



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA**

400282



61060

**PATOGENICIDAD DE *Verticillium lecanii* (Zimm) Viégas  
CONTRA TRES ESPECIES DE AFIDOS  
(HOMOPTERA:APHIDIDAE)  
DE  
IMPORTANCIA AGRICOLA**

B01145/95  
Ej. 3

**T E S I S**

**PRESENTADA POR**

**Claudia Ledezma González**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**B I O L O G O**



1995

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*"Tened en mente que las cosas maravillosas que se aprenden en las escuelas son el trabajo de muchas generaciones, producidas por un esfuerzo entusiasta y labor infinita de todos los países del orbe.*

*Todo esto se pone en vuestras manos como herencia para que recibáis, aumentéis y, un día con toda vuestra fe, la traspaseis a vuestra descendencia. Esta es la forma en que nosotros los mortales logramos la inmortalidad en las cosas permanentes que creamos en común".*

*Albert Einstein.*

## AGRADECIMIENTOS

A la ENEPI, principalmente a los profesores que supieron despertar en mí, el amor a la Biología.

A la Dra. Raquel Alatorre Rosas por su asesoría, conocimientos y apoyo.

A Joel Lara Reyna, por compartir sus experiencias, conocimientos, incluso sus bromas; mi sincero agradecimiento.

Al M.C Guadalupe Vejar C. y M.C Néstor Bautista M.; por la ayuda brindada en la preparación e identificación de los áfidos.

A Don Angel, Don Joel y Don Timo del invernadero, por las facilidades prestadas para mi trabajo, ¡ muchas gracias¡.

A mis compañeros del Laboratorio de Patología de Insectos: Natalia, Ariel, Tere, Rebollar, Samuel, Baeza, Alvaro, Ana Lilia, Leobardo, Margarito, José Luis, Gerardo, Betty y William. Con los que compartí momentos agradables y de compañerismo en las horas de trabajo.

A mis compañeros de la generación 88-91; especialmente a Juanita Morales, Charo, Lulú Flores, Paty Cortes, Martha García, Claudia H., Lucero, Lucía, Daniel, Sergio, Hugo y Angel. Por su amistad y los momentos agradables que compartimos en la carrera.

A mis amigos de toda la vida: José Luis Contador y Paulino Matus Castillo. Pese al tiempo y la distancia nuestra amistad no se ha diluido, sino que se ha fortalecido mucho más. ¡ Gracias por su amistad¡.

A todas aquellas personas que de una manera u otra me brindaron su ayuda en algún momento.

## DEDICATORIA

Al dador de vida, ya que sin él nada en el Universo sería posible.

A la memoria de mi abuelita Adela González, con cariño.

Al pilar de mi vida, a mi madre, Ofelia González R., por su amor, su fortaleza y su apoyo en todo lo que emprendo, pese a todo y a todos. ¡Gracias!, ¡Te quiero mucho!.

A mi "mamá Adela", Adela González R. por quererme siempre y por las diversas manifestaciones de cariño, a lo largo de mi vida.

# CONTENIDO

	Pag.
INDICE DE FIGURAS .....	VII
INDICE DE CUADROS .....	VIII
RESUMEN .....	X
1. INTRODUCCION .....	1
2. OBJETIVO Y JUSTIFICACION.....	3
2.1 Objetivos .....	3
2.2 Justificación .....	3
3. ANTECEDENTES.....	4
3.1 Importancia de la Familia Aphididae .....	4
3.1.1 Vectores .....	4
3.2 Anatomía y Biología de los Afidos.....	5
3.2.1 Biología .....	5
3.2.1.1 <i>Myzus persicae</i> (Sulzer) .....	5
3.2.1.2 <i>Diuraphis noxia</i> (Mordviko).....	6
3.2.1.3 <i>Brevicoryne brassicae</i> (Linneo).....	7
3.3 Manejo de Hongos Entomopatógenos en el Control de Afidos.....	11
3.4 El Hongo Entomopatógeno <i>Verticillium lecanii</i> (Zimmerman) Viégas.....	13
3.4.1 Antecedentes Históricos.....	13
3.4.2 Clasificación Taxonómica y Sinonimia.....	13
3.4.3 Descripción del Hongo.....	14
3.4.4 Hospederos.....	14
3.4.5 Seguridad al Hombre y a Otros Animales.....	16
3.4.6 Incidencia Natural.....	16

3.4.7 Sintomatología.....	17
3.4.8 Patogénesis.....	17
3.4.9 Producción de Tóxicas.....	17
3.4.10 Cultivo en Laboratorio.....	19
3.4.11 Efecto de la Temperatura y la humedad.....	19
3.4.12 Compatibilidad con Plagidas.....	19
4. MATERIALES Y METODOS.....	21
4.1 Cría de Pulgones.....	21
4.1.1 <i>Myzus persicae</i> (Sulzer).....	21
4.1.2 <i>Diuraphis noxia</i> (Mordviko).....	22
4.1.3 <i>Brevicoryne brassicae</i> (Linneo).....	22
4.2 Producción de Esporas y Cosecha.....	22
4.2.1 Determinación de la Concentración de Esporas en Sabouraud.....	23
4.3 Pruebas de Patogenicidad.....	23
4.3.1 Selección del Método de Aplicación.....	23
4.4 Bioensayo.....	24
4.4.1 Bioensayos con <i>Verticillium lecanii</i> .....	25
4.4.1.1 Pruebas de Invernadero.....	25
4.5 Análisis Estadístico.....	26
5. RESULTADOS Y DISCUSION.....	27
5.1 Selección del Método de Aplicación de <i>Verticillium lecanii</i> .....	27
5.2 Susceptibilidad de los Afidos a <i>Verticillium lecanii</i> .....	29
5.2.1 Concentración Letal Media ( $CL_{50}$ ).....	29
5.2.2 Tiempo Letal.....	35
5.2.3 Medio de Propagación de <i>V. lecanii</i> .....	40
5.3 Pruebas de Invernadero.....	41
6. CONCLUSIONES.....	43

7. BIBLIOGRAFIA.....	44
8. APENDICE.....	53

## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Esquema de <i>Myzus persicae</i> (Sulzer).....	8
Figura 2 Esquema de <i>Diuraphis noxia</i> (Mordviko).....	9
Figura 3 Esquema de <i>Brevicoryne brassicae</i> (Linneo).....	10
Figura 4 <i>Verticillium lecanii</i> (Zimm) Viégas.....	15
Figura 5 Representación esquemática del proceso de infección de <i>Verticillium lecanii</i> y las barreras cuticulares .en una sección de la cutícula del insecto.....	18
Figura 6 Comparación de Tres Métodos de Aplicación del Insecticida Biológico <i>Verticillium lecanii</i> en <i>Myzus persicae</i> .....	28
Figura 7 Línea de Respuesta Concentración-Mortalidad de <i>Diuraphis noxia</i> tratada con <i>Verticillium lecanii</i> Propagado en SDA y Arroz.....	30
Figura 8 Líneas de Respuesta Concentración-Mortalidad de <i>Brevicoryne brassicae</i> tratada con <i>Verticillium lecanii</i> propagadas en SDA y Arroz.....	33
Figura 9 Línea de Respuesta Concentración -Mortalidad de <i>Myzus persicae</i> tratadas con <i>Verticillium lecanii</i> propagadas en SDA y Arroz.....	34
Figura 10 Comparación de Tiempos Letales de Tres Especies de Afidos Tratados con <i>Verticillium lecanii</i> Propagados en SDA y Arroz.....	39

## INDICE DE CUADROS

		Pág
Cuadro 1	Especies Hospederas del Hongo <i>Verticillium lecanii</i> (Zimm) Viégas.....	12
Cuadro 2	Valores obtenidos mediante el Análisis Probit para <i>Diuraphis noxia</i> tratada con <i>Verticillium lecanii</i> propagado en placas de SDA.....	29
Cuadro 3	Valores obtenidos mediante el Análisis Probit para <i>Diuraphis noxia</i> tratada con <i>Verticillium lecanii</i> propagada en Substrato Sólido (Arroz).....	31
Cuadro 4	Valores obtenidos mediante el Análisis Probit para <i>Brevicoryne brassicae</i> Tratado con <i>Verticillium lecanii</i> propagado en SDA.....	31
Cuadro 5	Valores obtenidos mediante el Análisis Probit para <i>B. brassicae</i> Tratado con <i>V. lecanii</i> propagado en Arroz.....	32
Cuadro 6	Valores obtenidos mediante el Análisis Probit para <i>Myzus persicae</i> Tratado con <i>Verticillium lecanii</i> propagado en SDA.....	32
Cuadro 7	Valores obtenidos mediante el Análisis Probit para <i>Myzus persicae</i> Tratado con <i>Verticillium lecanii</i> propagado en Arroz.....	35
Cuadro 8	Valores de $TL_{50}$ para Tres Especies de Afidos Tratadas con <i>V. lecanii</i> , propagado en Substrato Semi- sólido (SDA) y Arroz.....	35
Cuadro 9	Porcentaje de Mortalidad de <i>Diuraphis noxia</i> , en los días Posteriores a la Aplicación de Diversas Concentraciones de <i>Verticillium lecanii</i> .....	36
Cuadro 10	Porcentaje de Mortalidad de <i>Brevicoryne brassicae</i> , tratado con <i>Verticillium lecanii</i> .....	37
Cuadro 11	Porcentaje de Mortalidad de <i>Myzus persicae</i> tratado con <i>Verticillium lecanii</i> .....	38

Cuadro 12	Porcentaje de Mortalidad de <i>B. brassicae</i> , <i>Myzus persicae</i> y <i>D. noxia</i> , tratadas con <i>Verticillium lecanii</i> (Zimm), en Invernadero.....	41
-----------	--	----

## RESUMEN

Los pulgones son uno de los agentes transmisores de enfermedades virales en plantas más importantes; el control de los mismos con insecticidas convencionales, ha generado en muchos de los casos resistencia a estos productos. En busca de una alternativa de control, en el presente trabajo se determinó la patogenicidad de *Verticillium lecanii* (Zimm)Viégas en los áfidos *Diuraphis noxia*, *Brevicoryne brassicae* y *Myzus persicae*; en laboratorio e invernadero. En laboratorio se determinó la  $CL_{50}$  (Concentración letal media) y  $TL_{50}$  (Tiempo letal medio) de cada una de las especies utilizando *V. lecanii* propagado en SDA (Sabouraud Dextrosa Agar) y Arroz (substrato utilizado para propagación masiva del hongo), mediante bioensayos por aspersión de suspensiones conidiales. En invernadero, se probó una concentración de  $1 \times 10^9$  conidios/ml de *V. lecanii* en plantas de col para *B. brassicae* y *Myzus persicae* y en plantas de trigo para *D. noxia*. La  $CL_{50}$  más baja, la presentó *D. noxia* con  $4.8 \times 10^3$  con/ml de *V. lecanii* propagado en SDA y  $1.2 \times 10^4$  con/ml cuando *V. lecanii* se extrajo de Arroz; siguiéndole *B. brassicae* con  $2.8 \times 10^4$  y  $1.7 \times 10^4$  con/ml en SDA y Arroz, respectivamente; y *M. persicae*  $2.8 \times 10^5$  (SDA) y  $9.1 \times 10^5$  con/ml (Arroz). La menor  $TL_{50}$ , también se presentó en *D. noxia* con 2.13 días en SDA y 1.85 días en Arroz; *B. brassicae* 7.8 (SDA) y 4.59 (Arroz); *M. persicae* 7.8 y 5.47 días en SDA y Arroz, respectivamente. En invernadero se obtuvo un 85% de mortalidad en *D. noxia*, 70% en *B. brassicae* y un 35% en *Myzus persicae*. Los resultados de este trabajo permiten concluir que las  $CL_{50}$ 's observadas con las tres especies de áfidos tratadas con *Verticillium* fueron estadísticamente iguales. Los valores de  $TL_{50}$  variaron en las tres especies posiblemente por características propias del insecto. El medio de propagación de *V. lecanii* no influye de manera significativa en la virulencia, ni en el porcentaje de mortalidad acumulada. Para obtener un buen control en invernadero, se recomienda mantener humedades altas, para favorecer la acción del hongo y realizar por lo menos dos aplicaciones para controlar en su totalidad a los pulgones presentes en invernadero.

## 1. INTRODUCCIÓN

En México se cultivan aproximadamente una centena de especies vegetales de valor nutricional y económico, cualquier problema de plagas o enfermedades de los mismos adquiere gran significancia, tal es el caso de los daños ocasionados de manera directa o indirecta por los áfidos o pulgones .

Estos insectos, presentan una gran tasa reproductiva que les permite alcanzar rápidamente en condiciones favorables grandes poblaciones. Los organismos alados poseen la habilidad de migrar a grandes distancias causando serios daños sobre las plantas debido a la continúa extracción de savia, que ocasiona el debilitamiento de las partes atacadas, esto favorece la aparición de fumagina (moho) o la transmisión de virus que suelen ser aún más nocivos para la planta que la misma plaga insectil (Gattini,1986).

Debido a que muchos de los cultivos, tanto agrícolas como ornamentales tienen poca tolerancia al ataque de los áfidos, es necesario implementar medidas de control adecuadas. En la mayoría de los casos, el control más utilizado es el químico; sin embargo el uso desmedido de estos productos, tiende a generar resistencia en las poblaciones de estos insectos. Con el fin de evitar desarrollo de resistencia en los áfidos ha sido necesario recurrir a métodos alternativos de control, mediante el empleo de factores "naturales de regulación" como los organismos entomófagos o los microorganismos entomopatógenos (control microbiano). Para puntualizar la importancia de éstos últimos en el control de plagas es importante señalar que de más de 1000 especies de entomopatógenos conocidos (bacterias, virus, hongos, nemátodos, protozoarios, etc.) menos del 10% han sido producidos en forma masiva y menos del 1% han sido comercializados. Entre estos entomopatógenos, los hongos, son particularmente importantes en el control de insectos plagas que se alimentan por la succión de jugos de las plantas; puesto que no existe forma de que ingieran los entomopatógenos, los hongos por su modo de acción a través de la cutícula favorece la infección ( Roberts, 1989).

La mayoría de las micosis de insectos son causadas por Hyphomycetes (Deuteromycotina)

y los hongos Entomophthorales. Entre los primeros podemos citar a *Beauveria bassiana*, sin duda uno de los entomopatógenos más estudiados y con un amplio rango de hospederos de diferentes órdenes, incluyendo al orden Homoptera.

Otro hongo de utilidad en éste caso, es *Verticillium lecanii* el cual actúa eficazmente sobre mosquita blanca, trips, escamas y pulgones; también ha sido empleado eficazmente en royas. *Verticillium lecanii*, aparece en forma natural en poblaciones densas de diferentes plagas de invernadero, *Trialeurodes vaporariorum* y muchos áfidos, incluyendo *Aphis gossypii* y *Myzus persicae* (Vehrs & Parrella, 1991).

## 2.OBJETIVO Y JUSTIFICACION

### 2.1 OBJETIVOS:

Determinar la Patogenicidad de *Verticillium lecanii* (Zimm) como agente de control de los áfidos: *Myzus persicae* (Sulzer), *Diuraphis noxia*(Mordviko) y *Brevicoryne brassicae* (Linneo), en condiciones de laboratorio e invernadero.

Establecer la relación concentración-mortalidad ( $CL_{50}$ ) para cada una de las especies de pulgones.

Determinar el tiempo letal medio ( $TL_{50}$ ) para cada una de las especies de insectos.

Establecer las posibles diferencias en patogenicidad de *Verticillium lecanii*, entre colonias desarrolladas en medio semisólido (SDA) y propagación en substrato sólido (arroz).

### 2.2 JUSTIFICACION

Dada la amplia distribución de los áfidos, la gran gama de hospederos y sobre todo su potencial como agentes transmisores importantes en la diseminación de enfermedades virales a las plantas. Hace necesario desarrollar estudios sobre métodos de control además del control químico, para evitar la generación de poblaciones resistentes a éstos productos. Con el fin de tener un manejo más adecuado para dichas plagas, el presente trabajo se dirigió a evaluar el efecto de *Verticillium lecanii* en tres especies de pulgones de importancia agrícola.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Importancia de la familia Aphididae.

Su biología, medio ambiente alimenticio y la amplia distribución mundial de los áfidos los hace idealmente aptos para la transmisión de virus a las plantas (Harris y Maramorosch, 1980). El número total de especies de áfidos descritas es de 3742 (Eastop & Hille Ris Lambers, 1976; Eastop, 1977); de éstas, aproximadamente 300 han sido señaladas como vectores de cerca de 300 virus en igual número de plantas hospederas. En la República Mexicana de las 160 especies mencionadas por Peña en 1985; 50 son de importancia económica (Peña, 1991) considerando su alto potencial de reproducción, su ataque a yemas, hojas y ramas y como contaminantes ya que, al eliminar grandes cantidades de miel en la superficie de hojas y tallos, proveen un medio idóneo para el desarrollo de fumagina además de que, en algunos casos su secreción salival es tóxica (SARH, 1992).

##### 3.1.1 Vectores.

Sin duda alguna una de las características relevantes de los áfidos es su capacidad de fungir como vectores de enfermedades virales; Harris y Maramorosch en 1980, mencionan que la familia Aphididae se encuentra entre los vectores de virus más importantes económicamente.

La proporción de virus transmitidos por áfidos, aparentemente no va en función a un grupo de hospedera en particular (Eastop, 1977); como se podría suponer, sin embargo, las familias de importancia económica, tales como Chenopodiaceae, Rosaceae, Leguminosae, Solanaceae y Graminae, han sido registradas como hospederos de los principales virus.

### 3.2 Anatomía y Biología de los Afidos.

**Los áfidos pertenecen al Orden Homoptera, Suborden Sternorrhyncha, Superfamilia Aphidoidea, Familia Aphididae.**

#### 3.2.1 Biología.

Los pulgones tienen ciclos de vida muy complejos. Muchas especies de zonas templadas son holocíclicas, esto significa que pasan a través de un ciclo completo de generaciones: invernan en estado de huevo y eclosionan en la primavera las hembras ápteras que se reproducen partenogénicamente, originando el nacimiento de ninfas vivas (ovoviviparidad). Varias generaciones se producen por este medio durante la estación, tales generaciones están formadas exclusivamente por hembras. La primera y segunda generaciones, consisten exclusivamente de individuos ápteros, eventualmente aparecen las hembras aladas. A fines de la estación los pulgones regresan a la hospedera original y es ahí donde se produce la generación sexual, que consiste de hembras y machos. La generación bisexual se aparean y las hembras depositan los huevos invernales ( Domínguez et al., 1990).

No obstante casi todos los áfidos de las regiones tropicales y subtropicales, así como algunas especies de zona templada, son anholocíclicos. Es decir que a través del año sólo se desarrollan numerosas generaciones de hembras partenogénicamente (vírgenes) aladas y ápteras. No se realiza reproducción sexual. En zonas cálidas esto es motivado por la predominancia de temperaturas más o menos altas a lo largo del año, lo que frena el desarrollo de hembras normales y machos (Holman,1974).

##### 3.2.1.1 *Myzus persicae* (Sulzer,1776).

Conocido comúnmente como el pulgón del chile y el melocotonero, es una de las plagas de áfidos más importantes en el mundo, originario de las regiones templadas de Europa y Asia. Tiene un amplio rango de hospederos, en México se ha colectado prácticamente en todas las regiones agrícolas del país infestando a 150 especies de 30 familias botánicas; aunque a nivel mundial se le ha registrado en 500 plantas hospederas de 50 familias (Peña,1991).

Por otra parte, *Myzus persicae*, es uno de los vectores de enfermedades virales en cultivos de importancia agrícola, se conoce que es capaz de transmitir virus de 120 enfermedades (Kennedy et al., 1962; citado por Blackman et al., 1985; Peña, 1991). Entre los virus persistentes que se transmiten se incluyen los amarillamientos de la remolacha, el mosaico del chícharo, el enrollamiento del rábano y la distorsión de la vena del tabaco, entre muchas otras.

Su espectro de alimentación es muy amplio, entre sus hospederas se incluyen plantas cultivadas, ornamentales y malezas, por ejemplo: ajo, apio, col, brocolí, frijol, alfalfa, trigo, haba, café, cártamo, cilantro, maíz, plantas ornamentales como crisantemo, rosa, azucena, gladiola; frutales como durazno, mandarina, sandía, mango, plátano entre muchas otras (Peña, 1993).

Son áfidos de 1.5 a 2.5 mm de longitud, color verde amarillento a verde pálido. Alado con una placa central esclerosada en el dorso del abdomen verde oscuro. Tubérculos antenales altos y convergentes. Sensorias secundarias ausentes en los ápteros y desarrolladas sólo en el artejo III en los alados. Sifúnculos ligeramente clavados (Peña, 1993) (Fig. 1).

### 3.2.1.2 *Diuraphis noxia* (Mordviko)

Denominado como el "pulgón ruso del trigo", su origen es incierto, en un principio se le atribuía al Suroeste de Rusia y la región del Mediterráneo, en la actualidad no ha sido esclarecido (Vera, 1988).

En México se conoce de unos 10 años a la fecha. Es uno de los vectores del "enanismo amarillo de la cebada", enfermedad virosa que afecta también al trigo y otras gramíneas. Su saliva contiene sustancias tóxicas y causa una toxemia conocida hasta hace poco como el "estriado del estado libre" (SARH, 1992) o "rayado fino de la hoja" (Peña, 1991; Gilchrist y Rodríguez, 1983).

Por otro lado entre sus características podemos mencionar que, *D. noxia*, es un áfido de 1.4 a 2.3 mm de longitud, de color verde grisáceo y de cuerpo elongado cubierto por una capa polvosa, posee antenas cortas y una proyección sobre la cauda, denominado proceso supracaudal, además de cornículos muy cortos (Vera, 1988), (Fig. 2).

### 3.2.3 *Brevicoryne brassicae* (Linneo).

A este insecto se le conoce como "pulgón cenizo de la col", su lugar de origen no es definido con exactitud; ha sido reportado atacando crucíferas silvestres y cultivadas de Europa, Asia, Australia y América; tiene la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones climáticas, desde las regiones frías o templadas hasta las subtropicales (Peña, 1991; Duarte, 1992).

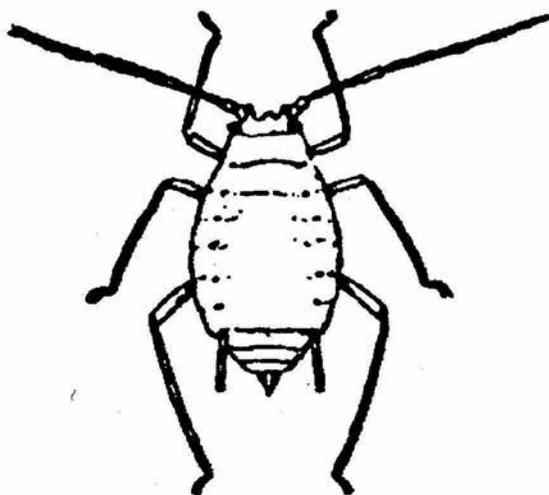
El pulgón de la col se encuentra distribuido en toda América del Norte, en cualquier parte donde crezcan sus plantas hospederas (Metcalf y Flint, 1977). Las plantas atacadas por éste pulgón son básicamente Crucíferas: colirábanos, col rizada, nabo y rábano.

En el campo *Brevicoryne brassicae* puede incrementarse a densidades tan elevadas que llega a causar serios daños a cultivos de Crucíferas, las cuáles son reconocidas por el insecto por la presencia de sinigrina, glucósido sin valor alimenticio que estas plantas contienen (Leclant, 1982 citado por Duarte, 1992).

Las hojas afectadas por el pulgón de la col se acucharan y se arrugan formando una especie de pseudoagallas cubiertas completamente por pulgones y en las infestaciones severas se marchitan y mueren. Si las plantas no mueren su desarrollo es lento formando cabezas pequeñas que no son aptas para el mercado. Se sabe que *Brevicoryne brassicae* es un vector de cerca de 20 enfermedades virales, incluyendo los puntos blancos en la col y el mosaico de la coliflor, entre otros (Blackman y Eastop, 1985).

La longitud de su cuerpo es de 2.20 -2.57mm , color blanquizco, densamente cubierto de polvo ceroso, el tercer segmento antenal es más largo que el cuarto y quinto juntos; los organismos alados poseen numerosas sensorias en el tercer segmento. Dorso abdominal con franjas transversales esclerosadas (Peña, 1991),(Fig 3).

A



B

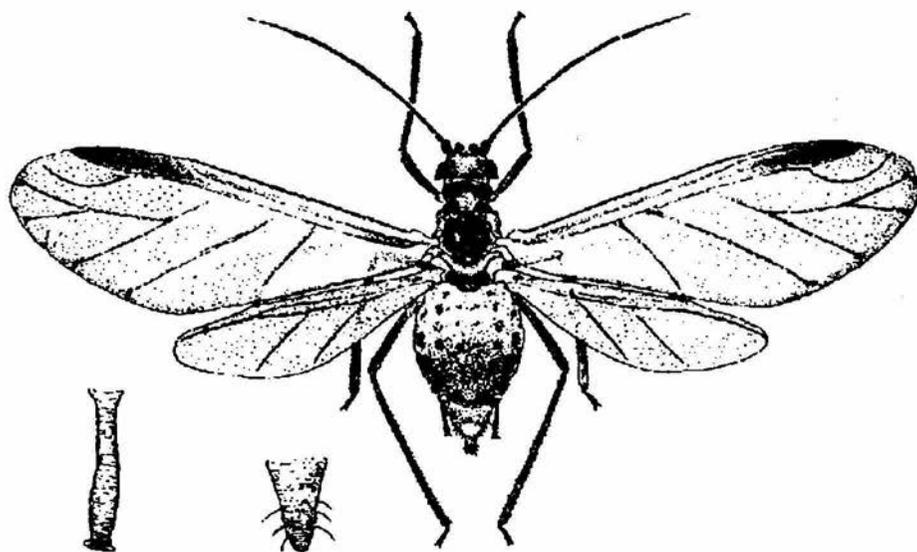
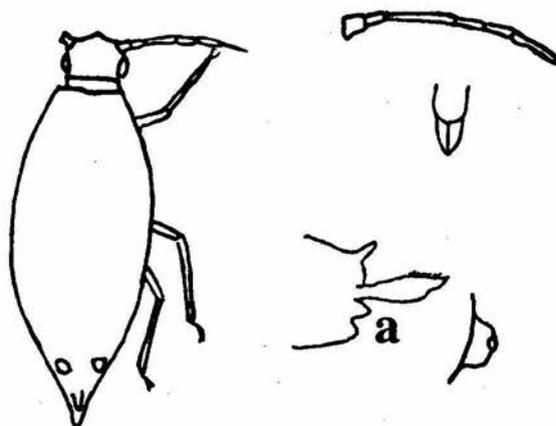
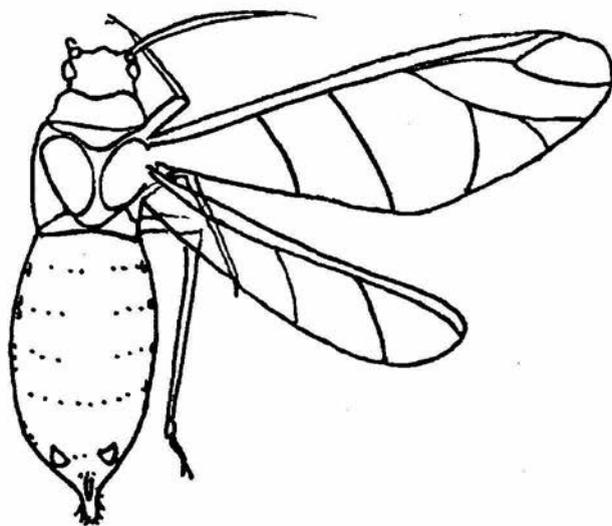
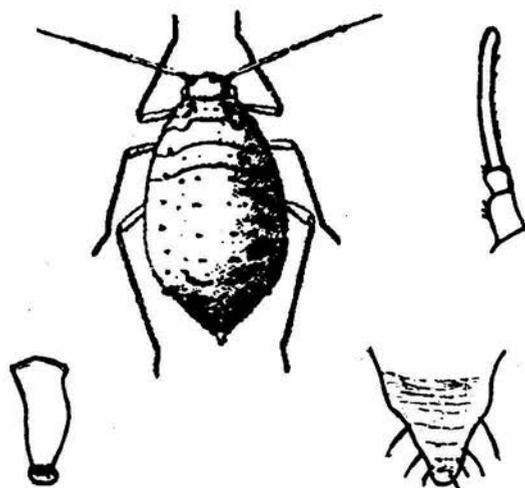


Figura 1. Esquema de *Myzus persicae* (Sulzer), A, hembra aptera; B, hembra alada (Tomado de Pacheco *et al*, 1985).

**A****B**

**Figura 2.** Esquema de *Diuraphis noxia* (Mordviko) A, organismo aptero; B, or alado; a) proceso supracaudal. (Tomado de Peña, 1991).

A



B

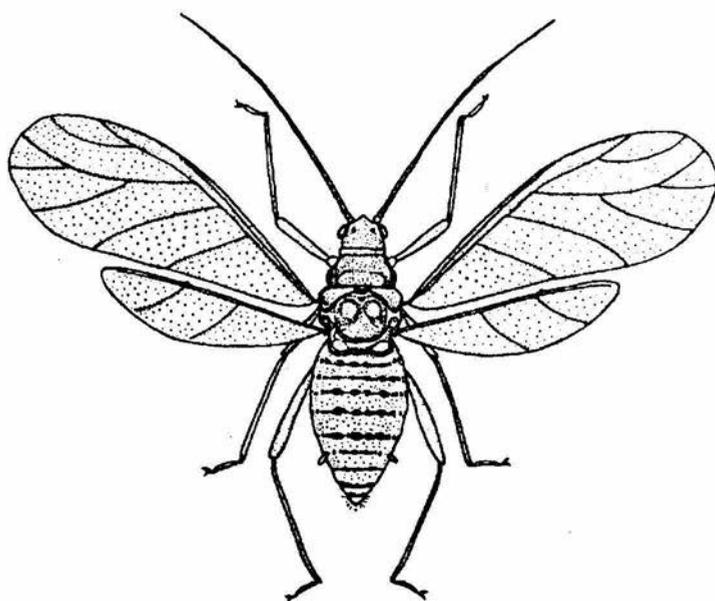


Figura 3. Esquema de *Brevicoryne brassicae* (Linneo) A. Aptero, B. Alado.  
(Tomado de Morón y Terrón, 1988)

### 3.3. MANEJO DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS EN EL CONTROL DE AFIDOS.

Entre los candidatos potenciales para el control de áfidos se citan algunos miembros de la familia Entomophthoraceae (Zygomycotina) (Dean & Wilding, 1973; Feng & Johnson, 1991) y dentro de la clase Deuteromycetes se encuentra *Beauveria bassiana* y *Verticillium lecanii*. Siendo esta clase la más estudiada, puesto que se han descrito cerca de 35 especies de hongos entomopatógenos, que atacan a diversos ordenes de insectos y ácaros (Brady, 1981; Roberts, 1991; St Leger et al., 1992).

Dentro de la subdivisión Deuteromycotina, el género *Beauveria*, se encontró atacando a *Schizaphis graminum* (Rondani), *Diuraphis noxia* (Mordviko) (Feng, 1990 a,b), *Phorodon humuli* (Dorschner et al., 1991) y *Brevicoryne brassicae* (Alatorre et al., 1992), entre otros.

Foster en 1975, realizó un aislamiento de *M. anisopliae* proveniente del áfido *Pemphigus trehernei* infectado en forma artificial; sin embargo no existen antecedentes de infecciones naturales. Hall en 1981b realizó bioensayos paralelos con dicho aislamiento comparándolo con *Verticillium lecanii*, observando que la  $CL_{50}$  era considerablemente más alta, sin embargo los pantanos salados donde se desarrolla *P. trehernei* favorece más a *M. anisopliae* que a otras especies de hongos.

*Verticillium lecanii* (Zimm) Viégas, se encontró por primera vez como patógeno de insectos parasitando a la escama *Saissetia (Lecanium) coffeae*, sin embargo actualmente se le ha encontrado parasitando mosquita blanca, áfidos, thrips, incluso ácaros. También ha sido encontrado como hiperparásito de royas (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Especies hospederas de *Verticillium lecanii* (Zimm) Viégas.

ESPECIES	REFERENCIAS
<i>Macrosiphoniella sanborni</i> <i>Myzus persicae</i>	Hall, 1976, 1979. Hall & Burges, 1979; Milner & Lutton, 1986; Harper & Huang, 1986; Yokomi & Gottwald, 1988.
<i>Aphis gossypii</i>	Wilding, 1972; Hall, 1982; Yokomi & Gottwald, 1988; Vehrs & Parrella, 1991.
<i>Aphis citricola</i> <i>Diuraphis noxia</i> <i>Schizaphis graminum</i> <i>Toxoptera aurantii</i> <i>Aphis fabae</i> <i>Acyrtosiphum pisum</i> <i>Metopolophium dirhodum</i>	Yokomi & Gottwald, 1988. Feng & Johnson, 1990 a,b. Feng & Johnson, 1990 a,b. Magaña et al, 1989. Hall & Papierok, 1982. Harper & Huang, 1986. Harper & Huang, 1986; Feng & Johnson, 1990b.
<i>Rhopalosiphum padi</i> <i>R. maidis</i> <i>Brachycaudus helichrysi</i> <i>Brevicoryne brassicae</i>	Feng, 1990. Remaudière y Latgé, 1985; Feng, 1990. Hall & Burges, 1979. Alatorre et al, 1992.
<i>Bemisia tabaci</i> <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Osborne & Landa, 1992; Garza y Arredondo, 1993. Ekbohm y Ahman, 1979; Hall, 1982; Kanagaratnam et al, 1982; Mier et al, 1991; Domínguez et al, 1992; 1994.
<i>Saissetia (Lecanium) coffeae</i> <i>Coccus viridis</i> <i>C. hesperidum</i>	Nieter, 1861 (citado por Petch, 1925). Viégas, 1934; Easwaramoorthy et al, 1978; Samsinákova & Kálalová, 1975. Samsinákova y Kálalová, 1975.
<i>Melanoplus sanguipes</i>	Harper & Huang, 1986; Johnson et al, 1988; Khachatourians, 1992.
<i>Boophilus sp.</i> <i>Thrips spp.</i> <i>Thrips tabaci</i>	Rombach & Gillespie, 1988, Lezama, 1988. Roberts, 1991. Gillespie, 1984; Rombach & Gillespie, 1988.
<i>Scolytus scolytus</i> <i>Leptinotarsa decemlineata</i> <i>Heterodera schantii</i> <i>Hemileia vastatrix</i> <i>Coelosporium dominguense</i> <i>Uromyces dianthi</i>	Barson, 1976. Sámsinákova, 1977 Hansler & Hermanns, 1981. Carrión, 1988; Carrión y Ruíz Belin, 1988; Carrión et al, 1989. Evans & Samson, 1982; Spencer, 1980.

### 3.4 EL HONGO ENTOMOPATOGENO *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viégas.

#### 3.4.1 Antecedentes históricos

Nieter en 1861(citado por Petch, 1925) menciona por primera vez a este hongo, parasitando a la escama *Saissetia (Lecanium) coffeae*. Zimmerman describe la especie de éste hongo en 1898 (In Brady, 1981) aislada de la escama verde *Coccus (Lecanium) viridis (Green)*, en Indonesia.

*Verticillium lecanii* tiene una larga historia como agente causante de epizootías en poblaciones de escamas y áfidos en los trópicos (Baird, 1958). En la actualidad es frecuente aislarlos de insectos individuales (Petch, 1948); Leatherdale, 1970; Barson, 1976). En condiciones de invernadero con medio ambiente tropical en Europa y los Estados Unidos, frecuentemente este hongo diezma hasta en un 100% las poblaciones de escamas y áfidos ( Neuzilova, 1957; Sámsinaková y Kálalová, 1976; Hall, 1976; Hall & Burges, 1979; Kanagaratnam et al, 1982; Hall, 1984; Feng, 1990; Vehrs & Parrella, 1991).

#### 3.4.2 Clasificación taxonómica y Sinonimia.

*Verticillium*, según Roberts(1989), se encuentra ubicado dentro de la siguiente clasificación:

**División:** Amastigomycotina

**Subdivisión:** Deuteromycotina

**Clase :** Deuteromycetes(= Hyphomycetes)

**Orden :** Moniliales

**Familia :** Moniliaceae

**Género:** *Verticillium*

**Especie :** *Verticillium lecanii*

Entre los sinónimos más comunes para esta especie Domsch & Gams en 1980, citan los siguientes:

<i>Cephalosporium lecanii</i>	Zimmerman, 1898.
<i>Acrostalagmus aphidum</i>	Oedem, 1902.
<i>Acrostalagmus coccidicola</i>	Gueguen, 1904.
<i>Cephalosporium lefroyi</i>	Horne, 1915.
<i>Cephalosporium aphidicola</i>	Petch, 1931.
<i>Verticillium hemileiae</i>	Bouriquet, 1939.

### 3.4.3 Descripción del hongo.

Según Gams en 1971, las colonias de *Verticillium lecanii* sobre agar son blancas o de color amarillo pálido, algodonosa-aterciopelada, reverso descolorido, amarillo u ocre. Con hifas vegetativas hialinas y conidióforos erectos, provistos de ramificaciones verticiladas a todo lo largo, portadores de fiálides agrupadas o solitarias, generalmente aculeadas y divergentes con collarillo inconspicuo, productoras de conidios aglutinados en cabezas mucilaginosas, cilíndricos o elipsoidales, con sus extremos redondeados de 2.3-10.0 X 1.0-2.5mm, clamidosporas ausentes(Fig.4).

### 3.4.4 Hospederos

*Verticillium lecanii*, es bien conocido como agente entomopatógeno, sus hospederos más comunes son : áfidos, escamas, thrips y mosquitas blancas. Esta diversidad de hospederos se ve particularmente reflejada en algunos de los sinónimos dados, como por ejemplo: *Coccurum*, *aphidicola*, *diptaergenium*, *muscarium*, *thripidum*, *eriophytis*(Gams,1971).

*Verticillium lecanii*, no es parásito estricto de artrópodos, también aparece como un saprófito en comestibles y materia orgánica y puede ser comúnmente aislado del suelo (Domsch

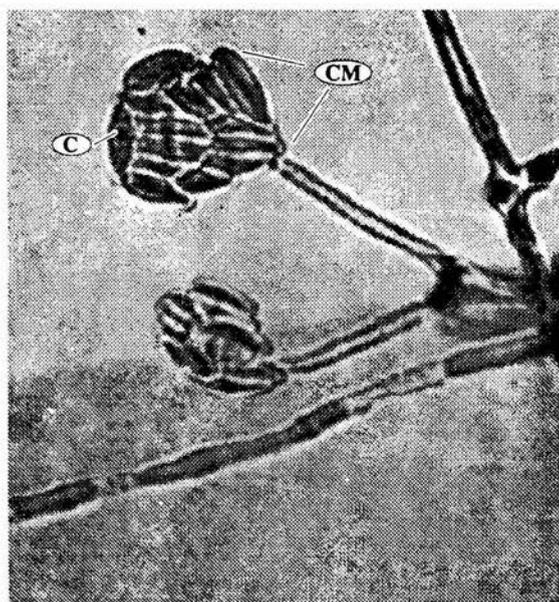


Figura 4. *Verticillium lecanii* (Zimm) Viégas. CM=Cabeza mucilaginosa  
C=Conidio.

y Gams, 1980; Barrón 1968). La especie es hiperparásitica de mohos (Spencer & Alkey, 1980), Agaricales y ocasionalmente de hongos entomopatógenos (Rombach, 1988).

En México se ha aislado a partir de la roya del café, *Hemileia vastatrix*, (Carrión G. y Ruiz Belin, 1988). Mc Millan (1986) usa sucesivamente *V. lecanii*, para el control del moho frangipani (*Coelosporium domingense*), en Florida. Evans & Samson (1982), encontraron a *V. lecanii* asociado al ascomyceto *Torrubiella confragosa* (Mains) (Ascomycotina: Clavicipitales), en material colectado en las islas Galápagos.

### 3.4.5 Seguridad al hombre y a otros animales.

La ausencia de registros de *Verticillium lecanii* en el hombre y en otros vertebrados, es impreciso dada su inocuidad. Todos los aislamientos examinados por Hall, 1981; no crecieron a 37 °C, así que la infección en animales de sangre caliente es remota.

Antes de iniciar estudios en invernaderos, el autor demostró la ineficiencia del hongo para implantarse como parásito en mamíferos a través de un proceso infectivo, y la presencia del mismo no afectó la salud de los ejemplares en experimentación. Además se encontró que no causa ningún tipo de alergia al hombre.

La mayoría de los insectos útiles, incluyendo polinizadores probablemente no han sido infectados por *V. lecanii*; sólo se tiene un registro de un himenoptero (Leatherdale, 1970).

### 3.4.6 Incidencia natural.

El mayor número de registros ha sido sobre escamas como hospederos (Mc Clelland & Tucker, 1929; Viégas, 1939; Ganhao, 1956) y áfidos (Petch, 1948).

Se ha reportado con menor frecuencia en otros órdenes de insectos, por ejemplo: Coleopteros (Lipa, 1975; Barson, 1976), Colembólos, dípteros y en un Ichneumonido (Leatherdale, 1970) y ácaros eriófidos.

### 3.4.7 Sintomatología .

Los síntomas tempranos de las micosis causadas por *V. lecanii* en los áfidos, se manifiestan primeramente con un cambio conductual del insecto, es decir, se reduce su actividad, sus movimientos son lentos y hay un cese gradual de la alimentación. La coloración cambia, perdiendo brillantez, apreciándose una deshidratación de la cutícula . En algunos casos se puede observar desarrollo micelial en las antenas, patas o en la cauda.

### 3.4.8 Patogénesis.

La formación de conidios en cabezas pegajosas, probablemente facilita la dispersión del hongo. Los conidios al germinar penetran la cutícula del insecto por una combinación de fuerzas mecánicas y degradación enzimática. Jackson et al, 1985, mencionan que los aislamientos de *V. lecanii* patógenos de insectos producen proteasas, lipasas y quitinasas que favorecen su penetración y desarrollo . Una vez que el hongo ha penetrado a través de la cutícula, el crecimiento se desarrolla de modo similar al de una levadura, germinando en el hemocele del hospedero e invadiendo órganos y tejidos. Si la humedad suministrada es favorable, la esporulación se presentará eventualmente sobre la parte externa del cadáver (Rombach, 1988)(Fig. 5).

### 3.4.9 Producción de toxinas.

En muchos casos, algunos hongos entomopatógenos, tales como *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Verticillium lecanii* producen sustancias, tóxicas o micotóxicas, que en ocasiones tienen la capacidad de acelerar la muerte del insecto, antes de que éste haya sido totalmente colonizado por el hongo. Dichas toxinas no son más que metabolitos secundarios producidos por el hongo que incluyen un gran número de compuestos tóxicos para los insectos (Kanaoka et al., 1978; Roberts, 1981; Claydon y Grove 1982 ). Dichos compuestos tienen mayores ventajas que muchos de los insecticidas convencionales, ya que pueden ser

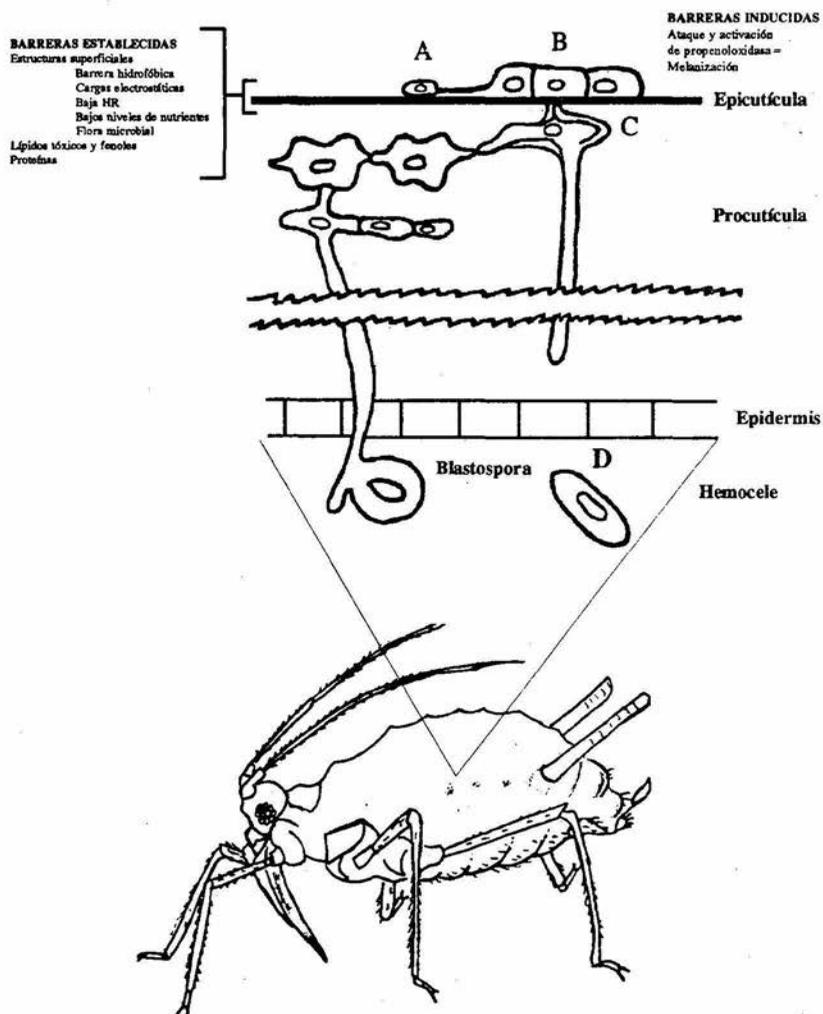


Figura 5. Representación esquemática del proceso de infección de *Verticillium lecanii* y las barreras cuticulares de resistencia, en una sección de la cutícula del insecto. A, conidio; B, apresorio; C, penetración y D, invasión.

### 3.4.10 Cultivo en laboratorio.

*Verticillium lecanii*, puede crecer como todos los hongos en medio convencional por ejemplo: Sabouraud dextrosa agar y papa dextrosa-agar, incluyendo un medio que contiene quitina como única fuente de carbono y nitrógeno. Sobre medio sólido *Verticillium* produce conidios; contrariamente. en medio líquido, asume la morfología de una semilevadura, probablemente en respuesta a la acumulación de CO<sub>2</sub>, formando elementos germinales conocidos como blastosporas (Hall, 1981).

### 3.4.11 Efecto de la Temperatura y humedad.

El hongo es mesotérmofilo, requiere de altas humedades para germinar, posiblemente una ligera capa de agua sea suficiente para que se lleve a cabo este proceso . De éste modo la máxima germinación de esporas y por lo tanto los mayores niveles de infección en los insectos, se obtienen con aspersiones sincronizadas de esporas; o con humedades óptimas (Hall, 1981).

### 3.4.12 Compatibilidad con plaguicidas.

Wilding, en 1972, examinó la toxicidad de los fungicidas benomyl, dimethirimol y triarimol hacia *V. lecanii*. Encontró que el benomyl y el triarimol, en medio artificial inhiben de manera consistente el crecimiento del hongo, sin embargo, el autor observó que el triarimol no afecta la infección de *Aphis gossypii*, cuando es aplicado como aceite humectante. Sugiere que esta conducta posiblemente se deba, a que el transporte de fungicidas sistémicos se realiza en los vasos xilemáticos, mientras que los áfidos se alimentan del floema.

Olmert & Kenneth (1974) examinaron los efectos de 14 insecticidas y acaricidas y 9 fungicidas sobre *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii* y una especie desconocida de *Verticillium* in vitro. Observaron que todos los químicos excepto los aceites "white summer", inhiben el crecimiento de *Verticillium spp.* a bajas dosis. Los insecticidas diclorvos y clorpirifós y los fungicidas benomyl, thiabendazole, maneb y captan probaron ser muy dañinos.

Por otro parte, Hall (1981 b), reporta exámenes adicionales involucrando los pesticidas, el hongo y dos especies de áfidos.

Concluyó que la inhibición del crecimiento micelial sobre placas de agar fue menor, en relación con la germinación conidial.

Posteriormente, el mismo autor probó once pesticidas, no observando ningún efecto sobre la germinación conidial de *V. lecanii*. La acción sinergista inhibitoria recomendada por los pesticidas iprodione y carbaryl sobre la germinación de *V. lecanii* fue reportada (Hall, 1983), se sugiere tener cuidado con las mezclas complejas de pesticidas y el hongo. Fenarimol inhibe significativamente tanto la germinación como el crecimiento, sin embargo en bioensayo se observó que no impide la infección (Hall, 1981b). Esto concluye que exámenes en medio artificial tienen un limitado valor predictivo para su uso en campo.

Khalil et al., 1985, realizaron estudios de compatibilidad de *Verticillium lecanii* con, benomyl, cypermetrina, oxido de fenbutatin, formotión, mevinphos, oxamyl, permetrina, pirimicarb, metil- tiofanato y triadimefon a concentraciones recomendadas y subletales. Observando diferentes grados de inhibición del crecimiento micelial en placas de agar.

Rebollar(1993). Evaluó en laboratorio la compatibilidad de 10 fungicidas en relación al crecimiento micelial de *V. lecanii*, usando dosis recomendadas y subletales. Concluyendo que todos los productos evaluados inhiben en mayor o menor grado el crecimiento micelial. Productos como el benomil y mancozeb y mezclas de éste; inhiben totalmente el crecimiento en todas las dosis probadas. Fungicidas como el Captan presentaron efectos fungistáticos a concentraciones subletales. El iprodione, anilazina y el zineb tuvieron un efecto menor de inhibición del 60 al 64%.

## 4.MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo de investigación, se realizó en las instalaciones del **Colegio de Postgraduados** en Montecillo, Estado de México. En dicha investigación se probó la efectividad de *Verticillium lecanii* (Zimm), en dos fases experimentales: en laboratorio e invernadero, ésta última con el fin de obtener resultados más apegados a las condiciones de campo.

La fase de laboratorio se realizó en el laboratorio de **Patología de insectos del Centro de Entomología y Acarología (CENA)** del Colegio de Postgraduados.

Por otra parte, tanto la cría de áfidos como las pruebas de invernadero se desarrollaron en las instalaciones del Colegio de Postgraduados ubicadas en Chapingo.

### 4.1 CRIA DE PULGONES

Las especies, de áfidos, *Myzus persicae* y *Brevicoryne brassicae*, fueron colectadas de cultivos de crucíferas; las colonias de *Diuraphis noxia* fueron proporcionadas por el M.C Ramón Garza del INIFAP. Las especies de pulgones, fueron montadas mediante la técnica de Remaudiere(1985)(Apendice A) e identificadas ,utilizando las claves de Peña(1991).

#### 4.1.1 *Myzus persicae* (Sulzer).

Para la cría de esta especie se utilizaron plantas de haba(*Vicia faba*). La siembra se realizó con semillas de haba previamente remojadas durante 24hs. y despojadas de la testa, en recipientes de plástico de 18x12x19 cm, con una densidad de 27 semillas por maceta. Al alcanzar las plantas una altura aproximada de 10cm, se infestaron con pulgones; las plantas se regaron diariamente y al notar signos de putrefacción o marchitez se cambiaron por plantas nuevas, esto se hizo colocando las plantas nuevas junto a las infestadas, permitiendo que los

pulgones se trasladasen por sí mismos. Las plantas se regaron con una solución de urea al 0.005 %, puesto que esta especie requiere de mayores cantidades de nitrógeno para desarrollarse favorablemente.

#### 4.1.2 *Diuraphis noxia* (Mordviko).

En la cría de el pulgón ruso se utilizaron plantas de trigo (*Triticum aestivum*); sembradas en vasos de unicel de un litro de capacidad con un número aproximado de cien semillas por recipiente. Las plantas una vez sembradas fueron protegidas con tubos de acrílico de 40 cm de diámetro con orificios laterales cubiertos con malla nylon, tanto en las paredes del cilindro, como en su parte superior para permitir la ventilación. El empleo de los cilindros de plástico, se hizo con el fin de evitar la posible exclusión competitiva del pulgón ruso, con cualquier otro áfido que se presentase.

#### 4.1.3 *Brevicoryne brassicae* (Linneo).

Para la cría del pulgón de la col se usaron plantas de col, (*Brassica oleracea*). Las semillas de col se sembraron en semilleros con 5 semillas por compartimiento. Al alcanzar un mes de edad se trasplantaban en vasos de unicel y se infestan con los áfidos.

En todos los casos, el suelo utilizado era previamente esterilizado con Bromuro de metilo.

### 4.2 PRODUCCIÓN DE ESPORAS Y COSECHA.

*Verticillium lecanii* se aisló a partir de pulgones previamente infectados; usando inicialmente un medio Sabouraud- Dextrosa agar (SDA). Posteriormente para tener las cantidades necesarias del hongo, se utilizaron conidios de *Verticillium lecanii* propagados en arroz esterilizado como substrato, facilitados por el Laboratorio de Patología de Insectos.

#### 4.2.1 Determinación de la concentración de esporas en Sabouraud.

Las esporas se cosecharon 7 días después de haber realizado la siembra del hongo. La cosecha se hizo raspando la superficie del micelio con una navaja de metal y enjuagando con agua destilada con adherente-dispersante Tritón x 100 previamente esterilizada. El uso del adherente es con el fin de romper la tensión superficial de las esporas y lograr la homogenización de la suspensión.

Posterior a la cosecha se hizo la determinación del número de conidios por mililitro, mediante el uso de un hematocitómetro y un microscopio compuesto, utilizando la formula de Lipa & Slizinki (1973) :

$$\text{No. de conidios} = \frac{\text{Con. contados} \times 4 \times 10^6 \times \text{dilución}}{\text{Con./ml}}$$

80

### 4.3 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD.

#### 4.3.1 Selección del método de aplicación.

Esta prueba, se realizó para determinar el modo de aplicación más conveniente, que evitara daños a las especies de áfidos en tratamiento y errores de manejo. Entre los métodos de aplicación más comunes se encuentran: la aspersión, la inmersión de los insectos en una suspensión del entomopatógeno y el someter al insecto al contacto de superficies contaminadas por el hongo.

Para tal efecto se utilizaron 300 pulgones de la especie *Myzus persicae* , repartidos en 3 lotes experimentales, administrándoles el hongo a cada grupo utilizando los métodos de aplicación ya citados. La concentración que se utilizó fue de  $1 \times 10^8$  conidios /ml.

Una vez seleccionado el método de aplicación se realizaron los estudios sobre virulencia de *Verticillium lecanii*, mediante la técnica de bioensayo. Se compararon las posibles diferencias en patogenicidad de *V. lecanii* sembrado en placas de agar y propagado en arroz. Observando si existía un incremento o decremento de la virulencia sobre las especies de áfidos tratados.

La segunda fase del trabajo se desarrolló en invernadero, para evaluar la eficacia en condiciones más naturales.

#### 4.4 BIOENSAYO.

Los bioensayos son ampliamente utilizados como una prueba para determinar la patogenicidad o toxicidad de un microorganismo o de una sustancia tóxica, basándose en la respuesta biológica que produce.

El bioensayo permite determinar la  $CL_{50}$  (**Concentración letal media**), concentración capaz de matar al 50% de los organismos de una población, de tal manera que es posible estimar y comparar la actividad biológica del agente a considerar (Apendice C).

Los bioensayos se inician determinando la respuesta biológica (RB) de la población de individuos lo cual permite determinar, la dosis máxima en cuyo efecto se refleja una mortalidad del 0% o muy cercano a éste y la dosis más baja capaz de matar al 100% de los individuos sometidos a la prueba. En este trabajo se utilizó una concentración de referencia ( $1 \times 10^8$  conidios/ml) en base a la cual se estimaron las concentraciones requeridas para obtener la **RB**; en este caso se probaron las siguientes concentraciones:  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  y  $10^2$ .

Una vez determinados los rangos de RB, el siguiente paso consistió en determinar las concentraciones intermedias para obtener la  $CL_{50}$ . Las concentraciones intermedias se obtuvieron al graficar en el papel probit la mortalidad resultante de cada una de las concentraciones probadas, después se trazó una línea recta que pasará por la mayoría de los puntos. Se dividió

en forma equidistante la línea a través de las concentraciones, y se trazaron líneas dirigidas hacia el eje de las abscisas, determinando los puntos que corresponden a las concentraciones intermedias.

#### 4.4.1 BIOENSAYOS CON *Verticillium lecanii*.

Las unidades experimentales se conformaron de hembras adultas ápteras, transferidas a una sección de hoja de trigo para *Diuraphis noxia* y de col para *Brevicoryne brassicae* y *Myzus persicae*. Estas fueron colocadas en una caja petri, con papel filtro humedecido. Se utilizó un número de 20 áfidos por tratamiento, asperjando a los insectos, las diferentes concentraciones del hongo y al testigo una solución de agua con Tritón-X 100 .

A partir de las 48hs de realizado el tratamiento, se inició el registro de la mortalidad anotando diariamente, en un lapso de 8 días, los insectos muertos, vivos y áfidos micosados. En los casos en que se presentó mortalidad menor del 10% en el testigo, se corrigió mediante la ecuación propuesta por Abbott (1925).

$$\% \text{ Mort.} = \frac{\% \text{ Mort. trat.} - \% \text{ Mort. testigo}}{100 - \% \text{ Mort. testigo}} \times 100$$

Los valores porcentuales de mortalidad se transformaron a unidades Probit, para determinar las líneas de respuesta del logaritmo de la concentración en contra de la mortalidad y estimar la  $CL_{50}$  y otros parámetros estadísticos(ApendiceD).

##### 4.4.1.1 Pruebas de Invernadero

Para las pruebas de invernadero se usaron plantas de 10 cm de altura, tanto de trigo como de col( en este caso no se utilizó el haba para las pruebas, puesto que se observó una mejor tasa reproductiva de *Myzus* en col en comparación a la observada en haba). Se utilizaron 20 plantas

al azar por tratamiento, cada una plantada en macetas de iguales dimensiones y con igual número de semillas.

Los áfidos se colocaron en las plantas 2 días antes de la realización de las pruebas, dicho proceso fue con el fin de permitir el establecimiento de los organismos. Posteriormente las plantas se asperjaron con la suspensión de *Verticillium lecanii*.

Las plantas que servían de control se asperjaron con agua destilada estéril. Todas las macetas se cubrieron con bolsas de polietileno por dos días para mantener altas humedades que favorecieron la acción del hongo.

#### 4.5 Análisis Estadísticos.

El análisis de los datos obtenidos por el bioensayo, se procesó mediante el programa de computo PC. PROBIT (Ver. 1.0 de Camacho, 1990).

Por otro lado los valores de  $CL_{50}$  y  $TL_{50}$ , de los organismos tratados con *Verticillium lecanii* propagados en SDA y en arroz, se compararon mediante un análisis de varianza bifactorial. Los valores de mortalidad registrados en invernadero, se analizaron, por un análisis de varianza y una prueba de Tukey, de separación de medias.

## 5.RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1 Selección del Método de Aplicación de *Verticillium lecanii*.

El método de aspersión, resultó ser el más adecuado de los tres métodos probados, ya que el porcentaje de mortalidad acumulada en 8 días, a partir de la aplicación, fue muy cercano al 70%, comparado con 65% y 24% de los métodos de inmersión y contaminación del insecto respectivamente.

En el tratamiento de los áfidos, se pudo observar un alto índice de mortalidad por errores de manipulación por ejemplo, al sumergir los áfidos en la suspensión de conidios, muchos pulgones morían ahogados, coincidiendo con lo reportado por Hall, 1976; quien menciona el riesgo que corren los áfidos de ahogarse, al emplear la inmersión de éstos como método de inoculación del hongo ; por tal motivo se registra inicialmente un 40% de mortalidad por dicha causa (fig 6).

Al someter a los áfidos a superficies previamente contaminadas con el hongo, no se observó mortalidad por mal manejo. Sin embargo el registro de mortalidad en los días subsecuentes a la aplicación, resultó ser menor en comparación a los otros dos probados.

Por otro lado, cuando los áfidos fueron asperjados con una suspensión de *V. lecanii* no se presentaron errores de manipulación . Si bien es cierto que se obtiene una mayor infestación de los pulgones tratados por inmersión que por aspersión; como puede observarse inicialmente con una mortalidad del 40% superior a la de los otros dos métodos; esto es ocasionado básicamente por la manipulación del insecto. Además por razones prácticas el método de aplicación más utilizado, en el control comercial, es la aspersión (Hall & Burges, 1979; Harper & Huang, 1986; Vehrs & Parrella, 1991).

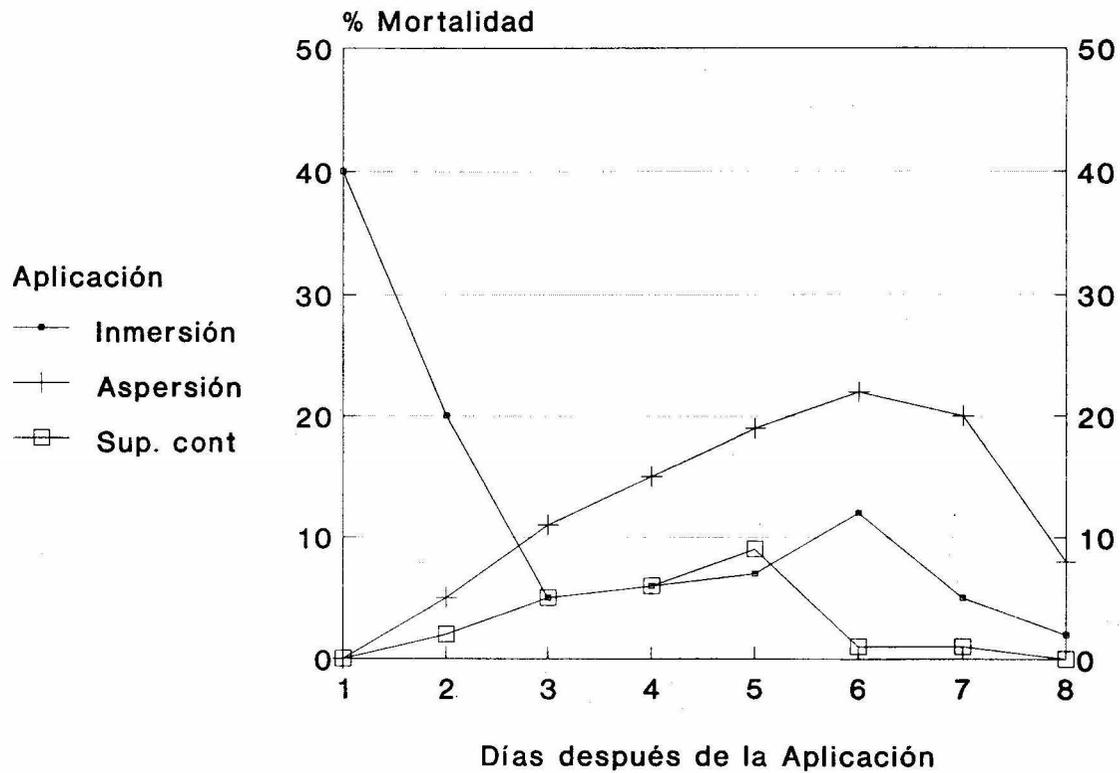


Fig.6. Comparación de tres métodos de aplicación del Insecticida Biológico *Verticillium lecanii* en *Myzus persicae*

## 5.2 Susceptibilidad de los Afidos a *Verticillium lecanii*.

### 5.2.1 Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>).

Los valores de las CL<sub>50</sub> de las tres especies de áfidos, sometidos al análisis de varianza, demostraron que no había diferencias significativas, independientemente del método de propagación de *Verticillium lecanii* (Apéndice F). Sin embargo, pese a los resultados de la ANOVA, se pueden advertir ligeras diferencias entre las tres especies.

*Diuraphis noxia*, se manifestó como la más vulnerable con una CL<sub>50</sub> promedio de  $4.8 \times 10^3$  con/ml, usando *V. lecanii* propagado en SDA (Cuadro 2) y  $1.2 \times 10^4$  con/ml (Cuadro 3), usando *V. lecanii* propagado en Arroz. En éste caso *Verticillium* en SDA resultó ser ligeramente más agresivo, que el producto propagado en Arroz; ya que se necesitó un menor número de conidios para matar al 50% de la población del pulgón ruso.

**CUADRO 2.-Valores obtenidos mediante el análisis Probit para *Diuraphis noxia* tratado con *Verticillium lecanii* propagado en placas de SDA.**

FECHA	CL <sub>50</sub>	Con./ml	CL <sub>95</sub>	LFI	LFS	PEND.	X <sup>2</sup>
28-OCT-93	0.000017	$1.7 \times 10^7$	0.042284	0.000005	0.000054	0.486	2.6
29-OCT-93*	0.000001	$1 \times 10^2$	0.014286	0.000000	0.000003	0.486	18.3
3-NOV-93*	0.096832	$9 \times 10^6$	7.437489	0.040237	0.287294	0.424	14.3
9-NOV-93	0.000047	$4.7 \times 10^3$	0.016253	0.000013	0.000138	0.647	5.8
11-NOV-93*	0.000046	$4.6 \times 10^3$	0.012810	0.000024	0.000081	0.671	16.4
12-NOV-93	0.000107	$1 \times 10^4$	0.098915	0.000055	0.000199	0.554	2.6
17-NOV-93	0.000020	$2 \times 10^3$	0.009150	0.000005	0.000058	0.617	0.44

CL<sub>50</sub> promedio =  $4.8 \times 10^3$

LFI.-Límite Fiducial inferior

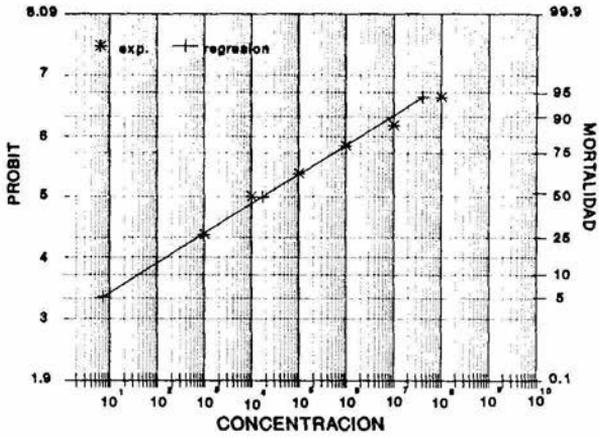
LFS.-Límite Fiducial Superior

PEND.-Pendiente

X<sup>2</sup>.-Valor de Chi cuadrada.

\*. Valores no significativos.

## SDA



## Arroz

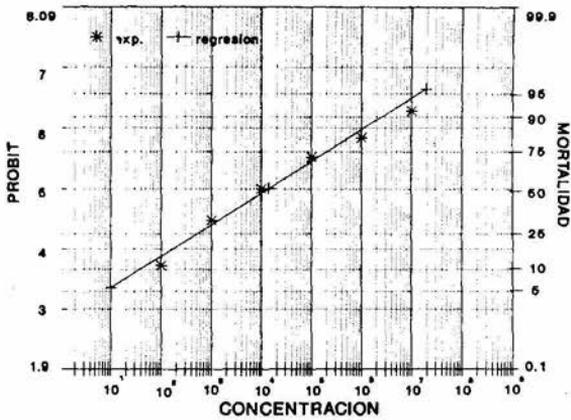


Fig.7 Línea de respuesta Concentración- Mortalidad de *Diuraphis noxia* tratada con *Verticillium lecanii* propagado en SDA y Arroz .

**CUADRO 3.- Valores obtenidos mediante el análisis Probit para, *Diuraphis noxia* tratado con *Verticillium lecanii* propagado en sustrato sólido (Arroz).**

FECHA	CL <sub>50</sub>	Con./ml	CL <sub>95</sub>	LFI	LFS	PEND	X <sup>2</sup>
27-DIC-93	0.000065	6.5 x 10 <sup>3</sup>	0.0733	0.000018	0.000196	0.5880	0.5
28-DIC-93	0.000139	1.4 x 10 <sup>4</sup>	0.1924	0.00004	0.000423	0.5237	1.3
29-DIC-93	0.000198	1.9 x 10 <sup>4</sup>	0.1240	0.000065	0.000555	0.655	3.15
3-ENE-94	N O		S I G	N I F	I C A	T I V	O
4-ENE-94*	0.000107	1 x 10 <sup>4</sup>	0.0989	0.000055	0.000199	0.671	16.4
5-ENE-94	0.000036	3.6 x 10 <sup>3</sup>	0.1557	0.000015	0.000077	0.452	2.97

CL<sub>50</sub> promedio = 1.2 x 10<sup>4</sup> conidios/ml.

Misma leyenda de la tabla anterior.

*Brevicoryne brassicae*, demostró una susceptibilidad intermedia y la variación en el valor de las CL<sub>50</sub> de SDA y Arroz, son mínimas con 2.8x10<sup>4</sup> conidios/ml (Cuadro 4) y 1.7x10<sup>4</sup> (Cuadro 5), respectivamente.

**CUADRO 4.- Valores obtenidos mediante el análisis Probit, para *Brevicoryne brassicae* tratados con *Verticillium lecanii* propagado en placas de SDA.**

FECHA	CL <sub>50</sub>	Con./ml.	CL <sub>95</sub>	LFI	LFS	PEND	X <sup>2</sup>
19-ENE-94	0.00032	3.2 x 10 <sup>4</sup>	0.295	0.00010	0.0009	0.55	3.0
26-ENE-94	0.00016	1.7x 10 <sup>4</sup>	0.712	0.00004	0.0005	0.45	1.4
27-ENE-94	0.00032	3.2 x 10 <sup>4</sup>	0.259	0.00010	0.0009	0.55	3.0
28-ENE-94	N O		S I G	N I F	I C A	T I	VO
29-ENE-94*	0.00029	2.95x10 <sup>4</sup>	0.278	0.00015	0.0005	0.55	10.

CL<sub>50</sub> promedio = 2.76 x 10<sup>4</sup> con./ml.

**CUADRO 5.-Valores obtenidos mediante el análisis Probit para *Brevicoryne brassicae*, tratado con *Verticillium lecanii*, propagado en substrato sólido (Arroz).**

FECHA	CL <sub>50</sub>	Con./ml	CL <sub>95</sub>	LFI	LFS	PEND	X <sup>2</sup>
11-ENE-94	0.00013	1.3x10 <sup>4</sup>	0.307	0.00003	0.0004	0.49	1.08
12-ENE-94	0.00013	1.3x10 <sup>4</sup>	0.307	0.00003	0.0004	0.49	1.08
13-ENE-94*	0.00023	2.3x10 <sup>4</sup>	0.229	0.00012	0.0004	0.54	11.7

CL<sub>50</sub> promedio = 1.7 x 10<sup>4</sup> conidios/ml.

*Myzus persicae*, resultó ser un poco más resistente a la acción del hongo con 2.8x10<sup>5</sup> con/ml (SDA) (Cuadro 6) y 9.1x10<sup>5</sup>(Cuadro 7) ligeramente más alto que el anterior.

**CUADRO 6.-Valores obtenidos mediante el análisis Probit para *Myzus persicae* tratado con *Verticillium lecanii* propagado en placas de agar.**

FECHA	CL <sub>50</sub>	Con/ml	CL <sub>95</sub>	LFI	LFS	PEND	X <sup>2</sup>
29-JUL-93	0.0015	1.5x10 <sup>5</sup>	15.69	0.0004	0.006	0.41	4.2
18-AGO-93	0.0005	5 x10 <sup>4</sup>	1.581	0.0002	0.001	0.47	3.7
19-AGO-93	0.0006	6 x10 <sup>4</sup>	3.811	0.0002	0.002	0.43	4.1
2-SEP-93	0.0004	4 x10 <sup>4</sup>	7.118	0.0001	0.001	0.39	6.1
10-SEP-93*	0.0007	7 x10 <sup>4</sup>	4.217	0.0002	0.002	0.43	4.7
13-SEP-93	0.0017	1.7x10 <sup>5</sup>	4.556	0.0005	0.006	0.48	2.3

CL<sub>50</sub> promedio = 2.8 x 10<sup>5</sup> conidios/ml.

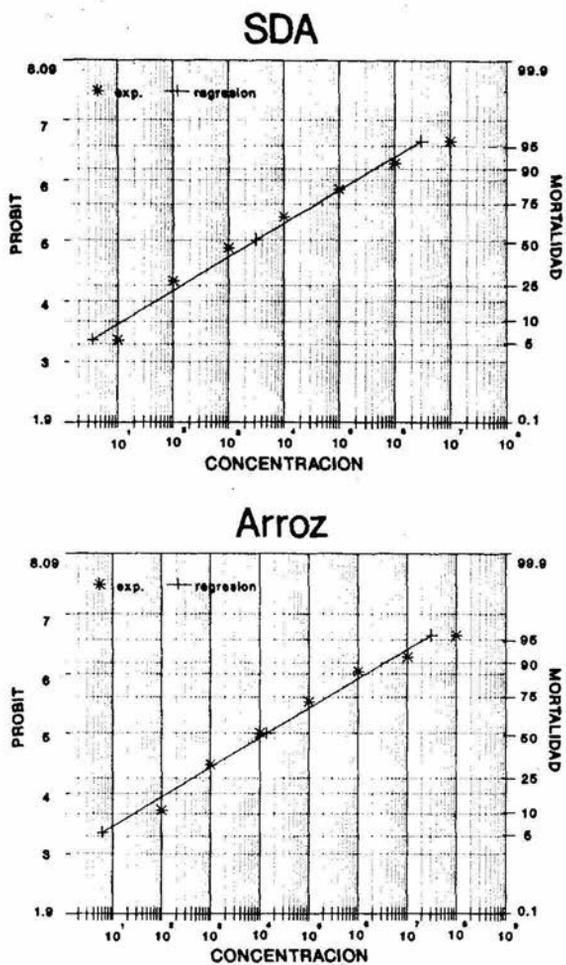


Fig. 8 Líneas de respuesta Concentración-mortalidad de *Brevicoryne brassicae* tratado con *Verticillium lecanii* propagado en SDA y Arroz

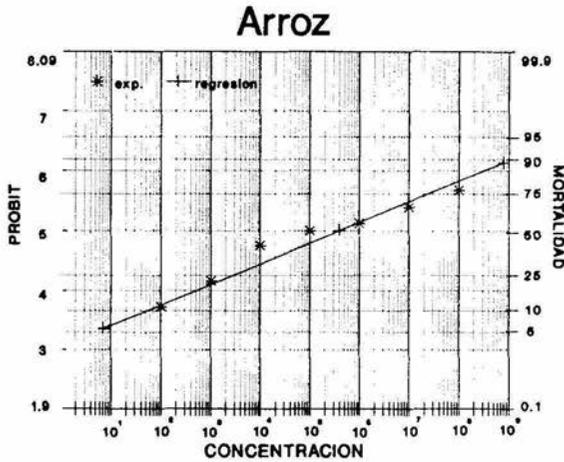
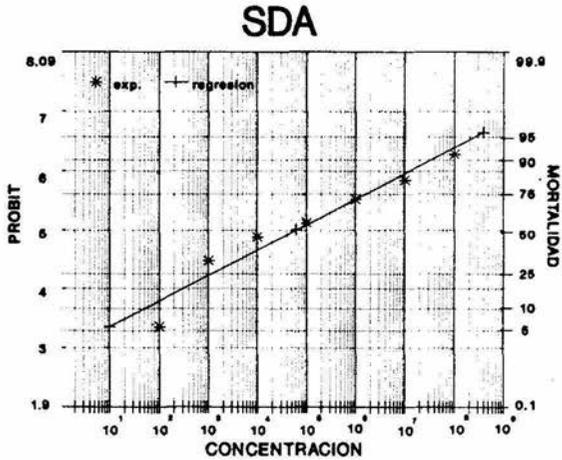


Fig.9 Línea de respuesta Concentración-Mortalidad de *Myzus persicae* tratadas con *Verticillium lecanii* propagadas en SDA y Arroz

**CUADRO 7.-Valores obtenidos mediante el análisis Probit para *Myzus persicae* tratado con *Verticillium lecanii* propagado en sustrato sólido (arroz).**

FECHA	CL <sub>50</sub>	Con./ml	CL <sub>95</sub>	LFI	LFS	PEND	X <sup>2</sup>
29-JUL-93	0.0002	2 x10 <sup>4</sup>	0.006	0.00008	0.00041	1.07	6.4
31-AGO-93*	1.9021	5.1x10 <sup>5</sup>	15955349.1	0.1011	5096.69	0.23	3.3
15-SEP-93	0.0006	6 x10 <sup>4</sup>	80.83	0.0001	0.00361	0.32	8.1
17-SEP-93	0.0001	1 x10 <sup>4</sup>	10.57	0.00001	0.00006	0.33	11.6
29-OCT-93*	0.0040	4 x10 <sup>5</sup>	225.3	0.0009	0.02433	0.34	4.5
31-OCT-93	0.0002	2 x10 <sup>4</sup>	0.992	0.00005	0.000795	0.45	6.3
3-NOV-93	N O		S I G	N I F	I C A	T I V	O

CL<sub>50</sub> promedio= 9.1 x 10<sup>5</sup> conidios/ml.

### 5.2.2 Tiempo Letal

Para el cálculo del tiempo letal, se utilizaron los registros de mortalidad observados a partir de las 48hs. hasta los 8 días después del tratamiento. La determinación del tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>), se calculó en el mismo período de tiempo que para el análisis probit, en el cuadro 8 se muestran de manera conjunta dichos valores.

**CUADRO 8 .-Valores de TL<sub>50</sub>, para las tres especies de áfidos, tratadas con *Verticillium lecanii*, propagado en sustrato semi-sólido (SDA).**

Especie	TL <sub>50</sub> (Días)	Lim.fid.inf.	Lim.fid.sup
D.noxia (SDA)	2.13	2.28	1.97
B.brassicae(SDA)	7.88	4.52	132.55
M. persicae (SDA)	7.89	6.37	11.04
D.noxia (Arroz)	1.85	2.06	1.63
B.brassicae (Arroz)	4.59	3.85	5.65
M. persicae (Arroz)	5.47	4.88	6.29

Por otro lado, al someter los valores de el porcentaje de mortalidad acumulada, al análisis de varianza, se observaron diferencias de significancia, es decir el tiempo en que se manifiesta la mortalidad en los áfidos es distinto en cada una de las especies, lo cuál se puede constatar al observar los datos en bruto: *D. noxia* presentó los mayores índices de mortalidad en los primeros cuatro días en las concentraciones más altas, independientemente del medio de propagación, los porcentajes de mortalidad son muy semejantes(Cuadro 9).

**CUADRO 9.-Porcentaje de Mortalidad de *Diuraphis noxia*, en los días posteriores a la aplicación de diversas concentraciones de *Verticillium lecanii*.**

		% Mortalidad después de la aplicación DIAS							
		CONCENTRACION	2	3	4	5	6	7	8
A R R O Z		10 <sup>8</sup> con./ml	45	95	0	0	0	0	95
		10 <sup>7</sup> con./ml	35	55	95	95	95	95	95
		10 <sup>6</sup> con./ml	25	35	70	85	85	85	85
		10 <sup>5</sup> con./ml	15	20	50	60	70	70	70
		10 <sup>4</sup> con./ml	5	5	15	35	40	50	50
		10 <sup>3</sup> con./ml	0	5	5	15	20	30	30
		10 <sup>2</sup> con./ml	0	0	0	5	5	5	5
		10 <sup>8</sup> con/ml	50	50	0	0	0	0	100
S D A		10 <sup>7</sup> con/ml	25	50	15	0	0	0	94.7
		10 <sup>6</sup> con/ml	45	25	10	0	0	0	94.1
		10 <sup>5</sup> con/ml	30	15	10	10	10	5	80
		10 <sup>4</sup> con/ml	20	35	5	5	0	0	65
		10 <sup>3</sup> con/ml	10	15	5	5	0	0	46.5
		10 <sup>2</sup> con/ml	0	0	10	5	0	0	20

Una tendencia similar es observada en *Brevicoryne brassicae*, con porcentajes de mortalidad acumulada muy semejantes y la mayor mortalidad en los 8 días de observación, se presenta en las concentraciones más altas; sin embargo la mortalidad se manifiesta en todos los días posteriores a la aplicación de *V. lecanii* tanto en Arroz como en SDA (Cuadro 10).

**CUADRO 10.-Porcentajes de Mortalidad de *Brevicoryne brassicae*, tratado con *Verticillium lecanii*.**

% De Mortalidad Después de la Aplicación.								
DIAS								
	CONCENTRACION	2	3	4	5	6	7	8
A	10 <sup>8</sup> con/ml	25	25	35	50	70	85	95
R	10 <sup>7</sup> con/ml	25	30	45	60	65	90	90
R	10 <sup>6</sup> con/ml	10	25	40	55	65	85	85
O	10 <sup>5</sup> con/ml	5	15	20	30	45	60	70
Z	10 <sup>4</sup> con/ml	5	5	5	10	25	45	50
	10 <sup>3</sup> con/ml	0	0	0	10	10	25	30
	10 <sup>2</sup> con/ml	0	0	0	0	0	5	10
S	10 <sup>8</sup> con/ml	30	35	50	60	75	90	95
	10 <sup>7</sup> con/ml	20	30	40	60	70	85	90
D	10 <sup>6</sup> con/ml	10	25	40	50	55	65	75
A	10 <sup>5</sup> con/ml	10	15	20	40	45	50	65
	10 <sup>4</sup> con/ml	0	10	10	15	30	40	50
	10 <sup>3</sup> con/ml	0	0	0	5	5	15	20
	10 <sup>2</sup> con/ml	0	0	0	0	0	0	5

En *Myzus*, se observa un comportamiento diferente, en este caso la mortalidad se inició en el tercero y cuarto día después de la inoculación. En este caso, aparentemente, hay una diferencia en el porcentaje de mortalidad de *M. persicae* tratado con *Verticillium* propagado en

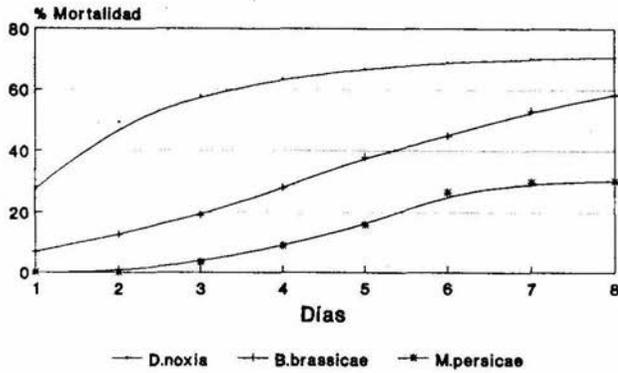
SDA alcanzando valores de mortalidad superiores respecto del otro medio de propagación (Cuadro 11).

**CUADRO 11.- Porcentajes de Mortalidad de *Myzus persicae* tratada con *Verticillium lecanii* .**

% Mortalidad después de la aplicación								
DIAS								
	CONCENTRACION	2	3	4	5	6	7	8
A R R O Z	10 <sup>8</sup> con/ ml	0	20	30	35	50	70	75
	10 <sup>7</sup> con/ml	0	10	25	35	45	50	65
	10 <sup>6</sup> con/ml	0	5	15	20	30	45	55
	10 <sup>5</sup> con/ml	0	0	10	15	30	35	50
	10 <sup>4</sup> con/ml	0	0	0	10	15	35	40
	10 <sup>3</sup> con/ml	0	0	0	0	0	5	20
	10 <sup>2</sup> con/ml	0	0	0	0	0	5	10
S D A	10 <sup>8</sup> con/ ml	0	20	25	35	50	65	85
	10 <sup>7</sup> con/ ml	0	15	25	40	45	55	80
	10 <sup>6</sup> con/ ml	0	5	20	20	30	50	75
	10 <sup>5</sup> con/ ml	0	5	15	20	30	40	60
	10 <sup>4</sup> con/ml	0	0	10	10	15	30	40
	10 <sup>3</sup> con/ ml	0	0	0	5	10	20	25
	10 <sup>2</sup> con/ ml	0	0	0	0	5	5	15

En cualquiera de los tres casos, en menor o mayor escala, se puede decir que la mortalidad es directamente proporcional a la concentración; en otras palabras, a mayor concentración mayor mortalidad. *Diuraphis noxia* y *B. brassicae* son más susceptibles a la infección de *Verticillium lecanii*, comparadas con *M. persicae*.

## SDA



## Arroz

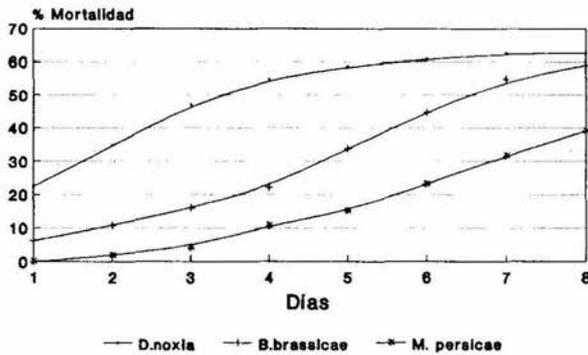


Fig. 10 Comparación de Tiempos letales de tres especies de áfidos tratados con *Verticilium lecanii* propagado en SDA y en Arroz.

La diferencia en la respuesta de cada una de las especies de pulgones puede obedecer a características inherentes a la biología del insecto (Vazquez en 1993) . Otros factores importantes en la resistencia de los insectos a la invasión por patógenos, lo constituyen las múltiples barreras fisiológicas que desarrollan los hospederos como defensa a los tóxicos. El desarrollo de los hongos entomopatógenos en sus hospederos no sólo se ve influenciado por las reacciones inmunitarias ; Hajek & St Leger (1994), mencionan la interferencia dependiente del hospedero sobre el cual se alimenta el insecto. Así por ejemplo, las chinches adultas de *Blissus leucopterus leucopterus*, inoculadas con *Beauveria bassiana*, demostraron mortalidades más altas cuando se alimentaban de trigo, cebada o dieta artificial comparada con maíz o sorgo (Ramoska y Toodd, 1985).

### 5.2.3 Medio de Propagación de *V. lecanii*.

Mediante el análisis de varianza, se determinó que no existen diferencias significativas considerando el substrato de propagación, la virulencia del hongo y el porcentaje de mortalidad de los pulgones. Esto, es alentador, desde el punto de vista de producción masiva del hongo, ya que la propagación de *V. lecanii* en substrato sólido es menos costosa que la propagación en placas de agar. El cultivo en arroz es muy fácil y económico, además se puede contar con una gran cantidad de material biológico, para grandes extensiones con un mínimo de materia prima. Otra ventaja de éste método de propagación es que los fragmentos de los granos de arroz, sirven como substrato inicial para que el hongo se desarrolle saprofiticamente, incluso antes de infectar al insecto.

El cultivo en placas de agar, es recomendable para la producción en pequeñas cantidades; en el caso de aplicaciones masivas del patógeno, éste método es poco rentable, ya que sería muy costoso propagar cantidades importantes del hongo, en caso de necesitar aplicar en grandes extensiones.

### 5.3 Pruebas de Invernadero.

La aplicación de *Verticillium lecanii* en invernadero se realizó por la tarde, utilizando una concentración única de  $1 \times 10^9$  con./ml. Los resultados de mortalidad acumulada registrada en los siete días que duro la prueba, se muestran en el cuadro 12.

**CUADRO 12.-Porcentaje de mortalidad de *B. brassicae*, *M. persicae* y *D. noxia* tratados con *Verticillium lecanii*(Zimm), en invernadero.**

ESPECIE	DIAS	1	2	3	4	5	6	7	TOTAL %
<i>B. brassicae</i> <sup>1</sup>		-	10	-	25	10	15	10	70
<i>M. persicae</i> <sup>1</sup>		-	5	-	10	10	7	3	35
<i>D. noxia</i> <sup>2</sup>		-	15	-	25	20	15	10	85

Concentración:  $1 \times 10^9$  conidios/mililitro.

Planta hospedera: 1 Col, 2 trigo.

Modo de aplicación: Aspersores manuales.

La respuesta fue similar a la observada en los bioensayos realizados en el laboratorio: en *D. noxia*, se registró el porcentaje de mortalidad más alto con un 85% , siguiéndole *B. brassicae* con 70% y *M. persicae* con un valor menor 35%.

El uso de bolsas de polietileno y el agua disponible favoreció considerablemente la acción de *V. lecanii*; coincidiendo con lo expresado por Milner y Lutton, 1986; que registraron una transmisión máxima del hongo sólo cuando el agua disponible está presente, gracias a una humedad relativa constante y alta. Este alto nivel de transmisión se notó en el presente trabajo; pues a pesar de que hubo generación de ninfas en mayor o menor escala, la transmisión vertical de la enfermedad, fue satisfactoria, es decir las madres producían gran cantidad de ninfas, sin embargo estas morían rápidamente al estar en contacto a los conidios adheridos al cuerpo de la madre.

Otro factor importante que influye en la transmisión de la enfermedad es la movilidad del insecto, lo cual favorece la transmisión de la infección y la diseminación de ésta en la colonia o en colonias vecinas (Hall & Papierok, 1982). Como consecuencia las especies menos móviles, son más difíciles de controlar, a diferencia de las que son muy activas. En este caso a pesar que *D. noxia* no es muy activa, el hecho de permanecer la colonia "encerrada" en el cogollo del trigo facilita el contagio entre los individuos de una misma colonia. Las hembras adultas son más activas, capaces de diseminar la enfermedad a las colonias adyacentes.

Contrariamente a lo publicado por Hall & Burges, 1979; *M.persicae*, no registró altos niveles de mortalidad a pesar de su gran movilidad, podría explicarse por la variabilidad que existe entre los aislamientos de *V. lecanii* y la diferencia en susceptibilidad que éstos ejercen sobre el insecto.

En los tratamientos se observó un decremento en la población, sin embargo, no se alcanzó un control del 100%, por lo tanto es aconsejable realizar una segunda aplicación. Hall en 1979, menciona que una aspersión inicial puede servir sólo para introducir el patógeno en la población, subsecuentemente la dispersión de la enfermedad depende del contagio de los áfidos con superficies contaminadas por el hongo o la transmisión a través de áfidos enfermos.

Para tener una visión más precisa del efecto de *Verticillium lecanii* sobre las poblaciones de áfidos utilizadas en el presente trabajo, es necesario realizar pruebas en campo, probando el efecto del hongo en éstas condiciones.

## 6. CONCLUSIONES

- El método de aplicación por aspersión, resultó ser el más adecuado de los tres probados, dada su facilidad, produciendo un mínimo de mortalidad por manipulación.
- Los valores de las  $CL_{50}$ , obtenidos en los bioensayos de las tres especies tratadas, resultaron estadísticamente iguales. La especie más susceptible fue *Diuraphis noxia* con  $4.8 \times 10^3$  con/ml (SDA) y  $1.2 \times 10^4$  (Arroz), seguido por *Brevicoryne brassicae* con  $2.8 \times 10^4$  y  $1.7 \times 10^4$  en SDA y Arroz respectivamente y por último *Myzus persicae* con  $2.8 \times 10^5$  y  $9.1 \times 10^5$  con/ml.
- Los valores de los  $TL_{50}$ , de las tres especies probadas variaron de forma considerable, probablemente por las características fisiológicas inherentes al propio insecto. De nueva cuenta los valores más bajos, se presentaron en *D.noxia* con 2.13 días (SDA) y 1.85 en arroz; *B.brassicae* con 7.8 días (SDA) y 4.5 (Arroz) y *M. persicae* 7.8 y 5.47 días en SDA y Arroz, respectivamente.
- El medio de propagación de *Verticillium lecanii*, no influye significativamente en la virulencia ni en el porcentaje de mortalidad acumulada.
- Para obtener un buen control de plagas de áfidos en invernadero, se recomienda contar con una humedad alta, o en su defecto, tratar de compensarla con agua disponible.
- La actividad del insecto es muy importante, para diseminar la enfermedad en una población de insectos.
- La buena cobertura y el microclima en el que se desarrolla el insecto, son factores importantes que favorecen la diseminación de los hongos, en éste caso *Verticillium lecanii*.

## 7.LITERATURA CITADA

- Abbot, W. S;** 1925. A methods for computing the effectiveness of insecticide. J. Econ. Entomol. 18:265-267.
- Alatorre, R.R; Lara, R.J y Andrade, D.B.** 1992. Manejo microbiano de lepidópteros plaga asociados al cultivo de crucíferas. En: Anaya, R.S; Bautista M.N y Domínguez (eds.). Manejo Fitosanitario de las Hortalizas en México. SARH-CENA, Chapingo, Méx. PP.249-254.
- Alatorre, R.R; Lara, R.J; Vargas L.A. y Bellman, J.** 1992. Virulencia de *Verticillium lecanii* y *Beauveria bassiana*. En: XV Congreso Nacional de Control Biológico. Fac. de Estudios Superiores Cuautitlán. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. Méx. p. 72-76.
- Barson, G.** 1976. Laboratory studies on the Fungus *Verticillium lecanii*, a Larval Pathogen of the Large Elm Bark Beetle (*Scolytus scolytus*). Ann. App. Biol. 93:207-214.
- Blackman, R.C. & Eastop V.F.** 1985. Aphids on the World's Crops: An Identification Guide. Ed. John Wiley and sons. Departament of Entomology British Museum (Natural History) pp. 446.
- Brady, B.L.** 1981. Fungi as parasites of insects and mites. Biocontrol News and Information. 2(4):281-291.
- Bucher, G.E & Morse, P.M.** 1963. Precision of Estimates of the Median Lethal Dose of Insect Pathogens. Journal of Insect Pathology. 5, 289-308.
- Camacho, C.O.** 1990. PCPROBIT. Versión 1.0 (programa de cómputo). Centro de Estadística y cálculo. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México.
- Carrión, G.,** 1988. Estudios Sobre el Control Biológico de la Roya del Cafeto Mediante *Verticillium lecanii* en México. Mic. Neotrop. Aplic. 1 :79-86.
- Carrión, G. y F. Ruiz-Belin,** 1988. Inoculación en el Laboratorio de *Verticillium lecanii* Sobre la Roya (*Hemileia vastatrix*). Rev. Mex. Mic. 4:317-321.
- Carrión, G.; F. Ruiz-Belin y R. Alarcón,** 1989. Nuevos Datos Sobre el Parasitismo de *Verticillium lecanii* sobre la Roya del Cafeto (*Hemileia vastatrix*). Rev. Mex. Mic. 5: 217-224.
- Claydon, N. & Grove, F.** 1982. Insecticidal Secondary Metabolic Products from the Entomogenous Fungus *Verticillium lecanii*.

- Clayton, W.; McCoy; Samson, R. A. & Boucias. Entomogenous Fungi. In: C.R.C. Handbook of Natural Pesticides, Vol. V; Microbial Insecticides, Part. A.
- Dean, G.J.W & Wilding N. 1973. Infection of Cereal Aphids by the Fungus *Entomophthora*. Ann.Appl. Biol. 74, 133-138.
- Domínguez, Y.; Ortíz, M.; Rivera, F. y Mier, T. 1992. Evaluación Preliminar del Daño Ocasionado por *Trialeurodes vaporariorum* W.(Homoptera: Aleyrodidae). En Cultivo de Frijol tratado con *Verticillium lecanii* y Extractos Vegetales: Agave lechuguilla y *Yuca carnerosana*, en Zacatepec, Mor. En: XV Congreso Nacional de Control Biológico. FES Cuautitlán. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. p. 88-93.
- Domínguez, R.Y., Dolores, B.S.; García, A.A.; Martínez, G.J. y Amado, M.F. 1994. Liberación de *Verticillium lecanii*, como parte de un programa de manejo integrado contra *Trialeurodes vaporariorum* West. (Homoptera-Aleyrodidae) Sobre un Cultivo de Frijol, en Izucar de Matamoros, PUE. XVII Congreso Nacional de Control Biológico 6-7 Oct., Soc. Mex. Control Biológico. Inst. Tecnológico Agropecuario de Oaxaca.
- Domínguez, R.R; Ayala, O.J.L.; Rodríguez, H.C.; Domínguez, R. y Sanchez, A.H. 1990. Plagas Agrícolas. UACH Depto de Parasitología Agrícola pp. 356.
- Domsch, K.H. y Gams, W. 1980. Compendium of Soil Fungi. Traute-Heide Anderson. Academic Press. Vol.1. p. 840-884.
- Dorschner, K.W; Feng, M.G. y Baird, R.C..1991. Virulence of an Aphid-Derived Isolate of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) to the Hop Aphid, *Phorodon humuli* (Homoptera: Aphididae). Environ. Entomol. 20(2): 690-693.
- Duarte, R. 1992. Preferencia Comparativa de *Coccinella septempunctata* con tres afidófagos nativos (Coleoptera: Coccinellidae). Entre *Diuraphis noxia* y tres pulgones plaga (Homoptera: Aphididae). Tesis Profesional. ENEP Iztacala, U.N.A.M.
- Easwaramoorthy, S. & Jayaraj, S. 1978. Efectiveness the White Halo Fungus, *Cephalosporium lecanii*, Against Field Populations of Coffee Green Bug *Coccus viridis*. J. Invertebr. Pathol. 32:88-96.
- Ekbom, B.S. & Ahman, I. 1980. The Fungus *Verticillium fusiosporum* as an Insect Pathogen. J. Inv. Pathol. 36, 136-138. Evans, H.C; Samson, R.A (1982) Entomogenous fungi from the Galapagos Islands. Canadian Journal of Botany 60, 2325-2333.
- Evans, H.E. 1984. Insect Biology. Ed. Addison- Wesley Publishing Company. Colorado State University. pp.436.

- Feng, M.G.; Johnson B. & Kish, L.P. 1990. Survey Entomopathogenic Fungi Naturally Infecting Cereal Aphids (Homoptera: Aphididae) of Irrigated Grain Crops in Southwestern Idaho. *Environ. Entomol.* **19**(5): 1534-1542.
- Feng, M.G. & Johnson, B. 1990. Relative Virulence of six Isolates of *Beauveria bassiana* on *Diuraphis noxia* (Homoptera:Aphididae). *Environ. Entomol.* **19**(3): 785-790.
- Feng, M.G. 1990. Virulence of *Verticillium lecanii* and an Aphid-Derived Isolate of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) for six species of cereal- Infesting Aphids (Homoptera:Aphididae). *Environ. Entomol.* Vol.19.No.3.
- Feng, M.G. & Baird, C.R. 1991. Virulence of an Aphid-Derived Isolate of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) to the Hop Aphid, *Phorodon humuli* (Homoptera: Aphididae). *Environ. Entomol.* Vol. 20. No.2 690-693.
- Feng, M.G. & Johnson, B. 1991. Bioassay of Four Entomophthoralean Fungi (Entomophthorales) Against *Diuraphis noxia* and *Metopolophium dirhodum* (Homoptera:Aphididae) *Environ. Entomol.* **20**(1): 338-345.
- Ferrón, P. 1978. Biological Control of Insects Pests by Entomogenous Fungi. *Ann. Rev. Entomol.* **23**: 409-442.
- Foster, W.A., 1975. The Life History and Population Biology of an Intertidal Aphid, *Pemphigus trehernei* Foster. *Transaction of the Royal Entomological Society of London.* **127**,193-207.
- Gams, W. 1971. "Cephalosporium- artige Schimmelpilze (Hyphomycetes)". Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Ganhão, J.F.P. 1956. *Brotéria* **25**, 71-135.
- Garza, G.E. y Arredondo, B.H. 1993. Sensibilidad "in vitro" de Adultos de Mosquita blanca de las Hortalizas *Bemisia tabaci* (Homoptera:Aleyrodidea) a Diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces spp.* y *Verticillium lecanii*. En: XVI Congreso Nacional de Control Biológico. Soc. Méx. Control Biológico. Fact. de Ciencias Biológicas U.A.N.L Monterrey N.L. Méx. P. 31-32.
- Gattini, A. 1986. Como proteger las plantas de los insectos. Ed. de Vecchi S.A. Barcelona, España pp.151.
- Gilchrist, L.; Rodríguez, R. and Burnett, P.A., 1983. The Extent of Freestate Streat and *Diuraphis noxia* in Mexico. In: Barley Yellow Dwarf. A proceedings of the Workshop; Burnett, P.A. Workshop Organizar; december 6-8, 1983. CIMMYT. pp. 157-163.

- Hajek, A.E & St. Leger, R.J. 1994. Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39:293-322.
- Hall, R.A. 1976. A Bioassay of the Pathogenicity of *Verticillium lecanii* Conidiospores on the Aphid *Macrosiphoniella sanborni*. *J. Inv. Pathol.* 27, 41-48.
- Hall, R.A. & Burges, H.D. 1979. Control of Aphids in Glasshouses with the Fungus, *Verticillium lecanii*. *Ann. App. Biol.* 93, 235-246.
- Hall, R.A. 1979. Pathogenicity of *Verticillium lecanii* Conidia and Blastospores Against the Aphid, *Macrosiphoniella sanborni*. *Entomophaga.* 24(2) 191-198.
- Hall, R.A. 1980. Effect of Repeated Subculturing on Agar and Passaging through an Insect Host on Pathogenicity, Morphology, and Growth Rate of *Verticillium lecanii*. *J. In v. Pathol.* 36, 216-222.
- Hall, R.A. 1981. The Fungus *Verticillium lecanii* as a Microbial Insecticide Against Aphids and Scales. In: *Microbial Control of Pest and plant Diseases*. Edited by H.D. Burges. Ed. Academic Press., England. pp.949.
- Hall, R.A. 1981b. Laboratory Studies on the Effects of Fungicides, Acaricides and Insecticides on the Entomopathogenic Fungus *Verticillium lecanii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* 29:39-42.
- Hall, R.A. 1982. Control of Whitefly *Trialeurodes vaporariorum* and cotton aphid *Aphis gossypii* in glasshouses by two isolates of the fungus, *Verticillium lecanii*. *Ann. appl. Biol.* 101, 1-11.
- Hall, R.A., & Papierok B. 1982. Fungi as Biological Control Agents of Arthropods of a Agricultural and Medical Importance. *Parasitology* 84:205-240.
- Hall, R.A. 1983. Synergistic Inhibitory Action of Preparation of Iprodione and Carbaryl on Germination of Conidia of *Verticillium lecanii*. *J. Inv. Pathol.* 42, 384-386.
- Hall, R.A. 1984. Epizootic Potential for Aphids of Different Isolates of the Fungus, *Verticillium lecanii* *Entomophaga* 29(3),311-321.
- Harper, A.M. & Huang, H.C. 1986. Evaluation of the Entomophagous Fungus, *Verticillium lecanii* (Moniliales: Moniliaceae) as a Control Agent for Insects. *Environ. Entomol.* 15: 281-286.
- Harris & Maramorosch. 1980. *Vectors of Plant Pathogens*. Ed. Academic Press, New York. U.S.A. pp. 467.

- Holman, J. 1974. Los áfidos de Cuba. Ed. Organismos. La Habana, Cuba; pp. 304.
- Jackson C.W; Heale, J.B. & Hall R.A. 1985. Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. Annals of Applied Biology. **106**. 39-48.
- Kanagaratnam, P.; Hall, R.A and Burges, H.D. 1982. Control of Glasshouse Whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, by an "aphid" strain of the fungus *Verticillium lecanii*. Ann. Appl. Biol. **100**:213-219.
- Kanaoka, M. Isogai, A., Murakoshi, S. Ichinoe, M., Susuki, A. & Tamura, S. 1978. Agric. Biol. Chem. **42**, 629-635.
- Khalil, S.K ; Shah, M.A and Naeem, M. 1985. Laboratory Studies on the Compatibility of the Entomopathogenic Fungus *Verticillium lecanii* with Certain Pesticides. Agriculture, Ecosystems and Environment **13**: 329-334.
- Khachatourians, G.G. 1992. Virulence of Five *Beauveria* strains, *Paecilomyces farinosus* and *Verticillium lecanii* Against the Migratory Grasshopper, *Melanoplus sanguipes*. J. Inv. Pathol. **59**, 212-214.
- Leatherdale, 1970. Entomophaga **15**, 4119-435.
- Lezama, G.R.; Assam, O.J.; Hernández, A.C. y Garza, G.E. 1988. Detección de Hongos Patógenos de la Garrapata *Boophilus spp.* en Bovinos en el Municipio de Tecoman, Colima. En: XI Reunión de Control Biológico SARH Dirección de Sanidad y Protección Agropecuaria y Forestal, Agosto 15,16 y 17 de 1988. Hermosillo, Son., México.
- Lezama, G.R. 1993. Patogenicidad de Hongos (Hyphomycetes) y del Nemátodo Entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae). Tesis Doctoral. Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
- Lipa, J.J and Slizinki, K. 1973. Wskazówki Metodyczne I Terminologia de Wyznaczania Sredniej Smiertelnej (LD<sub>50</sub>) W. Patologii Owadów I Toksykologii. Prace Naukowe IOR **15**(1):58-83.
- Lipa, J.J. 1975. " An Outline of Insect Pathology". U.S. Dept. Commerce, Natn. Tech. Inform. Serv., Springfield, Virginia.
- Magaña, G.R.; Trujillo, G.H.A ; Garza, G.E y Lezama, G.R. 1989. Patogenicidad in vitro y en campo de *Verticillium spp.* en el Control Microbiológico del Pulgón negro de los Cítricos (*Toxoptera aurantii*). En: XII Reunión Nacional de Control Biológico (Memorias). Torreón Coah. Méx. SARH. p 98-102.

- Mc Clelland, T.B. & Tucker, C.M.** 1929. Agric. notes. Puerto Rico Agric. Exp. Stn. 48, 1-2.
- Mc Millan, R.T.** 1986. Biocontrol of frangipani rust with *Verticillium lecanii*. Proceedings, Florida State Horticultural Society 98, 328-329.
- Metcalf, F.G y Flint.** 1977. Insectos Destructivos e Insectos Utiles, sus Costumbres y su Control. 4a.ed. Ed. Continental S.A. México. 1208 págs.
- Mier, T.; Rivera, F.; Bermudez, J.C.; Domínguez, Y.; Benavides, C. y Ulloa, M.** 1991. Primer Reporte en México del Aislamiento de *Verticillium lecanii* a Partir de la Mosquita Blanca y Pruebas de Patogenicidad In Vitro Sobre Este Insecto. Rev. Méx. Mic. 7: 149-156.
- Milner, R.J. and Lutton, G.** 1986. Dependence of *Verticillium lecanii* (Fungi:Hyphomycetes) on High Humidities for Infection and Sporulation Using *Myzus persicae* (Homoptera:Aphididae) as Host. Environ. Entomol. 15: 380-382.
- Morón, M.A y Terrón, A.R.** 1988. Entomología Práctica. Instituto de Ecología A.C. México, D.F 504 págs.
- Neuzilova, A.** 1957. Univ. Carol. 3, 7-29.
- Olmert, I.; Kennet, R.** 1974. Sensitivity of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana*, *V. lecanii* and *Verticillium spp.* to fungicides and insecticides. Environ. Entomol. 3:33-38.
- Osborne, L.S & Landa, Z.** 1992. Biological Control of Whiteflies with Entomopatogenic Fungi. Florida Entomologist 75(4).
- Pacheco, M.F.** 1985. Plagas de los Cultivos Agrícolas en Sonora y Baja California. Libro técnico No.1. CIANO-SARH. Méx. pág.227.
- Peña, M.R y Remaudiere, G.** 1985. Los áfidos (Homoptera: Aphididae) de importancia agrícola en México. En Memoria II, Octavo Congreso Nacional de Zoología, Saltillo Coah., pág.1085-156.
- Peña, M.R.** 1991. Manual de Identificación de Afidos de Importancia Agrícola. Laboratorio de Entomología ENCB- IPN.
- Peña, M.R.** 1993. Afidos de importancia Agrícola en México. "Aspectos de la Biología y Control Biológico de Afidos". ENCB-IPN. pp 181.
- Petch, T.** 1925. Studies in entomogenous Fungi: *Cephalosporium* and Associated Fungi. Transactions of the British Mycological Society 10, 152-182.

- Petch, T. 1948. Trans. Br. mycol. Soc. 31, 286-304.
- Ramoska, W.A. & Tood, T. 1985. Variation in efficacy and viability of *Beauveria bassiana* in the Chinch Bug (Hemiptera: Lygaeidae) as a result of feeding Activity on Selected Host Plants. Environ. Entomol. 14:146-148.
- Rebollar, A.A. 1993. Evaluación In Vitro del Efecto de Fungicidas Sobre el Hongo Entomopatógeno *Verticillium lecanii* (Zimm) Viégas. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo.
- Remaudière, G. y Latgé, J.P. 1985. Importancia de los Hongos patógenos de Insectos (especialmente Aphididae y Cercopidae) en Méjico y perspectivas de uso. Bol. Serv. Plagas, 11:217-225.
- Remaudieré, G.A. 1985. Contribution al 'Ecologie Desaphides Africans. Cahiers. Techniques de la FAO. No. 64. pp.41.
- Roberts, D.W. 1981. Toxins of the Fungi Entomopathogens. In: Microbial Control of Pests and Plant Diseases. Edited by H.D Burges. Ed. Academic Press, England. pp 949.
- Roberts, D.W. 1989. World Picture of Biological Control of Insect by Fungi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Vol.84-100.
- Rombach, M.C. 1988. Entomogenous Hyphomycetes for Insect and Mite Control in Greenhouse Crops. Biocontrol News and Information. Vol. 9 No. 1.
- Samson, R.A., 1981. Identification : Entomopathogenic Deuteromycetes. In: Microbial Control of Pests and Plant Diseases. Edited by H.D. Burges. Academic Press, Londres, pp 949.
- Samsináková, A. & Kálalová, S. 1975. Artificial Infection of Scale Insect With Entomophagous Fungi *Verticillium lecanii* and *Aspergillus candidus*. Entomophaga. 20(4):361-364.
- Samsináková, A. & Kálalová, S. 1976. Entomophaga 20 361-364. SARH, 1992. Guía Fitosanitaria para el Cultivo del Trigo Serie de Sanidad Vegetal, Sistema Producto Trigo. Julio 1992. México. 53 págs.
- Silva, R.C y Mier, T. 1993. Efecto de plaguicidas químicos sobre *Verticillium lecanii* (Zimm) Viégas. Resultados preliminares. En: XVI Congreso Nacional de Control Biológico. SMCB. Fact. de Ciencias Biológicas UANL. Monterrey N.L. pág 104.
- Spencer, D.H & Alkey, P.T. 1980. Parasitic Effects of *Verticillium lecanii* on two Rust Fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 77:535-542.

- St. Leger, R.J.; Hajek, A.E. Staples, R.C. & Roberts, D.W. 1992. Fungi for the Biocontrol of Insects: Tools and Trends. In Molecular Biology of Filamentous Fungi Tudzyrski, P. and Stahl V. eds.VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, FRG.
- Vazquez, N. 1993. Elaboración de un Documento de Referencia para el Monitoreo de Resistencia a Plaguicidas en Artrópodos Mediante Bioensayo. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados.CENA. Montecillo, México. 187 págs.
- Vehrs, S.L & Parrella, M.P. 1991. Aphid Problems Increase on Ornamentals. California Agriculture, Vol. 45, No.1.
- Vera, V. 1988. Observaciones Biológicas de *Diuraphis noxia* y *D.mexicana* (Homoptera:Aphididae) en su Hospedero Silvestre *Bromus* (Gramínea) en México,D.F. Tesis Profesional. ENEP Iztacala, UNAM.México. 65 págs.
- Viégas, A.B. 1939. Rev. Inst. Café Estado S. paulo. 14, 754-772.
- Wilding, N. 1972. The Effect of Systemic Fungicides on the Aphid Pathogen, *Cephalosporium aphidicola*. Pl. Pathol. 21, 137-139.
- Yocomi, R.K & Gottwald, T.R. 1988. Virulence of *Verticillium lecanii* Isolates in Aphids Determined by Detached- Bioassay. J. Inv. Pathol. 51:250-258.

**Falta página**

**N° 52**

## 8. APÉNDICE A

### **Método de Montaje de Áfidos para Preparaciones Microscópicas.**

A partir del material conservado en etanol al 80% se sugiere el siguiente procedimiento:

Los áfidos se colocan en cápsulas de porcelana y se observan con la ayuda de un microscopio estereoscópico, observando el abdomen de cada espécimen se pica con ayuda de una aguja fina, para favorecer la penetración de los agentes químicos, enseguida son tratados en frío colocándolos en una solución de potasa (KOH), al 40% (400 gramos de KOH, disueltos en un litro de agua destilada), durante 90 a 120 min., para material fresco (menos de dos meses en alcohol) ó bien durante tres o cuatro horas en la potasa para material mantenido en alcohol de seis meses a dos años; los áfidos se lavan tres veces en agua destilada ( media hora mínimo por cada cambio), después se colocan en un baño de cloralfenol ( hidrato de cloral + fenol 1:1 ) durante 24 a 48 hrs. y finalmente se montan en el medio de Berlese (goma arábica 60g + hidrato de cloral 100g + glicerina 30 ml + ácido acético glacial 10 ml + agua destilada 100 ml.).

Para efecto de identificaciones rutinarias rápidas, éste procedimiento puede acelerarse utilizando alguna fuente de calor, colocando los especímenes directamente en el cloralfenol en pequeños viales y en baño maría durante 5 minutos, los áfidos podrán entonces examinarse al microscopio y proceder a su identificación utilizando la clave; sin embargo, en general este material no puede conservarse de manera permanente en preparaciones microscópicas, pues al cabo de cierto tiempo sufre cristalización.

## **APÉNDICE B**

### **Microcultivos en Portaobjetos**

El objetivo de los microcultivos, es con el fin de manejar una técnica sencilla para el aislamiento de algunos hongos entomopatógenos para su identificación.

Se coloca un bloque de agar de un centímetro cuadrado de medio de cultivo, sobre la superficie de un portaobjetos estéril.

-Se inocula con una pequeña cantidad de la colonia del hongo, que se desee identificar.

-Calentar suavemente un cubreobjetos estéril pasándolo rápidamente a través de la flama y colocarlo sobre el bloque de agar.

-Colocar el portaobjetos en una caja Petri sobre varillas de vidrio. Agregar agua estéril con glicerol al 10% para mantener húmeda la cámara.

-Tapar la placa e incubar a temperatura ambiente o a 26°C y 30°C durante 3 ó 5 días.

-Ya que hubo crecimiento, se retira el cubreobjeto, en cuya superficie quedan adheridos porciones del micelio.

- Colocar un cubre o un portaobjetos y una gota de lactofenol o azul de algodón.

-Los montajes se preservan sellando los bordes del cubreobjetos con barniz de uñas transparente.

## APÉNDICE C

### BIOENSAYOS.

La definición de bioensayo está influenciada por el campo del conocimiento al que se dedica quién hace la definición; algunos autores, se refieren a él como ensayo biológico y lo definen como la medición de la potencia de cualquier estímulo, ya sea físico, químico, biológico, fisiológico o psicológico, por medio de reacciones que produce sobre la materia viva.

Otros autores definen al bioensayo como un conjunto de procedimientos en el que se determina la cantidad o fuerza de un agente o estímulo mediante la respuesta de un sujeto.

Banki(1970) lo señala como un procedimiento experimental, en el que pretende determinar la efectividad biológica de un plaguicida. Por su parte Busvine(1971) menciona que el término también cubre todos los experimentos donde la potencia de un insecticida se mide con referencia a una colonia estandarizada de insectos, además señala que el término también cubre aquellos casos en los que el insecto se usa como una herramienta para medir pequeñas cantidades de insecticida, sobre un substrato dado.

Existen básicamente dos tipos de bioensayo: Bioensayos Directos e Indirectos.

Bioensayo Directo.- este tipo de bioensayo involucra la medición de una cantidad exacta del tóxico a probar, el cuál produce un nivel determinado de intoxicación en un individuo, en éste tipo de respuesta la variable de interés es la dosis.

Bioensayo Indirecto.- Se administra a un grupo de organismos dosis estándar, registrando las respuestas obtenidas en cada caso. En estos ensayos interesa el número de respuestas en cada nivel de dosis. En los bioensayos indirectos la respuesta puede ser de dos tipos : cuantitativa (susceptible de medición) o cualitativa ( respuesta de todo o nada). De una manera simple el ensayo cualitativo es el más utilizado en toxicología, involucra la

determinación de la relación de la dosis y el porcentaje de respuesta (Finney, 1971; Hubert, 1980).

En el caso particular de éste trabajo los bioensayos realizados, fueron del tipo indirecto; ya que dado el modo de aplicación, no hablamos de dosis si no de concentraciones. Puesto que no tenemos la seguridad de que a todos los organismos se les adhiera la misma cantidad de conidios de *Verticillium lecanii*, por tal motivo se toman concentraciones de referencia que nos den una idea aproximada del rango en el que vamos a tener una determinada mortalidad en los individuos.

## APENDICE D

### Análisis Probit.

La serie de técnicas agrupadas, en lo que se conoce como Análisis Probit, han tenido mucho auge en estos últimos años, sobre todo en los trabajos experimentales de las áreas de ciencias biológicas, por tal motivo se han desarrollado programas de computo que facilitan el procesamiento de los datos.

Los parámetros principales obtenidos del Probit son: El estimador medio  $DL_{50}$  ó  $CL_{50}$ , los límites fiduciales (Superior e inferior), el valor de ji cuadrada y la pendiente de regresión.

Al probar a *Verticillium lecanii*, contra los áfidos, se expusieron a concentraciones determinadas del patógeno, desconociéndose la cantidad exacta que cubre a cada insecto. Por tal motivo no se habla  $DL_{50}$ , sino más bien de  $CL_{50}$  (concentraciones letales medias).

La importancia de los estimadores medios en el análisis Probit radica en sus límites fiduciales, que representan el intervalo del estimador, a un nivel de probabilidad determinado (generalmente 95% ó 99%), entre más estrecho sea este intervalo, más preciso y confiable es el estimador.

Adicional a esto existen otros dos parámetros importantes en este análisis: La ji-cuadrada y la pendiente. El valor de ji-cuadrada, refleja la similitud entre los datos obtenidos del bioensayo y los representados por la línea o teóricos. Un valor mínimo de la ji-cuadrada expresa una máxima similitud.

El valor de la pendiente de la línea de regresión  $Y = a + bx$  (donde Y es el valor probit, a es la ordenada al origen, b la pendiente de la línea de regresión y x el logaritmo de las dosis), nos refleja la adecuación de la serie de concentraciones probadas y la magnitud del efecto de la variable independiente (Log dosis).

Para considerar un bioensayo como válido se deben de tomar en cuenta los siguientes requisitos:

- 1.- El valor de la pendiente de la línea de regresión debe ser de 1.5 a 6.
- 2.- La ji-cuadrada deberá ser menor de 5.
- 3.- La división entre el límite fiducial mayor y el menor debe ser menor de 2.
- 4.- La mortalidad natural en el testigo no debe exceder al 10%
- 5.- La  $CL_{50}$  estimada deberá ubicarse por lo menos dos valores abajo de la dosis probada más alta y dos valores arriba de la más baja.
- 6.- La distribución de la mortalidad deberá encontrarse entre un 90 a un 10% dentro de cuatro de las dosis probadas.
- 7.- Deberán realizarse un mínimo de tres repeticiones válidas; es decir que cumplan con todos los puntos anteriores, para considerar como válida una  $CL_{50}$ .

## APENDICE E

### VENTANA DE RESPUESTA BIOLÓGICA DE TRES ESPECIES DE AFIDOS.

#### 1.-*Diuraphis noxia* (Mordviko).

##### A) Probando *Verticillium lecanii* propagado en SDA.

Concentración	Tot. Org.	Mort. Tot	% Mortalidad
1.0	20	20	100
0.1	20	18	94.45
0.01	20	16	94.11
0.001	20	12	80
0.0001	20	13	65
0.00001	20	7	46.6
0.000001	20	3	20

##### B) Probando *Verticillium lecanii* propagado en arroz.

Concentración	Tot. Org.	Mort. Tot.	% Mortalidad
1.0	20	20	100
0.1	20	19	95
0.01	20	17	85
0.001	20	14	70
0.0001	20	10	50
0.00001	20	6	30
0.000001	20	1	5

## 2.-*Brevicoryne brassicae*.(Linneo)

A) Probando *Verticillium lecanii* propagado en SDA.

Concentración	Tot. Org.	Mort. Tot.	% Mortalidad
1.0	20	19	95
0.1	20	18	90
0.01	20	16	80
0.001	20	13	65
0.0001	20	9	45
0.00001	20	5	25
0.000001	20	2	10

B) Probando *V. lecanii*, propagado en substrato sólido.

Concentración	Tot. Org.	Mort. Tot.	% Mortalidad
1.0	20	19	95
0.1	20	18	90
0.01	20	15	75
0.001	20	13	65
0.0001	20	10	50
0.00001	20	4	20
0.000001	20	1	5

### 3.- *Myzus persicae*. (Sulzer)

A) Probando *Verticillium lecanii* propagado en SDA.

Concentración	Tot. Org	Mort. Tot.	% Mortalidad
1.0	20	17	85
0.1	20	16	80
0.01	20	15	75
0.001	20	12	60
0.0001	20	8	40
0.00001	20	5	25
0.000001	20	3	15

B) Probando *V. lecanii* propagado en substrato sólido.

Concentración	Tot. Org.	Mort.Tot	% Mortalidad
1.0	20	15	75
0.1	20	13	65
0.01	20	11	55
0.001	20	10	50
0.0001	20	8	40
0.00001	20	4	20
0.000001	20	2	10

## APENDICE F

Análisis de varianza de los valores de  $CL_{50}$  de *D. noxia*, *B. brassicae* y *M. persicae* (Factor A) contra los dos substratos de propagación de *Verticillium lecanii* (Factor B).

Fuente variación	G.L	Suma Cuad.	Cuad. Med.	Fo.	F <sup>0.05</sup> tablas
Tratamiento	5	1.008			
Factor A	2	0.404	0.202	1.009	F <sub>2,12</sub> =3.88
Factor B	1	0.201	0.201	1.003	F <sub>1,12</sub> =4.75
Interacción AB	2	0.402	0.201	1.003	F <sub>2,12</sub> =3.88
Error	12	2.406	0.200		
Total	17	3.415			

Análisis de varianza de los valores de las pendientes comparando los factores A y B señalados en el cuadro anterior.

Fuente variación	G.L	Suma Cuad.	Cuad. Med.	Fo	F <sup>0.05</sup> tablas
Tratamiento	5	0.151			
Factor A	2	0.085	0.042	2.321	F <sub>2,12</sub> =3.88
Factor B	1	0.040	0.040	2.189	F <sub>1,12</sub> =4.75
Interacción AB	2	0.025	0.012	0.701	F <sub>2,12</sub> =3.88
Error	12	0.221	0.018		
Total	17	0.372			

## Continuación APENDICE F.

Análisis de Varianza del Porcentaje de Mortalidad Acumulado, para *D. noxia*, *B. brassicae* y *M. persicae* (Factor A) asperjados con *V. lecanii* propagados en sustrato sólido (Arroz) y en sustrato semisólido (Factor B).

Fuente variación	G.L	Suma Cuad.	Cuad. Med.	Fo	F <sup>0.05</sup> tablas
Tratamiento	5	13178.02			
Factor A	2	12832.78	6416.39	24.275	F <sub>2,42</sub> =3.22
Factor B	1	116.656	116.65	0.441	F <sub>1,42</sub> =4.07
Interacción AB	2	228.57	114.28	0.432	F <sub>2,42</sub> =3.22
Error	42	11101.13	264.31		
Total	47	24279.15			

Análisis de Varianza del Porcentaje de Mortalidad Acumulada de *D. noxia*, *B. brassicae* y *M. persicae* asperjadas con *V. lecanii* en condiciones de invernadero.

Fuente variación	G.L	Suma Cuad.	Cuad. Med.	Fo	F <sub>2,12</sub> tablas
Tratamiento	2	263.33	131.66	4.67	3.88
Error	12	338	28.16		
Total	14	601.33			