeloupe. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1): 115-118. (En línea). Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-87062014000100010&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-87062014000100010&lng=en&tlng=es).

Francis N., C. Mannion, y L. Kanga. 2014. Developing a potential biological control measure for a new exotic soft scale insect on croton. En Frank Zalom (Presidencia), Entomological Society of America Annual Meeting 2014. Portland, OR, USA.

Hajek, A. E. 2004. Natural Enemies. An introduction to biological control. Cambridge University Press, New York. p. 4.

Hodges, G.S. y C.J. Hodgson. 2010. *Phalacrocooccus howertoni*, a New Genus and Species of Soft Scale (Hemiptera: Coccidae) from Florida. Florida Entomologist. 93(1): 8-23.

Hodges, G.S. 2008. Pest Alert: A new soft scale insect on croton in South Florida (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae). (En línea). Disponible en <http://www.freshfromflorida.com/Divisions-Offices/Plant-Industry/Plant-Industry-Publications/Pest-Alerts/Pest-Alert-Soft-Scale-Insect-on-Croton>

Klowden, M.J. 2007. Physiological Systems in Insects. Integumentary Systems. Academic Press Elsevier, Moscow, Idaho.

Kondo, T., P.J. Gullan, D.J. Williams. 2008. Coccidology. The study of scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea). Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 9: 55–61

Kosztarab, M. 1977. The current state of coccoid systematics. Virginia Polytechnic Institute and State University, Research Bulletin. 127: 1–4

Kosztarab, M. 1990. Economic Importance. In: Rosen D. (Ed) Armored Scale Insects Their Biology, Natural Enemies and Control. Volume B. Elsevier, Amsterdam, 307–311

Lacey, L.A. 1997. Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, New York, p. 189.

Latifian, M. y B. Rad. 2012. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillmin, *Beauveria brongniartii* Saccardo and *Metarhizium anisopliae* Metsch to adult *Oryctes elegans* Prell and effects on feeding and fecundity. International Journal of Agriculture and Crop Sciences. 4(14): 1026-1032.

Michalaki, M.P., C.G. Athanassiou, T. Steenberg y C.T. Buchelos. 2007. Effect of *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith (Ascomycota: Hypocreales) alone or in combination with diatomaceous earth against *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), BioControl. 40: 280–286.

Montemayor, C. 2010. Evaluation of a predator and a fungus as biological control agents of the Yellow margined leaf beetle, *Microtheca ochroloma* Stål (Coleoptera: Chisomelidae). Thesis M. Sc. University of Florida, Gainesville, United States. p 71.



Smith, P. 1993. Control of *Bemisia tabaci* and the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* as a biopesticide. *Bicontrol News & Inform.* 14: 71-78.

Thomas M, y J. Orland. 2013. Ladybird beetles - recent immigrants to Florida (Insecta: Coleoptera: Coccinellidae). Electronic Data Information Source (EDIS). Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN101200.pdf>

Weissling, T.J. y F.W. Howard. 1999. Escama de las cicadas *Aulacaspis yasumatsui* Takagi (En línea). Disponible en: [http://creatures.ifas.ufl.edu/orn/palms/cycad\\_scale.htm](http://creatures.ifas.ufl.edu/orn/palms/cycad_scale.htm).

Williams, M.L. 2010. Annotated list of the scale insects of Guatemala. *Entomología Hellenica* 19(2):144-152.

Zhou, F., S. Ali y Z. Huang. 2010. Influence of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* on *Axinoscymnus cardilobus* (Coleoptera: Coccinellidae) under laboratory conditions. *Biocontrol Science and Technology.* 20(7): 709-722.