

UNIVERSIDAD DE SONORA
DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA Y GANADERIA

**SELECCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL
CONTROL DEL PIOJO HARINOSO DE LA VID *Planococcus ficus*
(Signoret)**

T E S I S
MAESTRIA EN CIENCIAS

GASPAR ESPINOZA JOCOBI

DICIEMBRE DEL 2009

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

**SELECCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DEL
PIOJO HARINOSO DE LA VID *Planococcus ficus* (Signoret)**

TESIS

Sometida a la consideración del
Departamento de Agricultura y Ganadería

de la

Universidad de Sonora

Por

Gaspar Espinoza Jacobi

Como requisito parcial para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Horticultura

Diciembre de 2009

Esta tesis fue realizada bajo la Dirección del Consejo Particular aprobada y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

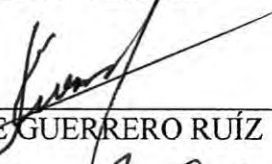
CONSEJO PARTICULAR:

DIRECTOR:



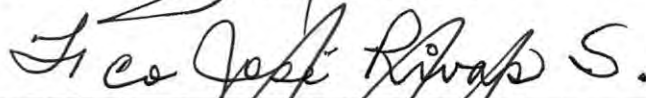
DR. ALI JESÚS ASAFF TORRES

ASESOR:



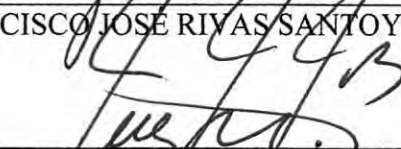
DR. JOSÉ COSME GUERRERO RUÍZ

ASESOR:



DR. FRANCISCO JOSÉ RIVAS SANTOYO

SUPLENTE:



M.C. JOSÉ JESÚS JUVERA BRACAMONTES

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de maestría dentro de su programa, muy en especial al Dr. José Cosme Guerrero Ruíz por haberme invitado a formar parte de este interesante programa, agradezco al coordinador de la maestría, Dr. Francisco José Rivas Santoyo por su excelente apoyo y confianza en el transcurso de estos años, así como al jefe del Departamento de Agricultura y Ganadería de la UNISON M.C José Jesús Juvera Bracamontes. Agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, AC) por ofrecerme la oportunidad de realizar este trabajo experimental dentro de sus instalaciones, agradezco al proyecto FOMIX SON-2005-C01-22742 por los cuatro meses de beca que recibí y en especial a mi asesor de tesis el Dr. Ali Asaff Torres por su valioso apoyo e interés en este trabajo. Agradezco a todas aquellas personas que de un modo u otro se involucró en la revisión del escrito (en especial Yolanda y Ángel). Agradezco sobre todo y de una manera indescriptible a quien me ha soportado todo este tiempo, mi esposa Susana Marlene Barrales Heredia (DMY). Gracias a todos.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a todas las personas capaces de leerlo de principio a fin, sobre todo a los que en realidad creen y están conscientes que un cambio de estrategia es importante en cualquier sistema por completo e infalible que parezca.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
INDICE DE TABLAS	VIII
INDICE DE FIGURAS	IX
RESUMEN	XI
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	4
OBJETIVOS	4
ANTECEDENTES	5
Importancia de la Vid	5
Generalidades	5
Producción de uva a nivel nacional	5
Generalidades del piojo harinoso	7
Clasificación taxonómica de <i>Planococcus</i>	8
Distribución geográfica de <i>P. ficus</i>	9
Ciclo de vida de <i>P. ficus</i>	9
Hábitos y daños de <i>P. ficus</i>	9
Control de <i>P. ficus</i>	10
Control cultural	11
Control químico	12
Control biológico	15
Generalidades de los hongos entomopatógenos	17
Clasificación taxonómica	17
Mecanismo patogénico	17
Características de la especie <i>Isaria fumosorosea</i> (Wize) Brown & Smith	18
Características de la especie <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin	19

Características de la especie <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Localización	21
Selección del hospedero	21
Evaluación de hojas de vid como hospedero de <i>P. ficus</i>	21
Evaluación de plantas de vid con follaje como hospedero de <i>P. ficus</i>	23
Evaluación de plantas de vid sin follaje como hospedero de <i>P. ficus</i>	23
Evaluación de papas germinadas como hospedero de <i>P. ficus</i>	24
Recolección de <i>P. ficus</i> en campo	25
Bioensayos	25
Cepas utilizadas	25
Producción de los hongos	26
Preparación del material biológico para los bioensayos	26
Suspensión de esporas	26
Conteo de esporas	26
Pruebas de viabilidad	26
Pruebas de dosis simple	27
Pruebas de dosis respuesta; determinación de la concentración letal media (CL ₅₀)	28
Análisis de resultados	28
Confirmación de patogenicidad (emergencia de los insectos micosados)	28
Pruebas de patogenicidad de <i>Penicillium sp</i> sobre <i>Tenebrio mollitor</i> (Linnaeus) y <i>Galleria mellonella</i> (Linnaeus)	29
Corrección de la mortalidad (Fórmula de Abbot)	29
Análisis estadísticos	30
Transformación angular de datos	30
Pruebas de dosis simple	30
Pruebas de dosis respuesta	30

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
Establecimiento del pie de cría de <i>P. ficus</i> : efecto del hospedero	31
Hojas de vid	31
Plantas de vid con follaje	32
Plantas de vid sin follaje	33
Papas germinadas	34
Pruebas de dosis simple sobre hembras adultas de <i>P. ficus</i>	36
Pruebas de dosis simple sobre caminantes de <i>P. ficus</i>	40
Pruebas de dosis-respuesta: Concentración letal media y noventa (CL ₅₀ y CL ₉₀) de <i>M. anisopliae</i> y <i>Penicillium</i> sp. sobre <i>P. ficus</i>	43
CONCLUSIONES	47
ANEXO	48
Aislamiento de <i>Penicillium</i> sp.	48
Caracterización morfológica de la cepa	49
Pruebas confirmatorias de patogenicidad	50
BIBLIOGRAFÍA	52

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Composición del medio nutritivo para el mantenimiento las hojas de vid	22
Solución nutritiva para germinación de esporas	27
Concentración letal media cincuenta y noventa (CL ₅₀ y CL ₉₀) de <i>Metarhizium anisopliae</i> y <i>Penicillium</i> sp. sobre el piojo harinoso de la vid (<i>P. ficus</i>)	44

INDICE DE FIGURAS

	Página
Presencia del hongo <i>Capnodium</i> sp. en plantas de vid	10
Hojas de vid infestadas con <i>P. ficus</i>	22
Hojas de vid infestadas con <i>P. ficus</i> y cubiertas con papel aluminio	22
Plantas de vid de 90 días	23
Infestación de plantas de vid con <i>P. ficus</i>	23
Plantas de vid sin follaje infestadas con <i>P. ficus</i> y cubiertas con papel estraza	24
Papas germinadas infestadas con <i>P. ficus</i>	24
Recolección de <i>P. ficus</i> en viñedos de Hermosillo	25
Hojas de vid con pecíolo sumergido en solución nutritiva mostrando clorosis y necrosis	32
Plántulas de vid con follaje mostrando tallo y hojas infestadas con hembras adultas de <i>P. ficus</i>	33
Plántulas de vid sin follaje infestadas con hembras adultas de <i>P. ficus</i> y cubiertas con papel estraza	34
Papas germinadas infestadas con <i>P. ficus</i>	35

Mortalidad corregida de hembras adultas de <i>P. ficus</i> provocada por diferentes cepas de hongos entomopatógenos utilizando dosis simple del orden de 1×10^7 esporas/ml	37
Susceptibilidad de caminantes (segundo instar) de <i>P. ficus</i> a diferentes cepas de hongos entomopatógenos utilizando dosis simple del orden de 1×10^7 esporas/ml	40
Nuevo aislado de hongo creciendo sobre agar PDA	48
Conidios del nuevo aislado fúngico	49
Conidios del <i>M. anisopliae</i> cepa MaAB	49
Estructuras reproductivas del nuevo aislado fúngico	50
Estructuras del nuevo aislado mostrando métulas, fiálides y conidios	50
Estructuras reproductivas características del género <i>Penicillium</i>	50
Larvas de <i>Tenebrio molitor</i> micosadas por <i>Penicillium</i> spp.	51

RESUMEN

En este trabajo se evaluó el potencial entomopatogénico de seis cepas de hongos sobre hembras adultas y caminantes del piojo harinoso de la vid *Planococcus ficus* Signoret: tres de *Isaria fumosorosea* (PfrAB, Pfr13 y Pfr43), una de *Beauveria bassiana* (BbAB), una de *Metarhizium anisopliae* (MaAB) y una cepa nativa de *Penicillium sp.* (Pesp), reaislada de adultos de *P. ficus* colectados en campo. En un tamizaje primario se usó un ensayo de dosis simple sobre hembras adultas y caminantes (segundo instar), administrando dosis de 1×10^7 conidios mL^{-1} de cada cepa, suspendidas en tween 80 al 0.0005%. La cepa que presentó mayor patogenicidad en adultos fue MaAB, con 39.76% de mortalidad, y fue seguida por la cepa nativa Pfr43 de *I. fumosorosea* con 19.5% de mortalidad. Los testigos presentaron 7% de mortalidad. En caminantes, todas las cepas provocaron un porcentaje elevado de mortalidad, siendo las cepas Pesp, PfrAB, Pfr43 y MaAB las que presentaron el más alto, con un promedio del 60%. También se estimaron las concentraciones letales 50 y 90 para las cepas con mayor patogenicidad, MaAB y Pesp. La CL_{50} para *M. anisopliae* fue de 1.89×10^7 esporas mL^{-1} y su CL_{90} de 2.82×10^{10} esporas mL^{-1} , mientras que para Pesp la CL_{50} fue de 6.67×10^8 esporas mL^{-1} y la CL_{90} fue de 1.13×10^{15} esporas mL^{-1} .

Se concluyó que los estadios juveniles de *P. ficus* son mucho más susceptibles que los estadios adultos al ataque de hongos entomopatógenos, siendo *Metarhizium anisopliae* la especie más virulenta contra el insecto, capaz de atacarlo en cualquiera de sus etapas de desarrollo.

ABSTRACT

In this work, entomopathogenic potential of six fungal strains on the vine mealybug *Planococcus ficus* Signoret was evaluated. Insects of the second instar and female adults developed on germinated potatoes were asperged with conidial suspensions (in Tween 80, 0.0005% v/v) of *Isaria fumosorosea* (PfrAB, Pfr13 and Pfr43 strains), *Beauveria bassiana* (BbAB strain), *Metarhizium anisopliae* (MaAB strain) and a native strain of *Penicillium sp.* (Pesp), reisolated from adults of *P. ficus* collected in the field. In a primary screening, a single dose test (1×10^7 conidia mL^{-1}) was employed. The treatment with the MaAB strain promoted the highest mortality on adults (39.76%), followed by the treatment with the Pfr43 strain (19.5%). The other strains had negligible effects on the insects and were similar to the control (7%). High mortalities were observed in second instar insects treated with conidial suspensions. Pesp, PfrAB, Pfr43 and MaAB strains promoted around 60% mortality, since control only 4%. Also lethal concentrations 50 and 90 for strains MaAB and Pesp were estimated. The LC_{50} for *M. anisopliae* was 1.89×10^7 spores mL^{-1} and CL_{90} of 2.82×10^{10} spores mL^{-1} , whereas Pesp LC_{50} was 6.67×10^8 spores mL^{-1} and the CL_{90} was 1.13×10^{15} spores mL^{-1} .

We concluded that juvenile instars are more susceptible to fungal attack than adult insects, being *Metarhizium anisopliae* the most virulent strain able to infect, both juvenile and adult stages of *P. ficus*.

INTRODUCCIÓN

El piojo harinoso de la Vid (*Planococcus ficus* Signoret) es un insecto hemíptero chupador polífago que presenta una amplia distribución geográfica en las principales zonas vitícolas del mundo: Europa, Asia, Sudáfrica y Estados Unidos (Becerra *et al.*, 2006) y actualmente también se encuentra en Sonora causando grandes pérdidas económicas en cultivos de vid (Fu-Castillo *et al.*, 2001). El principal daño causado por el insecto es la contaminación de los racimos con masas blancas algodonosas, ovisacos, piojos y mielecilla, reduciendo considerablemente la calidad de la fruta (Godfrey *et al.*, 2002). La presencia del insecto en racimos es causa de rechazo de la fruta cuando se comercializa en mercados de exportación (González, 1983; Prado *et al.*, 2000). Una vez que el insecto se establece uniformemente en un viñedo es muy difícil de erradicar y su control requiere repetidas y costosas aplicaciones de insecticidas (Malakar-Kuenen *et al.*, 2001).

La filosofía del control químico de plagas es alcanzar el mayor ataque y porcentaje de mortalidad, siendo la principal manera de medir la eficacia de los nuevos productos químicos en el laboratorio. Sin embargo, la elevada toxicidad de estos productos, combinada con su uso indiscriminado, ocasionan por una parte, que se afecte seriamente a las poblaciones de los depredadores naturales de insectos plaga y por otra, promueven la selección de insectos resistentes, siendo necesario el uso de productos cada vez más tóxicos y/o un mayor número de aplicaciones (Ripa y Caltagirone, 1994).

El manejo integrado de plagas (MIP) ó Producción Integrada (PI) parece ser la forma más racional de luchar contra insectos plaga. Éstas prácticas consisten en la combinación e integración de todas las técnicas disponibles para aplicarlas en forma armoniosa

en un componente fundamental de las iniciativas de la agricultura sostenible (Cruz, 2000). Entre las técnicas disponibles en el MIP se encuentran el control químico, biológico, cultural, botánico y resistencia varietal.

El control biológico se vislumbra como una de las estrategias más prometedoras dentro del marco del MIP que afectan la producción de los cultivos (Zavaleta-Mejía, 1999). El control biológico es la manipulación intencional de las poblaciones de los enemigos naturales de los insectos plaga para limitar su población. A estos organismos se les llama agentes de control y entre ellos se encuentran insectos depredadores y parásitos, así como microorganismos patógenos de insectos (Asaff *et al.*, 2002). La capacidad que presentan algunos microorganismos para “matar insectos plaga” se denomina patogenicidad, siendo la virulencia una medida cuantitativa de la misma y que está determinada por las características genéticas del individuo (Burges, 1998).

Los primeros microorganismos que se encontraron causando enfermedades en insectos fueron los hongos debido a su crecimiento macroscópico característico sobre la superficie de sus hospederos. Sin embargo, algunos hongos entomopatógenos presentan escaso o nulo crecimiento superficial. La mayoría son patógenos obligados o facultativos y algunos son simbióticos. Su crecimiento y desarrollo están limitados principalmente por las condiciones ambientales externas, particularmente humedad elevada y temperatura adecuada para la esporulación y germinación de esporas. Las enfermedades causadas por estos hongos son denominadas “micosis” (Tanada y Kaya, 1993).

A diferencia de otros agentes entomopatógenos, los cuales deben ser ingeridos para invadir al hospedero, los hongos generalmente penetran en el insecto a través de su cutícula externa, actuando como insecticidas de contacto. Debido a esto, los hongos

entomopatógenos son los únicos microorganismos capaces de infectar insectos chupadores, y aunque se han venido utilizando con éxito en otras plagas como mosquita blanca, para el control del piojo harinoso solo había antecedentes de que podían ser una opción de control.

Amaya (2006) evaluó varios productos comerciales a base de hongos entomopatógenos en el control del piojo harinoso de la vid, específicamente *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea*. En general, observó que las poblaciones del insecto se mantuvieron en bajos niveles con respecto al testigo, el cual presentó un aumento considerable en la población de insectos, pese a incluir un tratamiento sistémico con imidacloprid; sin embargo, no se logró obtener un reaislado de hongos a partir de los insectos muertos, por lo tanto, no se pudo determinar con certeza que cepa fue la que causó esta mortalidad o si se debió a otros factores incluyendo el vehículo de aplicación (tween) o surfactante. De ahí la importancia de identificar y seleccionar una cepa o cepas de hongos entomopatógenos que ocasionen la mayor mortalidad del insecto y poder utilizarlos como una alternativa eficiente para el control del piojo harinoso de la vid.

HIPÓTESIS

Existen géneros y especies de hongos entomopatógenos con virulencia variable sobre el piojo harinoso de la vid (*Planococcus ficus*).

OBJETIVO GENERAL

Seleccionar la cepa con mayor virulencia para el control del piojo harinoso de la vid.

Objetivos específicos

- 1) Establecer el pie de cría de piojo harinoso requerida para los bioensayos a nivel laboratorio.
- 2) Seleccionar la metodología adecuada para los bioensayos con *P. ficus*.
- 3) Establecer el estadio de desarrollo del piojo harinoso de la vid más susceptible a hongos entomopatógenos.
- 4) Determinar a nivel laboratorio la virulencia, medida como concentración letal media (CL₅₀), de la cepa con mayor capacidad patogénica sobre diferentes estadios del piojo harinoso de la vid.

ANTECEDENTES

Importancia de la Vid

Generalidades.

La planta de la vid proviene de Asia menor, específicamente del sur del Cáucaso, parte de Rusia, Irán y la India. Los fenicios, antes del 600 a. de C., llevaron a Grecia variedades de uva para elaborar vino, luego las llevaron a Roma y finalmente al sur de Francia. La vid fue traída a América por Cristóbal Colón durante su segundo viaje (en México existían algunas especies silvestres pero no de gran calidad); sin embargo, su cultivo se dio hasta 1524, injertando especies europeas a las especies nativas (Macías, 1993). Los primeros cultivos en México fueron destinados al autoconsumo y la producción de vino con fines eclesiásticos se llevó a cabo hasta 1930, cuando se considera que inició la explotación comercial de la uva en el Valle de Santo Tomás, California. Hoy en día, la producción vinícola se destina al consumo, ya sea como uva de mesa o uva pasa y a la industria para la producción de brandy y vinos de mesa.

Producción de uva a nivel nacional.

De acuerdo con la SAGARPA, las variedades de uva en México son clasificadas de acuerdo a su uso:

- a) Para la industria vitivinícola (brandy y vino de mesa) hay variedades rojas: Pinot Noir, Ruby Cabernet, Petite Sirah, Grenache, Malber, Cabernet Sauvignon, Carignane y Zinfandel; así como variedades blancas: Sauvignon Blanc, Palomino, Chenin Blanc, San Emilión, Pinot Blanc, White Riesling.
- b) Para consumo en fresco: Berlinka, Italia, Rish Baba, Emperador, Exotic, Cardinal, Thompson Seedles, Tokay, Malaga, Flame, Superior, Ribier, Red Malaga, Oliver Blanch, Dattier de Beirut, Black Monukka, Rosa del Perú y Queen.

El cultivo y producción de uva en nuestro país se ubica principalmente en cuatro regiones con épocas de cosecha distintas. Estas regiones se caracterizan principalmente por sus diferencias de clima y suelo, así como el destino que le dan a la producción de sus viñedos.

Baja California: Se considera la región más antigua en el cultivo de la vid y se distingue por la gran superficie de territorio que se dedica a la siembra y su potencial enológico (es la entidad donde se elabora un mayor número de vinos de calidad). Se divide en cuatro valles cercanos a Ensenada, con características propias. Estos son: San Vicente, Santo Tomás, San Antonio de las Minas y Valle de Guadalupe. La cosecha se destina fundamentalmente a la producción de vinos.

Sonora: El cultivo de la uva en esta zona comenzó en la primera mitad de los años sesenta y en la actualidad es la entidad que mayor número de superficies dedica al cultivo de uva de mesa. Las zonas vitícolas de esta región se dividen en dos: la Costa de Hermosillo y Caborca. La uva de uso industrial se destina a la producción de Brandy y la zona de Caborca se caracteriza por su producción de uva pasa.

Zona de la Laguna: Abarca municipios tanto de Durango como de Coahuila. La producción total de la zona se concentra en dos usos, destilación y uva de mesa. Las condiciones del Valle de Parras forman un microclima ideal para el desarrollo de la vid.

Zona central del país: Abarca los estados de Aguascalientes, Zacatecas y Querétaro. Aunque su cultivo es de los más antiguos, remontándose a 1505, su desarrollo ha sido limitado. En pleno corazón de la zona vinícola de San Juan del Río en Querétaro, se

encuentra una de las viticulturas más prósperas del país. Asimismo, Aguascalientes destina la mayoría de su producción a la elaboración de brandy.

Durante los últimos cinco años, en el país se ha venido produciendo una media nacional de 362,688 toneladas de uva, de estas, Sonora contribuye con el 81%; es decir, con 293,777 toneladas, de las cuales 223,271 toneladas corresponden a uva de mesa, convirtiéndolo así en líder nacional en producción de uva de mesa (SIAP, 2008).

Generalidades del piojo harinoso.

Planococcus ficus es un hemíptero polífago que presenta una amplia distribución geográfica en las principales zonas vitícolas del mundo: Europa, Asia, Sudáfrica y Estados Unidos (Becerra *et al.*, 2006). El nombre común se debe a que en su tegumento hay glándulas que segregan material pulverulento o algodonoso de color blanco. Este pseudocócido es muy pequeño, la hembra mide de 3 a 4 mm, de color amarillo-anaranjado, aplanada, con el cuerpo blando, segmentado, sin diferenciación entre cabeza, tórax y abdomen. Tiene tres estadios ninfales muy móviles. Las ninfas son de color amarillo, recubiertas con una sustancia blanca que se incrementa conforme avanzan los estadios juveniles. La hembra deposita los huevos protegidos por hilos algodonosos. Los huevos son elipsoidales y amarillos. El macho presenta diferenciación anatómica respecto de la hembra, es alado, carece de aparato bucal y tiene un par de apéndices caudales sedosos y alargados (Granara, 1990).

La presencia de esta plaga en Sonora puede tener un fuerte impacto económico sobre la viticultura regional, debido a pérdidas en producción e incremento de costos de control (Fu-Castillo *et al.*, 2001). El piojo harinoso tiene características que lo convierten en una de las principales plagas de la vid, debido a su hábito de alimentarse de todas las partes de la planta, protegerse debajo de la corteza, y en algunos meses del año se puede encontrar por debajo del suelo en las raíces, lo que dificulta la acción de los insecticidas y

parasitoides (Peacock *et al.*, 2000; Geiger y Daane, 2001). La presencia del insecto en racimos de uva es causa de rechazo de la fruta en los mercados de exportación (González, 1983; Prado *et al.*, 2000). Una vez que el insecto se establece uniformemente en un viñedo es muy difícil de erradicar, y su control necesitará repetidas y costosas aplicaciones de insecticidas químicos (Malakar-Kuennen *et al.*, 2001). También se reporta como vector del virus del enrollado de la hoja de la vid GLRaV-3, por lo que se considera una plaga de importancia económica aún en bajas poblaciones (Walton, 2003; de Borbón *et al.*, 2004).

Clasificación taxonómica de *Planococcus*.

Los piojos harinosos son miembros de la familia Pseudococcidae y se distingue de otros insectos del orden Homóptera, por la presencia de uña simple en las patas. A los individuos de la familia Pseudococcidae se les conoce comúnmente como piojos harinosos, chanchitos blancos o “mealybugs”, porque su cuerpo se encuentra total o parcialmente cubierto de secreciones cerosas blanquecinas con aspecto harinoso y en sus bordes se observan proyecciones filamentosas de cera blanca, que alcanzan su mayor longitud en la parte caudal del cuerpo (González, 2000).

El género *Planococcus* contiene alrededor de 20 especies, la mayoría de las cuales son plagas de importancia económica. La clasificación taxonómica de piojos harinosos relacionados con la vid es la siguiente:

Clase: Insecta

Orden: Homóptera

Suborden: Sternorrhyncha

Superfamilia: Coccoidea

Familia: Pseudococcidae

Género: *Planococcus* (Ferris)

Especies: *P. maritimus*, *P. viburni*, *P. longispinus*, *P. ficus*

Distribución geográfica de *Planococcus ficus*.

El piojo harinoso de la vid (*Planococcus ficus*) se detectó por primera vez en América en el Valle de Coachella en 1991 y posteriormente en el Valle de San Joaquín en 1998 en el estado de California. Posteriormente la plaga se diseminó rápidamente en todas las regiones productoras de vid en California donde ocasionó fuertes daños económicos (Daane *et al.*, 2004).

Ciclo de vida de *Planococcus ficus*.

Las hembras de *P. ficus*, después del apareamiento, desarrollan un ovisaco donde permanecen protegidos un número promedio de 300 huevecillos ovipositados. Entre los 7 y 10 días del ciclo de vida, a una temperatura promedio de 25°C, los caminantes o ninfas de primer instar eclosionan del huevecillo y pasan al segundo y tercer estadio ninfal

En el Centro de Reproducción de Organismos Benéficos en Hermosillo, Sonora se estudió el ciclo de vida de *P. ficus* sobre calabaza butternut. Se encontró que la hembra de *P. ficus* requiere de 45 días para completar el ciclo de huevecillo a huevecillo a una temperatura de 27°C (Fu-castillo *et al.*, 2005).

Hábitos y daños.

El piojo harinoso puede causar daños en uvas industriales a nivel mundial; sin embargo, el mayor impacto lo ocasiona en uva de mesa (Daane y Bentley, 2003). Su acción disminuye el vigor general de la planta, infestando todas las partes aéreas y perjudicando seriamente la calidad de los racimos. Los daños por contaminación de

racimos con mielecilla y colonias de insectos representan las mayores pérdidas económicas. Estos insectos se alimentan del floema excretando grandes cantidades de mielecilla en toda la planta, donde posteriormente se desarrolla el hongo *Capnodium* spp., conocido como fumagina (Fu-Castillo *et al.*, 2005) dificultando de esta manera la fotosíntesis (Figura 1). Por otro lado, la calidad y comercialización de la vid se ve afectada debido a que los insectos vivos y/o muertos son transmisores de virus y junto con las secreciones algodonosas se acumulan en los racimos (González *et al.*, 2001; Godfrey *et al.*, 2002). Es un insecto de difícil control por sus hábitos crípticos, ya que se ubica generalmente en zonas ocultas de la planta: bajo la corteza del tronco, en la cara abaxial de las hojas y en el raquis del racimo.

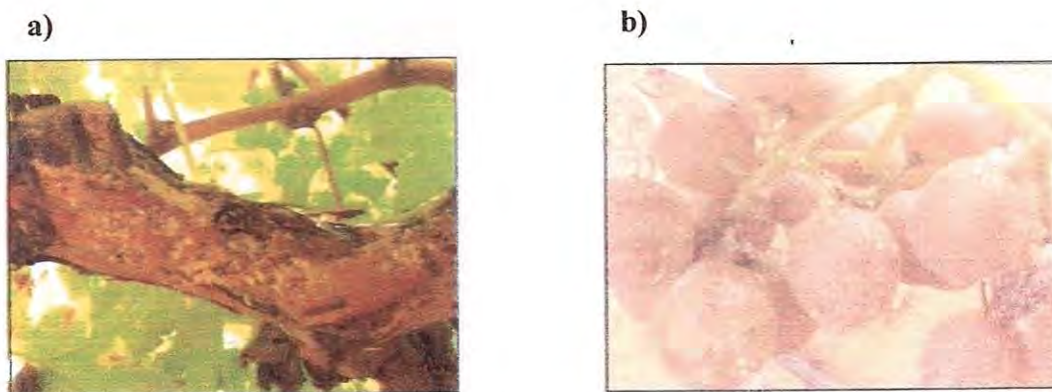


Figura 1. a) Presencia del hongo *Capnodium* spp., **b)** Presencia de mielecilla en racimos.

Altas poblaciones de piojo harinoso provocan fuertes defoliaciones en las plantas, en ocasiones de hasta el 100%, causando el rebrote de las mismas durante el otoño, lo cual agota las reservas de nutrientes, originando más del 50% de reducción en la fructificación de las yemas, lo que afecta los rendimientos del siguiente año (Martínez, 2002).

Control de *P. ficus*.

El combate del piojo harinoso en la vid debe contemplar una integración de medidas de control, ya que la dependencia exclusiva del control químico puede tener fallas y

provocar efectos colaterales como eliminación de fauna benéfica, explosión de plagas secundarias, residuos de plaguicidas en frutos, desarrollo de resistencia y contaminación ambiental (Fu-Castillo *et al.*, 2005).

Control cultural.

Esta práctica consiste en todas las labores de manejo del cultivo, tendientes a reducir las altas poblaciones de piojo harinoso. Este tipo de control retrasa la diseminación del insecto en el viñedo y/o región. Entre las acciones más importantes se encuentran:

1. Eliminar la totalidad de los racimos que permanezcan después de la cosecha.
2. Combate de maleza.
3. Eliminar la corteza para aumentar la eficiencia del control químico, cuando las poblaciones son altas.
4. Al movilizarse de un cuadro infestado a otro no infestado, se deberán eliminar residuos de vegetales como hojas, ramas, etc. y aplicar soluciones de cloro sobre todos a los equipos de cosecha como lo son tijeras, cajas de plástico.
5. Prohibir la introducción de tijeras de poda a personal externo.
6. Destrucción inmediata de todo el material podado.
7. Cosechar manualmente los racimos en viñedos industriales infestados. Las cosechadoras mecánicas diseminan el piojo harinoso de la vid.
8. Limpiar la plataforma de los vehículos de transporte de material vegetativo en uvas de mesa, una vez que la fruta es empacada, debe ir directamente al cuarto frío, evitando recoger fruta en sitios intermedios. Una vez descargados los camiones en los cuartos fríos se recomienda volver a limpiar la plataforma del vehículo, antes de retornar a otro viñedo.
9. Destrucción de viñedos en los que por cualquier causa no reciban atención fitosanitaria.

Al utilizar maquinaria, es importante evitar laboreo, por ejemplo rastreos en áreas de viñedos infestados, ya que el insecto puede ser diseminado a través del suelo infestado. Si se realizan prácticas de laboreo en el viñedo, se recomienda iniciar en cuadros no infestados, para evitar diseminación de la plaga en todo el viñedo, práctica que confinará al insecto en áreas aisladas (Peacock, *et al.*, 2000; Fu-Castillo *et al.*, 2002).

Control químico.

Los piojos harinosos son plagas difíciles de controlar, por sus hábitos crípticos, por la repelencia que presenta su cutícula cerosa y por la falta de insecticidas que logren controlar la masa de huevecillos. Así también es difícil que una sola aplicación tenga un control total de la plaga y en la mayoría de las ocasiones es necesario realizar más de dos tratamientos de mezclas de aceite con insecticidas órgano fosforados, para reducir las altas poblaciones del insecto (González, 1991).

La utilización de plaguicidas en vid de mesa está normada por registro de autorización, lo cual indica que algunos químicos pueden ser recomendados para su uso en viñedos, otros están sujetos a ciertas limitaciones y un tercer grupo debe quedar excluido totalmente. Los plaguicidas deben aplicarse en base a autorización, dosis mínima recomendada, frecuencia de aplicación, tiempo entre aplicación y cosecha, periodo de reentrada al lote tratado (González *et al.*, 2001; González, 2002).

A pesar de que existen insecticidas para el combate de esta plaga, el control presenta fallas, debido al mal cubrimiento en plantas con denso follaje, penetración bajo la corteza de la planta, que son sitios donde se encuentra el piojo harinoso (Geiger y Daane, 2001; Walton, 2003). Además, la cutícula cerosa del piojo harinoso reduce el contacto de los insecticidas (Walton, 2003). Algunas restricciones de uso, pueden limitar la aplicación

continua de insecticidas organofosforados, los cuales históricamente son los más utilizados para el control del piojo harinoso en todo el mundo.

La aplicación de insecticidas a través del sistema de riego, sobre todo por goteo, es un método que durante los últimos años está siendo utilizado para el control de insectos chupadores como pulgón, piojos harinosos, mosquitas blancas, escamas, etc. El método conocido actualmente como quimigación permite que los insecticidas sean absorbidos por las raíces junto con el agua, desde donde se distribuye hacia la parte superior de las plantas hasta llegar al floema. Este sistema ha resultado ser eficiente con el desarrollo de insecticidas del grupo de nicotinoides, tales como el imidacloprid. Adicionalmente estas moléculas tienen la ventaja de ser de baja toxicidad para el ser humano y medio ambiente, además registran un largo efecto residual al ser aplicadas vía riego. En el caso de piojos harinosos, el uso de insecticidas sistémicos es la solución hasta el momento más adecuada para su control (Larrain y Prado, 2000).

En California, E.U. cuentan con el siguiente programa de control de piojo harinoso de la vid (Bentley *et al.*, 2000; Bentley *et al.*, 2002; Haviland, 2003; Daane y Bentley, 2003):

1. Aplicación tardía en dormancia: durante primavera y antes de brotación (febrero o marzo) se recomienda la aplicación de clorpirifos cubriendo toda la planta. Un mayor control de insectos se logra si la aplicación coincide con temperaturas mayores a 21°C, ya que se activan los caminantes y se ponen en contacto con el insecticida.
2. Aplicación en floración (mayo): realizar una aplicación de imidacloprid, el cual es un insecticida sistémico que resulta más efectivo si se aplica a través del riego por goteo.

3. Aplicación en cosecha: si el viñedo está fuertemente infestado, las plantas deben ser tratadas con imidacloprid al follaje antes de cosecha. Este tratamiento tendrá una corta residualidad de control y su objetivo es reducir daños del insecto en racimos.
4. Aplicación en verano: sobre el follaje usando tratamientos a base de buprofezin, dimetoato, imidan o malathion.

En México, ante la aparición del piojo harinoso en vid de mesa, se efectuaron recomendaciones de tipo emergente para el control de la plaga y evitar daños en la producción y calidad del cultivo. Las recomendaciones iniciales de manejo de piojo harinoso en vid en la región, consistieron en que durante el período de postcosecha, al detectar plantas aisladas con presencia del insecto se debe realizar un descortezado completo de esas plantas y tratarlas químicamente con aplicaciones al suelo de imidacloprid (0.35 g i.a./planta) y aspersion total de la planta con la mezcla de clorpirifos (72 g i.a.) más metomilo (45 g i.a.) por 100 l de agua. Es importante cubrir un radio de 5 a 10 plantas, alrededor de la planta infestada. En caso de infestaciones más distribuidas en el lote se debe proceder a tratamientos totales (imidacloprid a dosis de 350 g i.a./ha) en el sistema de riego. Los intervalos de seguridad, es decir días entre aplicación y cosecha, son 30 días para imidacloprid (aplicado en el sistema de riego al suelo), 45 días para clorpirifos (vía foliar) y 2 días para metomilo. Antes de aplicar un insecticida es importante leer la etiqueta y revisar las tolerancias y días a cosecha (Fu-Castillo *et al.*, 2002).

A nivel regional, el combate químico con insecticidas sistémicos como imidacloprid ha proporcionado hasta la fecha un control eficiente de *P. ficus*, sin embargo, los crecientes costos de estas aplicaciones, hábitos de la plaga como esconderse debajo de la corteza, alta capacidad de reproducción de la plaga, factores agronómicos y desarrollo de

resistencia reducen la eficacia del control y por consecuencia la plaga se convierte en una seria amenaza para la viticultura regional.

Control biológico.

Las primeras investigaciones enfocadas en el control biológico de *P. ficus* en Norte América fueron realizadas por González y sus colaboradores a partir de 1994 utilizando principalmente parasitoides (Klotz *et al.*, 2002). Las primeras investigaciones en Hermosillo, Sonora sobre el control biológico de piojos harinosos utilizando parasitoides, específicamente *A. pseudococci*, se efectuaron en el 2001 (Fu-Castillo y Grageda, 2002).

Tanto en California como en Sonora se han detectado una gran cantidad de depredadores atacando piojos harinosos. Los parasitoides son avispas de tamaño pequeño, las cuales depositan sus huevecillos en el insecto plaga y posteriormente los estadios larvales se desarrollan en el insecto hasta causarle la muerte. La mayoría de los parasitoides pertenecen al orden Hymenoptera, donde destacan las familias Aphidae, Braconidae, Ichneumonidae, Trichogrammatidae y Encyrtidae (Hoffman y Frodsham, 1993), siendo esta última la que registra las especies más importantes en el control de piojos harinosos.

En Estados Unidos, en 1995, se iniciaron los estudios para el establecimiento de parasitoides del piojo harinoso de la vid en uvas de mesa en el Valle de Coachella. Los parasitoides introducidos fueron: *Anagyrus pseudococci*, *Leptomastidea abnormis*, *Coccidoxenoides peregrinus* y *Leptomastix dactylopii*. Los resultados arrojaron que *A. pseudococci* presentó mayor adaptación y control del piojo harinoso de la vid (González, 1996; González, 1998). Posteriormente se evaluaron diferentes cantidades de *A. pseudococci* liberados para el control del insecto y las épocas en que fueron aplicadas. Se

encontró que la dosis óptima para liberación son 30,000 *Anagyrus*/ha/semana en 4 épocas, para un total de 120,000 parasitoides/ha. La primera liberación se debe efectuar con el anillado del tronco.

En la Costa de Hermosillo (Sonora) en el 2001 se efectuaron los primeros estudios con *A. pseudococci* para el control del piojo harinoso de la vid y se encontró que el parasitoide se estableció en los lotes liberados, con niveles de parasitismo entre 5 y 30%. Estos resultados indicaron que a pesar de que la plaga se protege debajo de la corteza fue atacada por los parasitoides. Los mayores porcentajes de parasitismo se registraron durante los meses de abril y junio (Fu-Castillo *et al.*, 2005).

En las regiones mencionadas se ha detectado una gran cantidad de depredadores que atacan piojos harinosos, entre los que se incluyen: catarinitas (*Cryptolaemus montrouzieri*, *Hyperaspis* spp. y *Scymnus* spp.), crisopas (*Chrysoperla* spp.), crisopa café (*Hemerobius* spp.), moscas depredadoras (*Dicrodiplosis californica*), pseudoescorpiones (no identificados), chinche pirata (*Orius* spp.) (Daane *et al.*, 1996; Geiger y Daane, 2001). Es importante mencionar que aunque muchos de estos depredadores están presentes en viñedos infestados con *P. ficus*, no han impactado eficientemente en el control de la plaga (Daane *et al.*, 2002).

Por otro lado, los insectos, al igual que los humanos, plantas y animales, padecen de enfermedades causadas por microorganismos como bacterias, hongos y virus. Las enfermedades de insectos, provocadas por hongos, son comunes y frecuentemente diezman sus poblaciones. Los hongos entomopatógenos están asociados con insectos que habitan diversos ambientes, incluyendo ecosistemas agrícolas, forestales y pastoriles, así como en aguas dulces, suelos y aire (Hajek y Leger, 1994). Evaluaciones *in vitro* mostraron que los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*,

Isaria fumosorosea y *Verticillium lecanii*, aplicados directamente sobre el piojo harinoso de la vid, poseen capacidad de control de la plaga (Cantú *et al.*, 2004). Ensayos a nivel de campo, revelaron que un producto comercial a base de *B. bassiana*, *M. anisopliae*, e *I. fumosorosea* fue capaz de mantener las poblaciones del piojo harinoso en niveles bajos con respecto al control, el cual presentó un aumento exponencial en la población de insectos (Amaya, 2006). Sin embargo, no logró obtener un reaislado de hongos a partir de los insectos muertos, por lo tanto, no se determinó con certeza que cepa fue la que causó esta mortalidad o si se debió a otros factores incluyendo el vehículo (tween) o el surfactante.

Generalidades de los hongos entomopatógenos.

Clasificación taxonómica.

Los hongos constituyen un grupo diverso de microorganismos ya que son heterotróficos, eucariontes, unicelulares o hifales y se reproducen sexual o asexualmente. Los hongos entomopatógenos se encuentran principalmente en las divisiones Zygomycota, Ascomycota y Deuteromycota (Samson *et al.*, 1988). Muchos de los géneros de hongos entomopatógenos, frecuentemente estudiados, pertenecen a la clase Entomophthorales de la división Zygomycota, o a la clase Hyphomycetes de la división Deuteromycota (Sha y Pell, 2003).

Mecanismo patogénico.

A diferencia de otros agentes entomopatógenos, los cuales deben ser ingeridos para invadir al hospedero, los hongos generalmente penetran en el insecto a través de su cutícula externa, actuando como insecticidas de contacto. Esta cualidad única les permite ampliar el espectro de hospederos y atacar a insectos chupadores, entre otros. La invasión del hospedero directamente a través de la cutícula, partes bucales, membranas intersegmentales o a través de los espiráculos, sitios donde existe alta humedad que promueve la germinación de las esporas y permite la penetración de las hifas, constituye el principal aspecto de la patogénesis. Las esporas de los hongos son las que inician el

proceso patogénico, luego de su adhesión a la superficie de los insectos a través de fuerzas hidrófobas debido a la presencia de proteínas ricas en cisteínas llamadas hidrofobinas (Charnley, 1997; Kershaw y Nicholas 1998; Jeffs *et al.*, 1999).

Una vez adheridas, las esporas germinan y producen un tubo que empieza a deslizarse sobre la cutícula buscando puntos que faciliten su penetración (Richelme *et al.*, 1998). La penetración se da gracias a una combinación de presión mecánica y acción enzimática que va degradando esta estructura externa. Dentro del insecto, los hongos empiezan rápidamente a crecer y a producir toxinas que les permiten evadir la respuesta inmune del insecto y que en muchos casos son la causa directa de la muerte del hospedero. Una vez que el hongo ha consumido todos los nutrientes y tejidos del insecto, si las condiciones de humedad y temperatura son adecuadas, emerge y produce esporas continuando con el ciclo patogénico (Asaff *et al.*, 2002).

Características de la especie *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown & Smith.

Este microorganismo es un hongo imperfecto, clasificado en la subdivisión Deuteromycotina, de la clase de los Deuteromicetes o Hyphomycetales y de la familia Moniliaceae. *Isaria fumosorosea*, anteriormente conocida como *Paecilomyces fumosoroseus*, es un hongo capaz de infectar a una gran variedad de insectos plaga. Se ha aislado de diversas familias de los órdenes Lepidóptera, Díptera, Coleóptera, Neuróptera, Hymenoptera, Thysanoptera, Hemíptera y Homóptera en diferentes partes del mundo (Humber, 1992). Existen estudios que demuestran que *Isaria fumosorosea* es un hongo altamente patógeno para ninfas de *Bemisia argentifolii* con una concentración letal media (CL₅₀) de 50 y 150 conidias/mm² (Vidal *et al.*, 1997; Wraight *et al.*, 1998). En condiciones de campo, *Isaria fumosorosea* mostró buenos resultados de efectividad sobre pulgones en cultivo de pepino, el cual no difirió del estándar imidacloprid a 0.5 kg/ha (Trujillo, 2003). *Isaria fumosorosea* es una de las cuatro especies de hongos más usadas

como ingrediente activo de micoinsecticidas y micoacaricidas (5.8 %) (Faria y Wraight, 2007).

Características de la especie *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin.

Metarhizium anisopliae (Metsh.) Sorokin, pertenece a la subdivisión Deuteromycotina, clase Deuteromycetes, orden Moniliales, familia Moniliaceae (Tanada y Kaya, 1993; Barnett y Hunter, 1998; Rivera 2002). El género *Metarhizium* es conocido por ser parásito de insectos, en el suelo puede actuar como saprófito (Barnett y Hunter, 1998; Corral *et al.*, 2006). Desde su descubrimiento se ha encontrado un gran número de insectos infectados con *Metarhizium*, hasta 75 especies sólo en Norteamérica (De Bach, 1968). Puede llegar a atacar naturalmente a más de 300 especies de insectos de diversos órdenes (Gomes *et al.*, 1997; Monzón, 2001) como Coleóptera, Díptera, Hymenóptera, Lepidóptera y Homóptera (Tanada y Kaya, 1993; France *et al.*, 1999; Herrera *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2002). Los insectos muertos por *Metarhizium* son cubiertos completamente por un micelio de color blanco, el cual se torna de color verde cuando el hongo esporula (Barnett y Hunter, 1998; Monzón, 2001; Corral *et al.*, 2006). Gracias a su amplio espectro de acción es uno de los hongos más utilizados en el control biológico (30%) (Faria y Wraight, 2007).

Metarhizium anisopliae presenta un alto contenido de aminopeptidasas e hidrofobinas, las cuales favorecen la acción de enzimas extracelulares sobre la cutícula del insecto, sin embargo, se han encontrado esterases y proteasas en conidios no germinados, lo que sugiere una modificación de la superficie cuticular previa a la germinación, ya que la espora no solo absorbe agua, sino también nutrientes durante la hidratación (Jones, 1994; Kershaw y Talbot, 1998).

Características de la especie *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin

Beauveria bassiana es un hongo imperfecto de la familia Moniliaceae, clasificado en la subdivisión Deuteromycotina, de la clase de los Deuteromycetes o Hyphomycetales, que crece bien a temperaturas entre los 23 a 28 °C y a un 90% de humedad relativa (Rogg y Tovar, 1998). Agostino Bassi fue el primer científico en demostrar en 1835, que *Beauveria bassiana* afectaba al gusano de seda *Bombix mori*.

Beauveria bassiana es un hongo que se caracteriza por controlar plagas de insectos a nivel mundial por sus excelentes características patogénicas. La eficacia de este hongo en el control de plagas depende de variables como aislamientos específicos, humedad y temperaturas adecuadas necesarias para la germinación y esporulación en el insecto (Godoy *et al.*, 2007). Al igual que los hongos del género *Metarhizium*, *B. bassiana* debido a su efectividad sobre diferentes órdenes de insectos, es uno de los hongos más utilizados en el control biológico (30%) (Faria y Wraight, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora ubicado en el kilómetro 21 de la carretera a Bahía de Kino con el apoyo de los laboratorios de Fitopatología, Microbiología, Entomología y el laboratorio de Fisiología Celular y Bioprocesos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. en Hermosillo, Sonora.

Selección del hospedero.

Para realizar los bioensayos, primero se seleccionó el hospedero o unidad experimental más adecuada para este trabajo. Se evaluaron hojas de vid, plántulas de vid en macetas, plántulas de vid en macetas sin follaje y papas germinadas.

Evaluación de hojas de vid como hospedero de *P. ficus*.

Las hojas de plántulas de vid tuvieron 90 días de edad y se cortaron con un escalpelo para no dañarlas mecánicamente. El pecíolo de las hojas se introdujo en un vial con 10 ml de solución nutritiva. La solución nutritiva fue preparada mediante formulación de sales para cultivo de tejidos (Pierick, 1990) (Tabla 1) y se esterilizó en autoclave (121°C por 15 minutos). El pH inicial de la solución nutritiva se ajustó a 5.8, una vez a temperatura ambiente y después de esterilizar se vaciaron 10 ml en viales, en donde se sumergió el pecíolo de la hoja. Después, cada una de las hojas se infestaron con 10 piojos adultos de la especie *Planococcus ficus*. Las hojas infestadas se colocaron dentro de un recipiente plástico cubierto con papel aluminio para mantenerlos en oscuridad y así evitar que el piojo migrara (Figura 2).

Tabla 1.- Composición del medio nutritivo para el mantenimiento de hojas de vid

Componente	Concentración (mg/l)
$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	1650
KNO_3	1900
$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	170
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2 \text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2 \text{O}$	370
KI	0.83
H_3BO_3	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2 \text{O}$	22.30
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2 \text{O}$	8.6
$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2 \text{O}$	0.025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2 \text{O}$	27.8
Sacarosa	30000

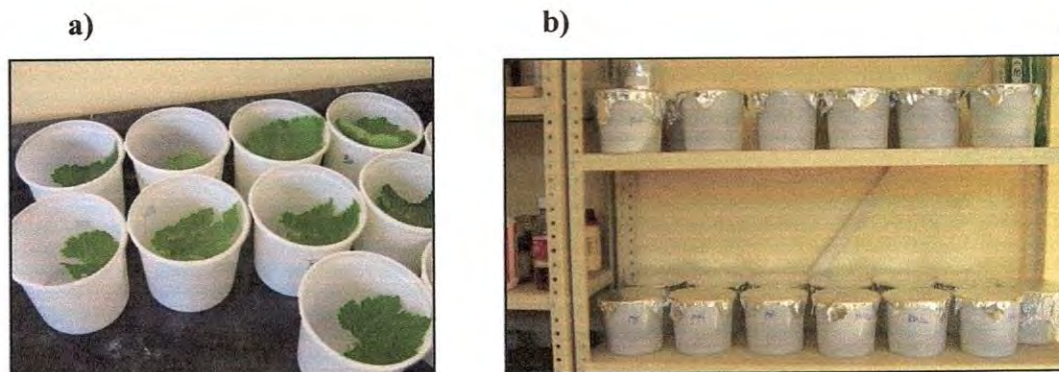


Figura 2. a) Hojas de vid infestadas con *P. ficus*. b) Unidades cubiertas con papel aluminio.

Evaluación de plantas de vid con follaje como hospedero de *P. ficus*.

Se utilizaron plantas de vid con 90 días de edad y colocadas en bolsas de plástico negro. Las plantas se infestaron con 100 hembras adultas de *P. ficus*, tanto en tallo como en hojas de la planta. Las plantas infestadas se dejaron por un período de dos días para el establecimiento de la colonia de insectos y posteriormente se aplicaron las diferentes suspensiones de hongos (Figura 3).

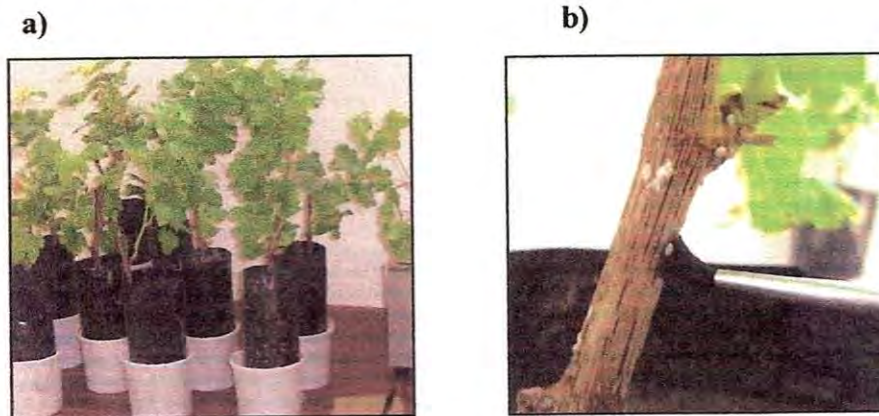


Figura 3. a) Plantas de vid con 90 días de edad; **b)** Infestación de plantas de vid con *P. ficus*.

Evaluación de plantas de vid sin follaje como hospedero de *P. ficus*.

Se quitó todo el follaje a las plantas de vid y se infestaron directamente sobre el tallo con 100 insectos adultos de *P. ficus*. Las plantas infestadas se cubrieron con papel estraza atando la parte inferior con un listón y la superior con cinta adhesiva para evitar la migración del insecto (Figura 4).



Figura 4. Plantas de vid sin follaje infestadas con *P. ficus* y cubiertas con papel estraza.

Evaluación de papas germinadas como hospedero de *P. ficus*.

En este bioensayo se utilizaron papas germinadas. Cada unidad experimental se infestó con 30 insectos adultos de *P. ficus*. Después las papas germinadas se colocaron en recipientes de plástico y fueron cubiertas con papel aluminio para evitar la luz y la migración de los insectos (Figura 5).

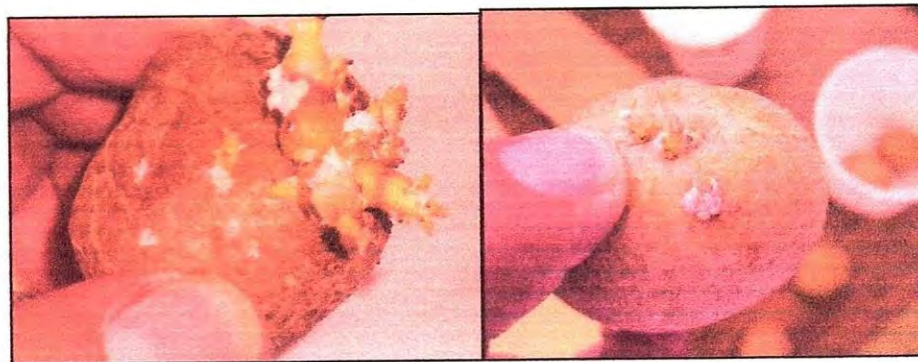


Figura 5. Papas germinadas infestadas con *P. ficus*

Recolección de *P. ficus* en campo.

Los estadíos ninfales y adultos de hembras de *P. ficus* utilizados en los bioensayos preliminares fueron recolectados de los diferentes viñedos de la Costa de Hermosillo y de la localidad de Pesqueira (Figura 6). Para la recolección se utilizó un descortezador y un pincel con pelo de camello. Las hojas y corteza de vid recolectadas se colocaron en un recipiente plástico para proteger de daño mecánico al insecto durante el transporte hasta el laboratorio. Con esta metodología se logró establecer una colonia con cantidad suficiente de insectos para realizar los bioensayos.

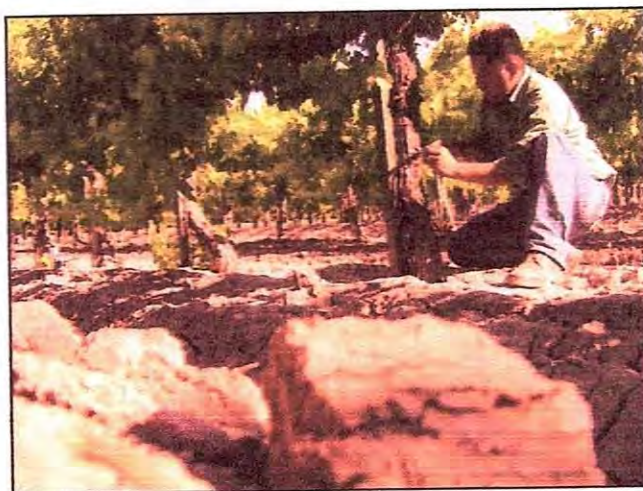


Figura 6. Recolección de *P. ficus* en viñedos de Hermosillo.

Bioensayos.

Cepas utilizadas.

Se utilizaron 6 cepas de hongos entomopatógenos que fueron proporcionadas por el laboratorio de Fisiología celular y Bioprocesos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) de Hermosillo, Sonora. Tres de estas cepas fueron de *Isaria fumosorosea*: PfrAB (cepa comercial), Pfr43 y Pfr13 (cepas nativas); una comercial de *Metarhizium anisopliae* (MaAB); una cepa comercial de *Beauveria*

bassiana (BbAB) y una cepa entomopatógena nativa de *Penicillium* spp. (Pesp), reaislada de *P. ficus* recolectado en campo.

Producción de los hongos.

Se utilizaron cajas petri con agar papa dextrosa (PDA), el cuál fue preparado con 65 g/l de agar papa dextrosa y 5 g/l de agar bacteriológico (pH final 5.85) y esterilizado en autoclave a 121°C por 15 minutos. Las cajas petri fueron inoculadas con 1 ml de suspensión de esporas e incubadas a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 8 días. Posteriormente, las cajas petri inoculadas se mantuvieron en ciclos naturales de luz-oscuridad durante 8-10 días para estimular la esporulación.

Preparación del material biológico para los bioensayos.

Suspensión de esporas de hongos.

Las esporas de cada cepa producidas en cajas petri se rasparon con un asa estéril y se colectaron en matraces Erlenmeyer de 175 ml conteniendo 50 ml de Tween 80 (0.005%) y se resuspendieron agitando en un vortex.

Conteo de esporas.

La concentración de esporas en las suspensiones se determinó mediante conteo bajo microscopio óptico (magnificación 400x) utilizando una cámara de Neubauer.

Pruebas de viabilidad.

El porcentaje de viabilidad se determinó mediante el porcentaje de germinación de las esporas en suspensión. La composición de la solución nutritiva usada para evaluar la germinación se describe en la Tabla 2. 50 ml de solución nutritiva se colocaron en un

matraz erlenmeyer de 125 ml y se inocularon con 1 ml de la suspensión de esporas a evaluar. La suspensión se mantuvo en agitación constante (150 rpm) durante 18 horas. Posteriormente se realizó un conteo de esporas totales y esporas germinadas. Las esporas germinadas fueron aquellas que presentaron formación del tubo germinal con al menos el doble de la longitud del largo de la espora.

Tabla 2. Solución nutritiva para germinación de esporas.

Componente	Concentración (mg/l)
Glucosa	50000
Glutamato de sodio	17500
ZnSO ₄ 7H ₂ O	20
MgSO ₄ 7H ₂ O	2
KH ₂ PO ₄	5
KCl	2
FeSO ₄ 7H ₂ O	15

El porcentaje de viabilidad se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{viabilidad} = \frac{\text{Neg} \times 100}{\text{Net}}$$

donde:

Neg = número de esporas germinadas

Net = número de esporas totales

Pruebas de dosis simple.

Se prepararon tres unidades experimentales infestadas con 30 insectos de *P. ficus*. Cada unidad experimental se asperjó, usando un atomizador, con 2 ml de la suspensión de esporas de cada cepa de hongos a evaluar. La concentración utilizada fue de 1×10^7

esporas/ml, resuspendidas en solución de tween (0.005%). Esta prueba se realizó sobre hembras adultas y sobre estadios larvales 1 y 2 (caminantes) de *P. ficus*. Como blanco se utilizó la solución de tween libre de esporas. Para evaluar el efecto del aceite mineral y tween 80 en los insectos, las unidades experimentales fueron asperjadas de la misma manera y usando el mismo volumen con una solución al 1% (v/v) de tween 80 y una emulsión al 1% (v/v) de aceite mineral.

Pruebas de dosis respuesta; determinación de la concentración letal media (CL₅₀).

Para determinar la CL₅₀ se prepararon suspensiones de esporas con diferente concentración, usando una solución de tween (0.0005%). Las concentraciones de *M. anisopliae* fueron de 2.0×10^8 , 2.1×10^7 , 1.7×10^6 , 1.3×10^5 , y 3.0×10^4 esporas viables/ml y las concentraciones *Penicillium* spp. fueron de 2.2×10^8 , 1.6×10^7 , 1.9×10^6 , 1.5×10^5 y 4.0×10^4 esporas viables/ml. Alícuotas de 2 ml de las suspensiones fueron asperjadas con atomizador sobre las unidades experimentales, que fueron infestadas previamente con 30 insectos (caminantes) de *P. ficus*. A los 10 días de aplicados los tratamientos se realizó un conteo de los insectos vivos y muertos de *P. ficus* para determinar la CL₅₀ y la CL₉₀ a través de un análisis Probit.

Análisis de resultados.

Confirmación de patogenicidad (emergencia de los insectos micosados).

Los insectos muertos presuntamente por micosis se sanitizaron superficialmente con alcohol etílico al 90 %, se secaron con papel absorbente estéril y se colocaron en la tapa de cajas petri invertidas conteniendo agar dextrosa saboraud. Las cajas se incubaron a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ por 96 horas. Posteriormente se observó la emergencia y crecimiento de micelio desde los insectos inoculados. Las diferentes cepas de hongos se identificaron por las características morfológicas y mediante el color del micelio y de las esporas.

Pruebas de patogenicidad de *Penicillium* spp. sobre *Tenebrio mollitor* y *Galleria mellonella*.

Para confirmar la capacidad patogénica del hongo *Penicillium* spp., aislado de *P. ficus*, se utilizaron larvas de los insectos *Tenebrio mollitor* “gusano de harina” y de *Galleria mellonella* “polilla de la cera” procedentes de PETMALL S.A. de C.V. (Estado de México). Los insectos de *T. mollitor* fueron crecidos en un medio conteniendo avena, salvado de trigo, pan triturado, proteína animal y vegetales (Amaya, 2009). Los insectos de *G. mellonella* fueron crecidos en un medio conteniendo avena, sales de wesson, levadura de cerveza, agua desionizada, miel de abeja, glicerol y vitaminas clusivol (Amaya, 2009). 10 larvas de insectos de cada especie se asperjaron, utilizando un atomizador, con 2 ml de suspensiones de *Penicillium* spp. Las suspensiones se realizaron en tween 80 (0.05%) con una concentración de 10^7 esporas/ml. Los insectos tratados se colocaron en cajas petri conteniendo la dieta alimenticia para cada especie (Amaya, 2009). Después de 10 días se evaluó la mortalidad de los insectos tomando como testigo (blanco) a aquellos tratados únicamente con una solución de tween (0.05%) sin esporas.

Corrección de la mortalidad (Fórmula de Abbot).

Los resultados obtenidos fueron corregidos respecto a la mortalidad en el testigo (blanco) utilizando la fórmula de Abbot.

$$Mc = \frac{Pmt - Pmb}{Ntp - Pmb} \times 100$$

donde:

Mc = mortalidad corregida

Pmt = piojos muertos en el tratamiento

Pmb = piojos muertos en el blanco

Ntp = número de piojos por unidad experimental

Análisis estadísticos.**Transformación angular de datos.**

Se hizo una transformación angular de los valores porcentuales, previo a las pruebas de comparación de medias.

Pruebas de dosis simple.

Se realizó un análisis de varianza con un nivel de significancia de 0.05% y para determinar las diferencias entre los tratamientos se realizaron comparaciones múltiples de medias mediante pruebas de Tukey-Kramer ($p < 0.05$) mediante el programa Number Cruncher Statistical Systems (NCSS, 2007).

Pruebas de dosis respuesta.

Las concentraciones letal media y noventa (CL_{50} y CL_{90}) de las cepas MaAB y Pesp fueron obtenidas mediante una regresión Probit (NCSS, 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento del pie de cría de *P. ficus*: Efecto del hospedero.

Hojas de vid.

Al utilizar las hojas de vid con el pecíolo sumergido en solución nutritiva, las hojas no mantuvieron su turgencia por un mínimo de diez días, que es el tiempo necesario para evaluar la mortalidad del piojo harinoso por probable micosis. Algunas hojas se mostraban necróticas mientras otras con clorosis (Figura 7). El promedio de mortalidad fue del 30% ($\pm 10\%$). Aunque el control presentó un porcentaje de mortalidad del 10%, adecuado para este tipo de experimentos, los resultados no fueron suficientes ni confiables. Los problemas observados en las unidades experimentales señalaron que la mortalidad en los insectos fue causada probablemente por algún otro factor que no se tenía contemplado como variable, ya que además no se logró reaislar los hongos entomopatógenos de los insectos muertos.

Alean (2003) evaluó la patogenicidad de diferentes hongos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus sociales* Bondar (Homóptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero en Bogotá, D.C., Colombia. Para ello introdujo los pecíolos de las hojas de yuca en viales de 12 x 35 mm con agua destilada estéril y los selló con papel parafinado. Inmediatamente se ubicó el haz de las hojas sobre la superficie interna de las cajas de petri de 150 x 15 mm, sin embargo, las hojas de yuca se deterioraron y también obtuvo como resultado la presencia de hongos contaminantes por lo que no observó el crecimiento de los aislados nativos aplicados.

Lacey *et al.* (1999) en su trabajo sobre la actividad larvicida y ovicida de conidios y blastosporas de *Paecilomyces fumosoroseus* sobre *Bemisia argentifolii*, utilizaron como

hospedero hojas de repollo, las cuales fueron cortadas en la base del peciolo con bisturí estéril. Después, sumergieron los peciolos de las hojas en una fuente de hormonas para ayudar a la formación de la raíz. Finalmente colocaron los peciolos en recipientes de plástico conteniendo 100 ml de solución nutritiva a base de sales minerales, cubriendo las hojas con bolsas de celofán. Las hojas de repollo enraizadas se mantuvieron sanas durante el desarrollo de los bioensayos, permitiendo un buen monitoreo de los insectos, sin embargo, es difícil inducir la raíz en hojas de la mayoría de los árboles ya que esto es exclusivo de algunas especies herbáceas como algunos helechos y en otras especies como las violetas africanas y *Brassica oleraceae var. capitata* (repollo). En *Vitis vinifera* (vid), no fue posible inducir enraizamiento en hojas, lo cual causó el rápido deterioro del material vegetativo, que representó el principal motivo para rechazar estos resultados.

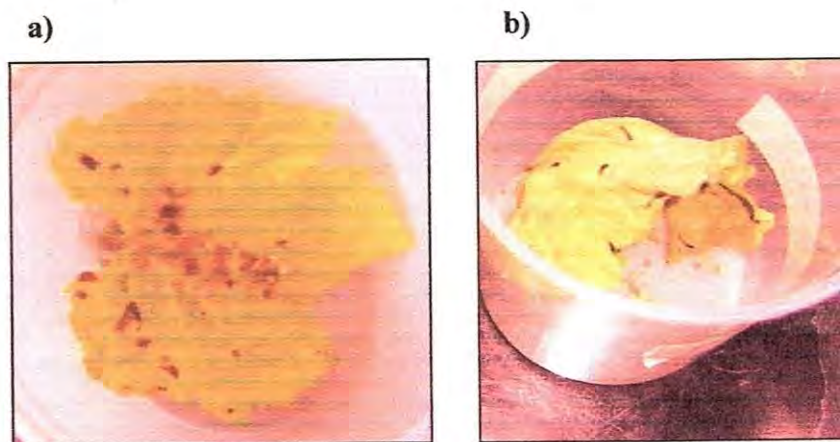


Figura 7. Hojas de vid con peciolo sumergido en solución nutritiva. a) Hoja presentando una fuerte clorosis, b) Hoja con necrosis o desecación total de la hoja.

Plantas de vid con follaje.

El empleo de plántulas de vid con follaje permitió un establecimiento adecuado de los insectos (Figura 8), sin embargo, luego de los tratamientos, la cuenta de insectos totales (vivos y muertos) se redujo con respecto al número inicial en un 20%. Es probable que

algunos de los insectos no encontrados hayan sido micosados y otros no, lo cual no permitió hacer un análisis confiable de los datos. Debido a sus hábitos crípticos, posiblemente algunos insectos migraron a la raíz o fuera de la planta ya que los tallos de las plántulas no tenían suficiente corteza para su establecimiento. A pesar de los problemas mencionados anteriormente, es importante resaltar que este bioensayo simuló las condiciones ambientales más cercanas a las de campo y permite obtener datos aproximados de lo que puede estar sucediendo realmente a este nivel. Los resultados obtenidos fueron de una mortalidad promedio del 28% ($\pm 11\%$), cantidad considerada baja si se toma en cuenta que el control presentó un porcentaje de mortalidad del 15%.

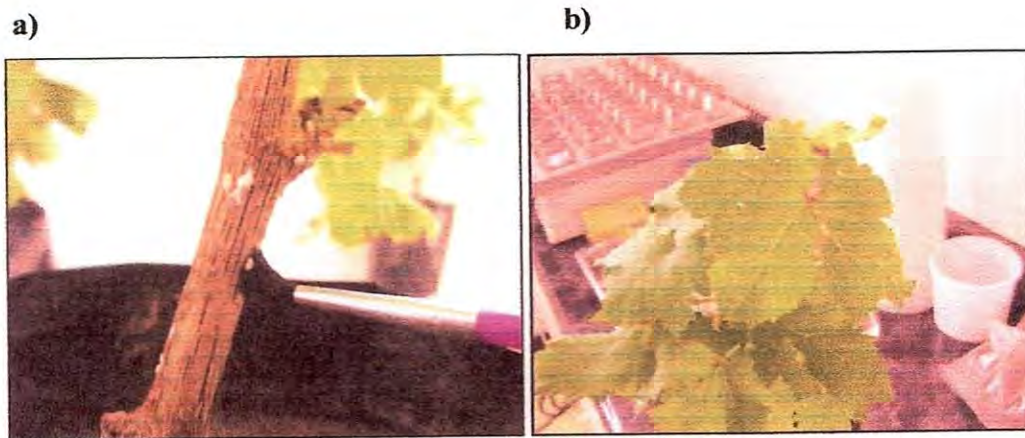


Figura 8. a) Plántulas de vid con follaje y b) tallo y hojas infestadas con hembras adultas de *P. ficus*.

Plantas de vid sin follaje.

En este bioensayo se obtuvieron mortalidades promedio del 56% ($\pm 17\%$), pero el control presentó una mortalidad del 50%, mucho mayor que en plantas con follaje. Esta elevada mortalidad en el control pudo deberse a daño mecánico producido durante la ejecución del bioensayo. Debido a sus hábitos crípticos, el piojo harinoso migró hacia los

dobleces del papel, que pudieron ser maltratados durante la evaluación del tratamiento (Figura 9).

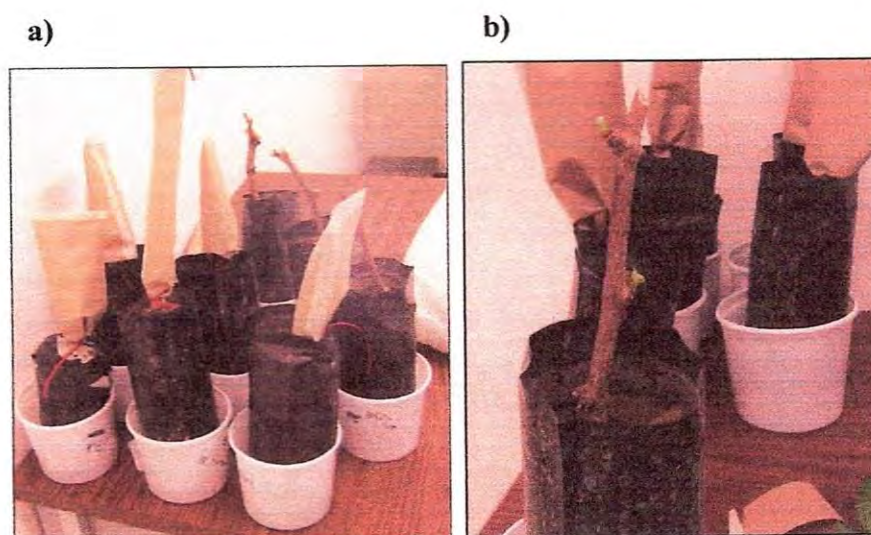


Figura 9. a) Plántulas de vid sin follaje infestadas con *P. ficus* y cubiertas con papel estraza después de aplicar los tratamientos; b) Plántula de vid después del periodo de prueba.

Papas germinadas.

Al utilizar las papas germinadas se observó que se mantenían en buenas condiciones por largos periodos de tiempo (> 1 mes). Este tiempo fue suficiente para permitir una evaluación exitosa de los bioensayos. Debido a que el piojo *P. ficus* se alimenta de brotes nuevos, la migración del insecto fue casi nula, aún cuando se evaluaron los caminantes. De acuerdo con estos resultados, la papa germinada usada como unidad experimental fue

la más adecuada debido a que el piojo harinoso se mantuvo en buenas condiciones nutricias. Además como el sistema experimental resultó de fácil manejo, se optó por este pie de cría para los futuros bioensayos.

Las papas han sido utilizadas como plantas hospederas para distintas especies de cochinillas (Meyerdirk *et al.*, 2003), sin embargo, éstas no representan el alimento para las cochinillas sino los brotes suaves y tiernos que se desarrollan sobre la misma. Para inducir la germinación de las papas se recomienda colocarlas sin tierra ni agua sobre estantes abiertos o parcialmente sumergidas dentro de cajas que contengan tierra y regándolas periódicamente. Esta última técnica requiere de mayor cuidado y mantenimiento de las papas y de las condiciones del cuarto de germinación. Bajo ambos sistemas, las papas deben ser cultivadas totalmente en la oscuridad, para evitar que los brotes produzcan clorofila y se tornen verdes, lo que no apetece a los insectos (Meyerdirk *et al.*, 2003). Todos los estadios del piojo harinoso se alimentaron directamente de los brotes presentes en las papas (Figura 10). Se recomienda utilizar papas de semilla ya que no están tratadas con inhibidores de germinación.

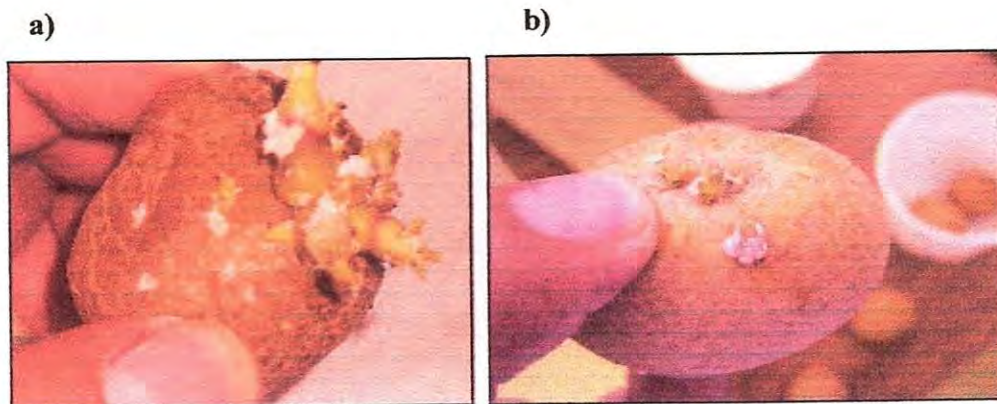


Figura 10. a) y b) Papas germinadas é infestadas con *P. ficus*

Pruebas de dosis simple sobre hembras adultas de *P. ficus*.

Durante los preliminares realizados para la selección del material vegetal hospedero se colectaron directamente en campo los insectos empleados para los bioensayos. Una vez aplicados los tratamientos, los insectos muertos con signos de micosis fueron desinfectados superficialmente y se colocaron en placas petri con PDA para el reaislamiento del posible entomopatógeno. La morfología colonial de uno de los hongos aislados y el color de sus esporas fue similar al de *Metarhizium anisopliae*. De acuerdo a estas características morfológicas se propuso correspondencia con uno de los tratamientos aplicados, sin embargo, al realizar las pruebas de confirmación de patogenicidad y de caracterización de dicha cepa, se determinó que se trataba de un probable entomopatógeno nativo del género *Penicillium*. Los resultados de las pruebas de caracterización de dicho aislado se presentan en el anexo de esta tesis.

Además del nuevo aislado de *Penicillium*, se evaluó la patogenicidad de las cepas comerciales de *Beauveria bassiana* (BbAB), *Isaria fumosorosea* (PfrAB) y *Metarhizium anisopliae* (MaAB) y de dos cepas nativas de *Isaria fumosorosea* (Pfr43 y Pfr13). En la Figura 11 se presentan los datos de mortalidad corregida en relación al tween usado como vehículo sobre hembras adultas de *P. ficus*. De las seis cepas evaluadas, la mortalidad más alta (39.76%) se obtuvo con la cepa de MaAB, seguida por la producida por la cepa Pfr43 (19.5%). Las cepas PfrAB, Pfr13, BbAB y Pesp ocasionaron mortalidades muy bajas, estadísticamente similares a las del blanco (tween 80 al 0.05% v/v) que presentó una mortalidad del 7%. La emergencia de los hongos de los cadáveres de insectos comprobó su muerte por micosis.

Lucero *et al.* (2004) hicieron una evaluación de la actividad biocontroladora de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Ancognatha scarabaeiodes* (Coleoptera: Scarabaeidae) y observaron que los aislados Mt1, Mt2 de

Metarhizium anisopliae y Bb de *Beauveria bassiana* presentaron mayor actividad biocontroladora a nivel de laboratorio. Las mortalidades acumuladas resultantes del tratamiento de las larvas con suspensiones del orden de 1×10^{10} esporas/ml de Mt1, Mt2 y Bb fueron del 100%. Cuando usaron concentraciones del orden de 1×10^9 esporas/ml, las mortalidades observadas a los 18 días de aplicados los tratamientos fueron del 80% para Mt1 y del 70%, para Mt2 y Bb. La mayor mortalidad reportada por estos autores probablemente se deba a la concentración de esporas usada y que fue mayor a la utilizada para *P. ficus* en esta tesis, además de las diferencias naturales entre *P. ficus* y *A. scarabaeiodes*.

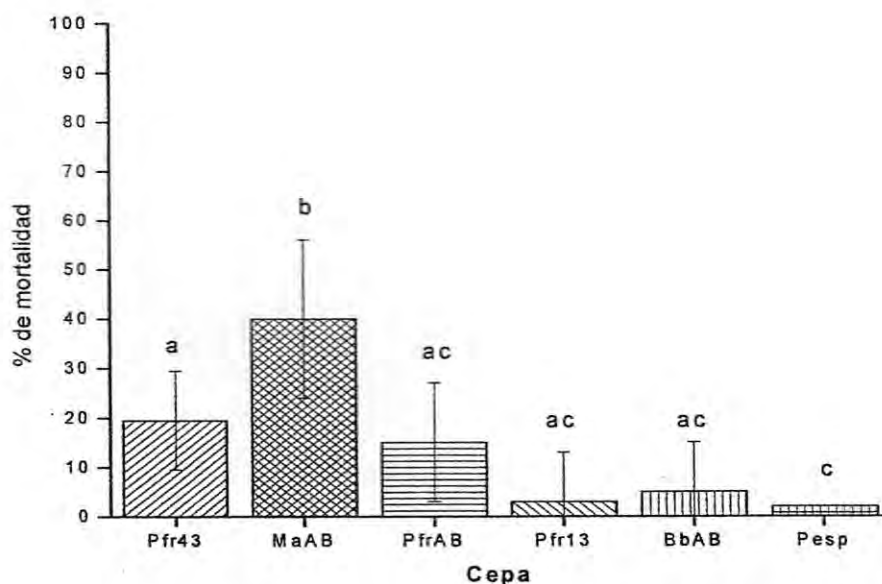


Figura 11. Mortalidad corregida de hembras adultas de *P. ficus* provocada por diferentes cepas de hongos entomopatógenos utilizando una dosis simple del orden de 1×10^7 esporas/ml. PfrAB, Pfr43, Pfr13, cepas de *Isaria fumosorosea*; BbAB, cepa de *Beauveria bassiana*; MaAB, cepa de *Metarhizium anisopliae*; Pesp, cepa de *Penicillium* spp. Letras iguales no presentan diferencia significativa.

Por otro lado, Kassa *et al.* (2002) evaluaron la eficacia de 13 aislados de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *Paecilomyces* spp. contra *Sitophilus zeamais* y *Prostephanus truncatus*. Los hongos fueron aplicados a concentraciones de 1×10^7 y 1×10^8 conidios/ml para *P. truncatus* y *S. zeamais*, respectivamente. Todos los aislados presentaron virulencia contra *P. truncatus* (98-100% de mortalidad). *Metarhizium anisopliae* y *B. bassiana* también fueron virulentos sobre *S. zeamais* (92-100% de mortalidad). El aislado de *Paecilomyces* ssp. resultó ser el menos virulento sobre *S. zeamais*, causando sólo 26.32 ($\pm 4.29\%$) de mortalidad. *Prostephanus truncatus* resultó el más susceptible a los hongos entomopatógenos que *S. zeamais*. *Metarhizium anisopliae* fue el hongo más virulento con una CL_{50} de 3.39×10^5 conidios/ml, seguido de *B. bassiana* con una CL_{50} de 2.04×10^6 conidios/ml.

Por su parte Ansari *et al.* (2004) evaluaron la virulencia de 34 aislados de hongos entomopatógenos de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces* sobre el tercer instar de *Hoplia philanthus*. Ellos utilizaron suspensiones de esporas con una concentración de 1×10^7 conidios/ml. Dos aislados de *M. anisopliae* (CLO 53 y CLO 54) causaron la mayor mortalidad (90%), mientras que los otros aislados causaron solo mortalidades entre 10 y 62%. Asimismo Ansari *et al.* (2007) en su trabajo sobre la eficacia de hongos entomopatógenos sobre *Frankliniella occidentalis*, evaluaron el potencial de dos cepas de *Metarhizium anisopliae* (V275 y ERL700), donde la más efectiva (V275) causó entre el 85-96% de mortalidad en larvas y pupas de pulgones, mientras ERL700 produjo una mortalidad entre 51-84%; *Beauveria bassiana* 54-84% de mortalidad e *Isaria fumosorosea* 63-75% de mortalidad.

Por otra parte, Chernaki-Leffer *et al.* (2007) evaluaron la patogenicidad de varias cepas de hongos entomopatógenos sobre insectos adultos de *Alphitobius diaperinus*. En dicho trabajo se obtuvieron 30 aislados de *B. bassiana*, *Paecilomyces amoenoroseus* (Hennings), *P. fumosoroseus* (Wize) Brown y *M. anisopliae* var. *Acridum*. Los dos aislados más virulentos, CNPSo-Ma352 (*M. anisopliae*) y CNPSo-Ma356 (*M.*

anisopliae) mataron el 30% y 26.7% de los adultos tratados con conidios secos, respectivamente. Sánchez y Bellotti (1997) evaluaron la patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* sobre los estados ninfales de la chinche subterránea de la yuca, *Cryptomenus bergi*, obteniendo una mortalidad del 84%.

En todos estos trabajos, destaca la mayor virulencia de *M. anisopliae* sobre diferentes órdenes de insectos, en relación a otros géneros de hongos entomopatógenos. Este hecho concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde la cepa comercial de *M. anisopliae* (MaAB) provocó la mayor mortalidad en hembras adultas de *P. ficus*, seguida por la cepa de *I. fumosorosea* nativa (antes *Paecilomyces fumosoroseus*) (Pfr43), mientras que la cepa de *B. bassiana* utilizada resultó prácticamente inocua. La mayor efectividad de la cepa de *I. fumosorosea* nativa, en relación a la de *B. bassiana*, probablemente se deba a que fue justamente aislada de insectos de *P. ficus* micosados, mostrando una mayor afinidad por esta plaga.

En la mayor parte de los trabajos citados, las mortalidades provocadas por *M. anisopliae* son muy altas, pese a que en algunos casos, las concentraciones de esporas utilizadas fueron similares a las del presente trabajo (1×10^7 conidios/ml). Esto indica la escasa susceptibilidad al ataque de hongos de los estadíos adultos de *P. ficus*. Una probable causa para esta resistencia puede ser la capa cerosa, algodonosa e hidrofóbica que recubre a las hembras del piojo harinoso, actuando como una barrera contra las esporas fúngicas.

Por ejemplo se ha reportado que el insecto *Liposcelis bostrychophila* es muy resistente al ataque de hongos entomopatógenos como *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* o *Aspergillus parasiticus* con mortalidades no mayores al 16%. Se

encontró que amidas grasas de la cutícula del insecto pueden contribuir a su resistencia al ataque de hongos debido a que estos compuestos disminuyen la hidrofobicidad, evitando la adhesión de las esporas (Lord y Howard, 2004). En algunos sistemas la incapacidad de los hongos para atravesar la cutícula de los insectos ha sido atribuida a la presencia de compuestos inhibitorios del crecimiento y/o de la germinación (fenoles, quinonas y lípidos) en la superficie de la cutícula (Hajek y St. Leger, 1994).

Pruebas de dosis simple sobre caminantes de *P. ficus*.

Se evaluaron las mismas cepas que en el bioensayo anterior, los resultados se presentan en la Figura 12

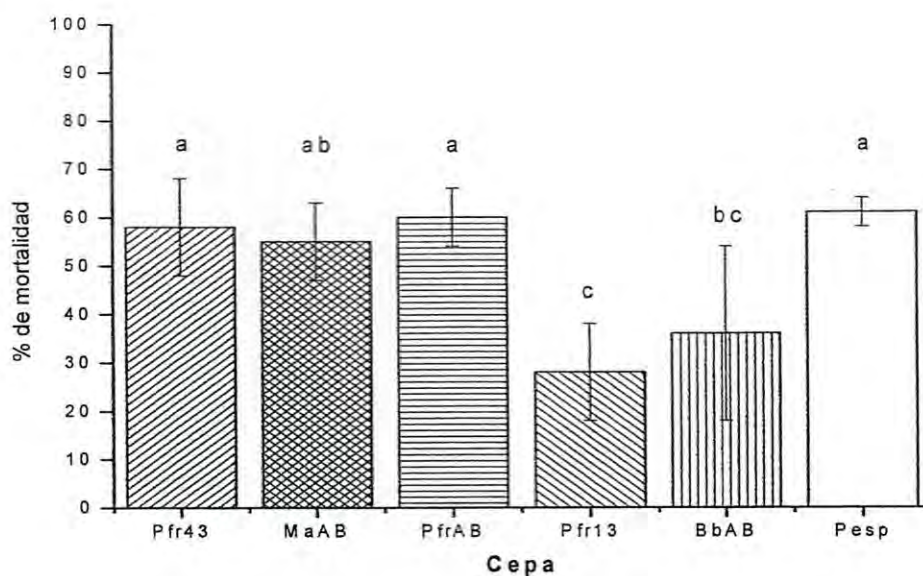


Figura 12. Mortalidad corregida de caminantes (segundo instar) de *P. ficus* provocada por diferentes cepas de hongos entomopatógenos utilizando una dosis simple del orden de 1×10^7 esporas/ml. PfrAB, Pfr43, Pfr13, cepas de *Isaria fumosorosea*; BbAB, cepa de *Beauveria bassiana*; MaAB, cepa de *Metarhizium anisopliae*; Pesp, cepa de *Penicillium* spp. Letras iguales no presentan diferencia significativa.

A diferencia del bioensayo en donde se utilizaron piojos adultos en vez de caminantes, la mayor parte de las cepas provocó un porcentaje elevado de mortalidad, destacando las cepas MaAB, Pfr43, PfrAB y Pesp con un promedio del 58%. Por su parte, las cepas BbAB y Pfr13 provocaron mortalidades del 36.75 y 28.5% respectivamente, aunque no se observó diferencias significativas entre ellas (Figura 12). En los testigos en los que se utilizó tween 80 como vehículo se observó una mortalidad de 4.13%.

En la patología de insectos es común encontrar reportes a cerca de variaciones en la susceptibilidad de los estadios de desarrollo al ataque de hongos. Vidal *et al.* (1997) evaluaron la patogenicidad de *Isaria fumosorosea* sobre mosquita blanca, *Bemisia argentifolii*, observando que en general, este hongo es altamente patógeno para el segundo instar del insecto. Alean (2003), evaluó la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis*; observando, que el estadio más susceptible es el de huevos próximos a eclosionar.

Sahagún *et al.* (2005) evaluaron la susceptibilidad de los diferentes estadios (huevos, pupas y adultos) de la mosca del cuerno (*Haematobia irritans*) a los hongos entomopatógenos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *I. fumosorosea*. Para los huevos tratados con *M. anisopliae* e *I. fumosorosea*, se redujo la emergencia hasta 3.8-6.3% en comparación al control (72%). La mortalidad de pupas infectadas con *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* estuvo entre 50 y 71.3%, mientras que la mortalidad en adultos fue de más del 90%. *Metarhizium anisopliae* produjo la CL₅₀ más baja sobre adultos usando concentraciones de 8.08×10^2 conidios/ml, mientras que *Beauveria. bassiana* resultó prácticamente inocua para los estadios adultos.

Chernaki-Leffer *et al.* (2007) obtuvieron la CL_{50} de dos cepas de *M. anisopliae* (CNPSO-Ma352 y CNPSO-Ma356) sobre insectos adultos de *Alphitobius diaperinus*. La CL_{50} de CNPSO-Ma352 fue de 4.5×10^4 conidios por larva y 2.1×10^5 conidios por adulto, y de la cepa CNPSO-Ma356, la CL_{50} fue de 2.2×10^4 conidios por larva y 1.3×10^5 conidios por adulto. Las larvas fueron 5 a 6 veces más susceptibles que los adultos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos sobre *P. ficus* ya que los primeros instares son más susceptibles a hongos entomopatógenos que los estadios adultos.

Las diferencias en la composición de la cutícula, en los hábitos de vida, en el desarrollo del sistema de respuesta inmune, entre otros, suelen ser la causa de que unos estadios sean más susceptibles que otros al ataque de patógenos. En el caso de *P. ficus*, los estadios juveniles del insecto (caminantes del segundo instar) a diferencia de las hembras adultas, carecen del recubrimiento ceroso. Este hecho parece ratificar que la causa de la baja susceptibilidad al ataque de hongos de las hembras adultas es la presencia de dicho recubrimiento. Para la protección de los cultivos de vid, el resultado de que los estadios juveniles del piojo harinoso fueron más susceptibles a los hongos entomopatógenos es ventajoso, pues se refleja en un menor consumo de savia y por lo tanto, la disminución de pérdidas en el rendimiento así como en la transmisión de virus a las plantas.

Por otra parte, resultó relevante que una cepa del género *Penicillium*, aislada del piojo harinoso de la vid, resultara patógena para estadios juveniles del insecto. Se reporta que hongos de los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Penicillium* son contaminantes muy comunes de los cadáveres de insectos (Humber, 1998) pudiendo tratarse de hongos oportunistas. Sin embargo, la cepa nativa de *Penicillium*, también resultó patógena para larvas del gusano de la cera *Galleria mellonella* (ver anexo).

Aunque las especies del género *Penicillium* son poco conocidas por sus cualidades entomopatógenas, se han descrito algunas que poseen esta característica. Lara *et al.* (1998) evaluaron la patogenicidad de 13 cepas de *Penicillium* sobre el segundo estado larval de *Aedes aegypti*, *Aedes fluviatilis*, *Anopheles aquasalis* y *Culex quinquefasciatus*. La mortalidad se presentó dentro de las primeras 24 horas en rangos de 0 a 100%. Las especies *P. corylophilum*, *P. fellutanum*, *P. implicatum*, *P. janthinellum*, *P. viridicatum* y *P. waksmanii* provocaron mortalidades muy bajas sobre larvas de *Aedes aegypti* (0 a 6.6%), sin embargo, su efectividad fue mayor sobre larvas de *Aedes fluviatilis*, *Anopheles aquasalis* y *Culex quinquefasciatus*, con mortalidades entre 3.33 a 100%. Dentro de los candidatos para su uso en el control biológico de vectores de enfermedades tropicales están *P. corylophilum* y *P. janthinellum*. Luz *et al.* (2007) estudiaron la actividad ovicida de 21 especies de hongos hyphomycetes sobre *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Se observó una clara actividad ovicida con baja cantidad de eclosiones (1.3-40%) en ocho especies de hongos hyphomycetes, entre ellos *Penicillium* spp.

Pruebas de dosis-respuesta: Concentración letal media y noventa (CL₅₀ y CL₉₀) de *Metarhizium anisopliae* y *Penicillium* spp. sobre *P. ficus*.

La cepa de mayor virulencia tanto para estadios adultos como juveniles fue la MaAB de *M. anisopliae*. También fue de interés la cepa nativa de *Penicillium* (Pesp) que provocó niveles elevados de mortalidad en estadios juveniles. En ambos casos se evaluó la CL₅₀ y CL₉₀ sobre estadios juveniles (segundo instar) del piojo harinoso de la vid, *Planococcus ficus*; los resultados se muestran en la Tabla 3. En algunos casos, los valores de la CL₅₀ y CL₉₀ fueron similares a los reportados en la literatura sobre hongos de la misma especie u otros géneros actuando sobre diferentes órdenes de insectos. En el caso de *Penicillium* spp., las dosis son mucho más altas mostrando una menor virulencia de esta especie sobre *P. ficus*.

Tabla 3. Concentración letal media y noventa (CL₅₀ y CL₉₀) de *Metarhizium anisopliae* y *Penicillium* spp. sobre el piojo harinoso de la vid *Planococcus ficus*.

Cepa	CL ₅₀ (conidios/ml)	CL ₉₀ (conidios/ml)
<i>M. anisopliae</i>	1.89×10^7	2.82×10^{10}
<i>Penicillium</i> spp.	6.67×10^8	1.13×10^{15}

Lucero *et al.* (2004) hicieron una evaluación de la actividad biocontroladora de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Ancognatha scarabaeiodes* (Coleoptera: Scarabaeidae), donde observaron que la CL₅₀ y CL₉₀ correspondientes al aislamiento Mt1 fueron de 2.0×10^7 y 7.3×10^9 esporas/ml. Para el aislamiento Mt2 las concentraciones fueron 4.9×10^7 y 2.2×10^{10} esporas/ml respectivamente; mientras que Bb cosmo presentó una CL₅₀ de 6.1×10^7 y una CL₉₀ de 1.1×10^{10} esporas/ml. También, Wraight *et al.* (1997) evaluaron la patogenicidad de *Paecilomyces* spp. y *Beauveria bassiana* sobre mosquita blanca *Bemisia argentifolii* de tercer instar, donde obtuvieron una CL₅₀ entre 50 y 150 conidios mm², tanto para *Paecilomyces* spp., como para *Beauveria bassiana*. Macarena *et al.* (1999) evaluaron la patogenicidad de tres aislados de *Metarhizium anisopliae* sobre *Otyorhynchus sulcatus* obteniendo una CL₅₀ y CL₉₀ para el aislado más virulento de 1×10^6 y 1×10^8 conidias/ml, respectivamente.

Hasta el momento, el único trabajo reportado donde se utilizaron hongos entomopatógenos, como *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea*, para el control del piojo harinoso, es el de Amaya (2006). Sin embargo, no logró reaislar ninguna de las tres cepas utilizadas de los insectos muertos, por lo que no fue posible establecer si alguna de las cepas fue más virulenta o si el vehículo en el que se suspendieron las esporas (aceite mineral) o el surfactante utilizado (tween 80) tuvo un efecto tóxico sobre el insecto. En el presente trabajo se utilizaron las mismas cepas utilizadas por Amaya (2006), además de otros aislados. Se observó que la cepa más virulenta y con mayor

potencial de control del piojo harinoso de la vid fue *Metarhizium anisopliae*. Además se evaluó la toxicidad de tween 80 y aceite mineral, encontrando que una solución de tween 80 al 1% (v/v) mata hasta el 80% (± 10) de los insectos tratados (caminantes), mientras que una emulsión de aceite mineral al 1% (v/v) mata el 100% de los insectos. Las concentraciones evaluadas corresponden a las que fueron utilizadas en el trabajo de Amaya (2009).

Existen varios reportes a cerca del efecto insecticida del aceite mineral y surfactantes o jabones. Kraiss y Cullen (2008) reportan que el uso de aceite mineral y jabones insecticidas es altamente efectivo contra el áfido de la soya *Aphis glycines* Matsumura (Hemiptera: Aphididae). Liu y Stansly (1995) compararon la eficacia del aceite mineral y surfactantes con piretroides sintéticos, encontrando que el aceite mineral tiene un efecto insecticida equivalente al de los piretroides sobre mosquita blanca *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae).

Los resultados obtenidos muestran que el uso de *Metarhizium anisopliae* como agente de control biológico es una opción interesante para el combate del piojo harinoso de la vid, ya que es capaz de atacar tanto los estadios adultos como los juveniles del insecto, provocando altos niveles de mortandad. Otra cepa de elevado potencial es la Pf43 de *Isaria fumosorosea*, aunque faltó establecer su CL_{50} y CL_{90} . La formulación de estos hongos en aceite mineral y su aplicación con surfactantes es muy aconsejable ya que se tendrá un efecto aditivo pues todos ellos presentan capacidad insecticida contra el piojo harinoso. Sin embargo, hacen falta más estudios que determinen si su aplicación es compatible con otros agentes de control biológico, ya que se reporta que algunos jabones o surfactantes pueden afectar determinados estadios de ciertos insectos benéficos, como *Nephaspis oculatus* (Blatchley), depredador de la mosquita blanca *Bemisia argentifolii* (Liu y Stansly, 1996).

Se considera que uno de los mayores obstáculos para el control del piojo harinoso con hongos entomopatógenos son los hábitos crípticos del insecto pues la corteza de la vid, debajo de la cual se esconden, constituye una barrera para que las esporas fúngicas entren en contacto. Sin embargo se debe considerar que la corteza de vid no es compacta y tiene muchas grietas por las cuales el medio insecticida conteniendo las esporas, aceite mineral y surfactantes puede penetrar. También se debe señalar que las esporas pueden permanecer en la corteza durante varios días y los estadíos móviles del piojo harinoso (caminantes) pueden entrar en contacto con ellos y actuar como vectores, diseminando la enfermedad al resto de la colonia.

CONCLUSIONES

La virulencia de los hongos entomopatógenos sobre el piojo harinoso de la vid *Planococcus ficus* fue variada y de acuerdo a su género y especie. *Metarhizium anisopliae* cepa MaAB fue la cepa más virulenta y capaz de atacar al insecto en sus diferentes estadios de desarrollo.

La susceptibilidad del piojo harinoso de la vid a micosis fue diferente, dependiendo de la etapa del ciclo de vida en que se encontraba cuando se le aplicaron los tratamientos con hongos. Los estadios juveniles del primer y segundo instar (caminantes) fueron más susceptibles al ataque de hongos entomopatógenos que las hembras adultas de *P. ficus*; al parecer porque los caminantes carecen de la cutícula cerosa que recubre a estas las hembras y que probablemente representó una barrera contra la adhesión de las esporas fúngicas.

Los surfactantes, como el tween 80 y el aceite mineral, utilizados como vehículos para la suspensión de esporas, presentaron un efecto insecticida contra el piojo harinoso de la vid por lo que su aplicación conjunta puede potenciar la acción patogénica de los hongos.

ANEXO

Aislamiento de *Penicillium* spp.

Se llevó a cabo a partir de piojos colectados en campo, particularmente de insectos colectados en los viñedos de la comunidad de Pesqueira, Hermosillo. Después de diez días de mantener a los insectos en las condiciones de los bioensayos, se recolectaron aquellos insectos muertos con claros signos de micosis (momificados) y a partir de ellos se realizó el aislamiento del agente patógeno causante de la muerte. Se encontró que uno de los aislados, posteriormente identificado como del género *Penicillium*, presentó una morfología colonial similar a la de *Metarhizium anisopliae*. En principio se pensó se trataba de la cepa MaAB; sin embargo, durante su crecimiento en cajas petri, a diferencia de la cepa MaAB, se observó una gran producción de pigmento rojo que teñía el medio de cultivo (Figura 13).

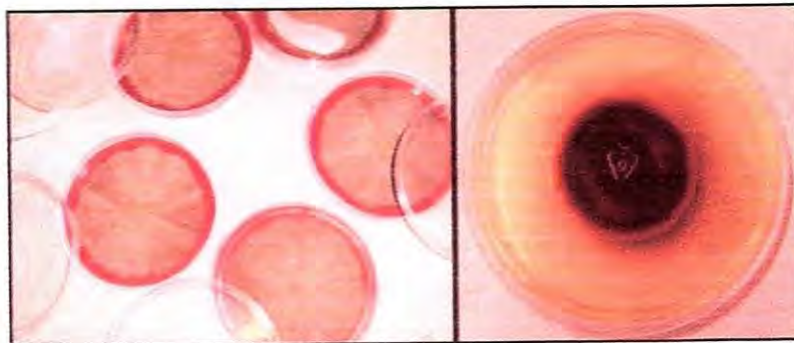


Figura 13. Nuevo aislado de hongo creciendo sobre agar PDA.

Para los estudios posteriores se hicieron cultivos monospóricos en medio de cultivo PDA y SDY, a partir de esporas provenientes del pase por insecto del nuevo aislado fúngico. El pase por insecto comprende la infección de insectos (caminantes) de *P. ficus* con esporas del hongo y el reaislamiento del hongo a partir de piojos micados.

Caracterización morfológica de la cepa.

Las colonias durante los primeros días de cultivo, tanto en medio PDA como en agar dextrosa sabouraud (SDY), lucen blancas y poco abultadas, con una velocidad de crecimiento radial de 0.025 cm hr^{-1} . Esta velocidad fue similar a la reportada para *Penicillium purpurogenum* en ciertos medios de cultivo (Mendez-Zabala *et al.*, 2007). La observación directa al microscopio de sus conidios mostró que estos eran prácticamente esféricos a diferencia de los conidios ovalados de *M. anisopliae* (Figura 14).

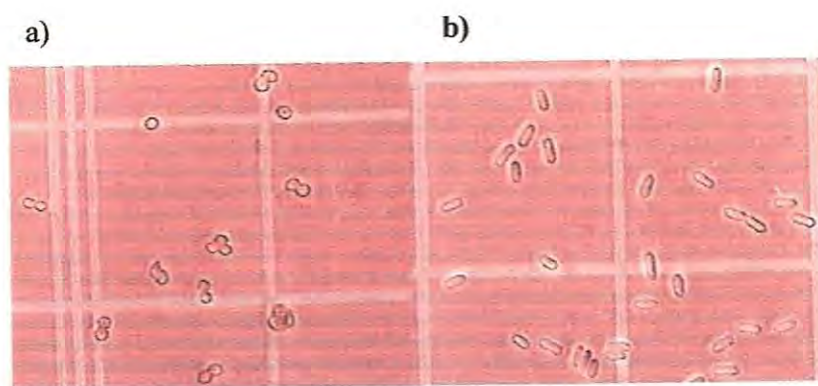


Figura 14. a) Conidios del nuevo aislado fúngico; b) conidios de *M. anisopliae* cepa MaAB (magnificación 400x)

Su identificación a nivel de género se realizó mediante observación directa al microscopio de las estructuras reproductivas (Figura 15). Se observó la formación de conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas o fiálides, biverticiladas, con los conidióforos prominentes, formando largas cadenas de conidios esféricos. Estas estructuras son características del género *Penicillium* (Humber, 1998), aunado al color verde azulado de los conidios, también característico del género (Webster, 1986). Otros géneros de hongos como *Paecilomyces* y *Geosmithia* forman esporas en conidióforos ramificados; sin embargo, a diferencia del género

Penicillium sus colonias son de color blanco o beige y sus esporas presentan tonalidades parduzcas (Webster, 1986).

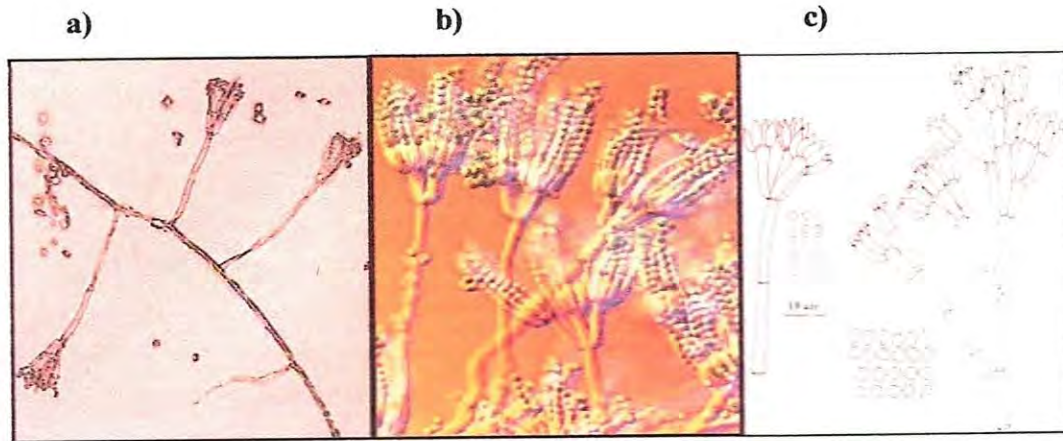


Figura 15. a) Estructuras reproductivas del nuevo aislado fúngico (magnificación 100x); b) estructuras reproductivas del nuevo aislado mostrando métulas, fiálides y conidios (magnificación 200x); c) estructuras reproductivas características del género *Penicillium*, mostrando râmulas, métulas, fiálides y conidios (tomado de Samson *et al.*, 1984)

Pruebas confirmatorias de patogenicidad.

Las pruebas confirmatorias de patogenicidad de *Penicillium* spp. se realizaron sobre larvas de *Tenebrio molitor* y *Galleria mellonella*; utilizando para los bioensayos tres repeticiones con diez larvas cada una. Los insectos se colocaron en cajas petri y se alimentaron con avena mezclada con miel durante el tratamiento. Se utilizó una dosis simple del orden de 1×10^7 esporas/ml. La suspensión de esporas se realizó en tween 80 al 0.05%. Después del tratamiento, las cajas petri con los insectos se colocaron en un lugar oscuro y a los diez días se contabilizaron los insectos vivos y muertos, dando un promedio de 70% de mortalidad en *Tenebrio molitor* (Figura 16). En *Galleria mellonella*

no se presentó mortalidad debido a que este insecto cambió su cubierta al día siguiente y de esta manera no se dio la invasión del insecto por el hongo.

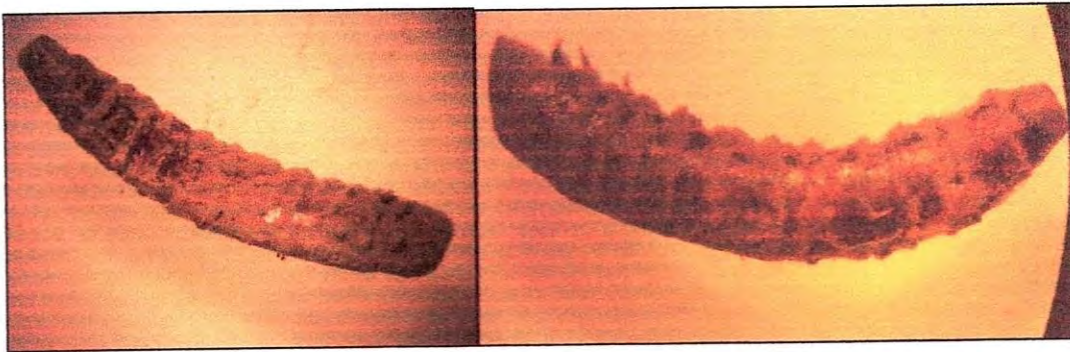


Figura 16. Larvas de *Tenebrio molitor* micosadas por *Penicillium* spp.

BIBLIOGRAFÍA

- Alean, C.I. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus sociales* Bondar (Homóptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Bogotá, D.C. Colombia. Facultad de Ciencias Básicas, Microbiología Agrícola y Veterinaria. Pontifica Universidad Javeriana. Tesis de Licenciatura. 107 pp.
- Amaya, R.I. 2006. Control biológico del piojo harinoso (*Planococcus ficus*) con hongos entomopatógenos. Estudios preliminares. Instituto Tecnológico de Ciudad Obregón, Sonora. México. Tesis de Licenciatura. 60 pp.
- Amaya, R.I. 2009. Efecto del envase, la formulación y las condiciones de almacenamiento en la vida de anaquel de los conidios aéreos de *Beauveria bassiana*. Hermosillo, Sonora, México. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Tesis de Maestría. 55 pp.
- Ansari, M.A.; S. Vestergaard, L. Tirry, and M. Moens. 2004. Selection of a highly virulent fungal isolate, *Metarhizium anisopliae* CLO 53, for controlling *Hoplia philanthus*. Journal of Invertebrate Pathology. 85(2): 89-96.
- Ansari, M.A.; M. Brownbridge, F.A. Shah, and T.M. Butt. 2007. Efficacy of entomopathogenic fungi against soil-dwelling life stages of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, in plant-growing media. Entomologia Experimentalis et Applicata. 127(2): 80-87.

- Asaff, A.; Y. Reyes, V.E. López, y M. de la Torre. 2002. Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. Centro de Investigación y Estudios Avanzados. Avance y Perspectiva. 21: 291-295.
- Barnett, H. and B. Hunter. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th Edition. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- Becerra V.; M. González, M.E. Herrera, y J.L. Miano. 2006. Dinámica poblacional de *Planococcus ficus* sign. (Hemiptera: pseudococcidae) en viñedos. Mendoza, Argentina. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. 38(1):1-6.
- Bellotti, A; B. Arias, O. Vargas, J. Reyes, y J. Guerrero. 2002. Insectos y ácaros dañinos a la yuca y su control en la yuca en el Tercer Milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Compilación y dirección: Bernardo Ospina, Hernán Ceballos. CLAYUCA. Cali Colombia. 160-203 pp.
- Bentley, W.J.; F. Salmo, J. Granett, R.J. Smith, L. Varela, and A. Purcell. 2000. Grape vine mealybug. UC Pest Management Guidelines. UC DANR Publication 3339. 123-128 p.
- Bentley, W.J.; W.W. Cone, K.M. Daane, and N.M. Korfanta. 2002. Mealybugs in North America vineyards. En: L.T. Wilson and T.J. Dennehy (Eds.). Vineyard Pest Management. Pergammon, Oxford, UK.
- Burges, H. D. 1998. Formulation of Microbial Biopesticides. Klumer Academic Publ. London. 458 p.

- Cantu, A.; A. Mata, A.A. Fu-Castillo, y M. De La Torre. 2004. Control microbiano *in vitro* del piojo harinoso de la vid (*Planococcus ficus*) con *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Verticillium lecani*. Memorias XXVII Congreso Nacional de Control Biológico. 87-92 p.
- Charnley, A.K. 1997. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. En: Wicklow/Sodertröm (eds.). The Mycota IV. Environmental and Microbial Relationships. 185-201 pp.
- Chernaki-Leffer, A.M.; D.R. Sosa-Gomez, and L.M. Almeida. 2007. Selection for entomopathogenic fungi and LD50 of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. for the Lesser Melaworm *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleptera: Tenebrionidae). Revista Brasileira de Ciencia Avícola. 9(3): 187-191.
- Corral, G.; A. Romero, C. Radrigan, and T. Zaviezo. 2006. Las virtudes de los hongos entomopatógenos. Agronomía y forestal. 30: 12-15.
- Cruz, C. 2000. Control Biológico de Plagas en la Zona del Caribe. En: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/cruzspan.htm>.
- Daane, K.M.; A.L. Levin, M. Bianchi, W.J. Bentley, P.A. Phillips, G.Y. Yokota, K.S. Hogen, and L.E. Caltagirone. 1996. Natural enemies of grape, long tailed and obscure mealybugs. 1995-96. Research report for California Table grapes. Vol. XXIV. Summ. 17.5 p .
- Daane, K.M.; Malakar-kuenen, R.; Bentley, W.J. and Guillen, M. 2002. Mealybugs in California Vineyards. In: H. González H., A. Fu C. y R. Baez S. (eds). Simposio Internacional Piojos Harinosos. XXV Congreso Nacional de Control Biológico. 28-23 pp.

- Daane, K.M. and W. Bentley. 2003. Vine mealybug. University of California Cooperative Extension. En: <http://vinemealybug.ucckac.edu/>.
- Daane, K.M.; W. J. Bentley, and E. A. Weber. 2004. Vine Mealybug: A formidable pest spreads throughout California vineyards. *Prac. Winery Vineyard Mag.* 3:35-40.
- De Bach, P. 1968. *Control Biológico de las Plagas de Insectos y Malas Hierbas*. Ed. Continental, México D.F, México. 916 p
- De Borbón, C.M.; O. Gracia, and G.S. Gómez. 2004. Mealybugs and grapevine Leafroll-Associated Virus 3 in Vineyards of Mendoza, Argentina. *American Journal of Enology and Viticulture*. 55: 283-285.
- Faria M.R.D. and S. P. Wraight. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*. 43: 237-256.
- France, A.; M. Gerding, A. Sandoval, S. Espinosa y E. Vivanco. 1999. *Patología de Insectos*. Serie Quilamapu N° 122. Ed. INIA Quilamapu, Chillán, Chile. 119 p.
- Fu-Castillo, A.A.; G. Osorio, A. Márquez; G. Martínez, J. L. Miranda, y J. Grageda. 2001. Diagnóstico de piojo harinoso en vid en la Costa de Hermosillo, Sonora. Reporte técnico inédito. CECH-CIRNO-INIFAP.
- Fu-Castillo, A.A. y J. Grageda. 2002. Control biológico del piojo harinoso de la vid *Planococcus ficus* en Hermosillo, Sonora. In: H. González H., A. Fu C. y R. Baez S. (eds.). *Simposio Internacional Piojos Harinosos, XXV Congreso Nacional de Control Biológico*. 22-27 pp.

- Fu-Castillo, A.A.; G. Osorio, J.L. Miranda, J. Grageda, A. Márquez y G. Martínez. 2002. Manejo integrado de piojo harinoso de la vid. Folleto técnico 24. CECH-INIFAP.
- Fu-Castillo, A.A.; H. González, y K.M. Daane. 2005. Los piojos harinosos de la vid. INIFAP-CIRNO-CECH.
- Geiger C.A. and K. M. Daane. 2001. Seasonal movement and distribution of the grape mealybug (Homoptera: Pseudococcidae): Developing a sampling program for Dan Joaquin Valley vineyards. *Journal Economic Entomology*. 94(1): 291-301.
- Godfrey, K.; K.M. Daane, W.J. Bentley, R. Gill and R. Malakar-Kuenen. 2002. Mealybugs in California Vineyards. University of California. Agric. Bat. Resources. Pub. 21612. 14 pp.
- Godoy, J.C.; R.E. Valera, C. Guédez, L.M. Cansales, y C. Castillo. 2007. Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 24: 415-425.
- Gomes, M.; N. Tinti and L. Alves. 1997. Characterization of new biotypes of P157 strain of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, got by treatment with gamma radiation. *Boletín Micológico*. 12(1-2): 41-48.
- González D. 1996. Biological control of the vine mealybug in the Coachella Valley. Research report 1995-96. California Table grapes. Summ. 15. Fresno, California. 6 pp.

- González D. 1998. Biological control of the vine mealybug in the Coachella Valley. California Table Grape Commission Annual Report. 26:4.
- González, H.R. 1983. Chanchitos blancos de la uva de mesa *Pseudococcus maritimus* y *Pseudococcus obscurus* (Homoptera:Pseudococcidae). En: Manejo de plagas de la vid. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agrícolas. (13):44-50.
- González, H.R. 1991. Chanchitos blancos (Homóptera:Pseudococcidae), una nueva plaga de ciruelos en Chile. Revista Frutícola 1:3-7.
- González, H.H. 2000. Piojos harinosos (Homóptera: Pseudococcidae) de importancia agrícola en México. Memorias Curso de Plagas de Importancia Agrícola en México. Hojas Mimeografiadas.
- González, H.R.; G.J. Poblete, y G.P. Barria. 2001. El Chanchito blanco de los frutales en Chile, *Pseudococcus viburni* (Signoret) (Homóptera:Pseudococcidae). Revista Frutícola. 22(1):17-26.
- González, H.R. 2002. Degradación de plaguicidas en huertos frutales en Chile. Universidad de Chile. Serie Ciencias Agronómicas 4:164.
- Granara de Willink, M. C. 1990. Conociendo nuestra fauna II. Familia Pseudococcidae (Homóptera: Coccidae). Serie Monográfica y Didáctica N° 8, Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina. 26 p.
- Hajek, A. and R. St. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annual Review Entomology. 39: 293-322.

- Haviland, D. 2003. An Overview of vine mealybug in California. En: http://cekern.ucdavis.edu/Entomology/An_Overview_of_Vine_Mealybug_in_California.htm
- Herrera, F., M. Carballo, and P. Shannon. 1999. Eficacia de cepas nativas de hongos entomopatógenos sobre *Bermisia tabaci*, en laboratorio. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). 54: 37-43.
- Hoffmann, M.P. and A.C. Frodsham, A.C. 1993. Natural Enemies of Vegetable Insect Pests. Cooperative Extension, Cornell University, Ithaca, NY. USA. 63 pp.
- Humber, R.A. 1992. Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures: Catalog of Strains. U.S. Department of Agricultural, Research Service. ARS-110. 177 pp.
- Humber, R.A. 1998. Entomopathogenic Fungal Identification. V: APS/ESA Joint Annual Meeting Las Vegas, NV. 8-12 November 1998. Entomopathogenic fungal identification. [http://arsef.fpsnl.cornell.edu/mycology/corner/APSwkshp.pdf\(7.11.1998\):26str](http://arsef.fpsnl.cornell.edu/mycology/corner/APSwkshp.pdf(7.11.1998):26str)
- Jeffs, B.L.L.; I.J. Xavier, R.E. Matai and G.G. Khachatourians. 1999. Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolyposcladium*, and *Verticillium*. Canadian Journal of Microbiology. 45: 936-948.
- Jones R.L. 1994. Role of field studies in assessing environmental behavior of herbicides. Proc. Brighton crop protection conference. Weeds. Vol. 3. Brighton, RU. 1275-1282 pp.
- Kassa, A.; G. Zimmermann and S. Vidal. 2002. Susceptibility of *Sitophilus zeamais* (Horn) (Coleoptera:Bostrichidae) to entomopathogenic fungi from Ethiopia. Biocontrol Science and Technology. 12(6): 727-736.

- Kraiss, H. and E.M. Cullen. 2008. Efficacy and Nontarget Effects of Reduced-Risk Insecticides on *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae) and Its Biological Control Agent *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of Economic Entomology*. 101(2): 391-398.
- Kershaw, M.J. and N.J. Talbot. 1998. Hydrophobins and Repellents: Proteins with Fundamental Roles in Fungal Morphogenesis. *Fungal Genetics and Biology*. 23:18-33.
- Klotz, J.; D. González, S. Triapitsyn, K. Tollerup, y R.M. Ibarra. 2002. Resumen de Investigación sobre el Piojo Harinoso (*Planococcus ficus*) en el Valle de Coachella, California de 1994 a 2002. XXV Seminario Control Biológico. Simposio Internacional de Piojos Harinosos. 7-21 pp.
- Lacey, L.A.; A.A. Kirk, L. Millar, G. Mercadier, and C. Vidal. 1999. Ovicidal and Larvicidal of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay system allowing prolonged survival of control insects. *Biocontrol Science and Technology*. 9: 9-18.
- Lara da Costa. G.; A.M. Lage de Moraes, y P. Cuna de Oliveira. 1998. Pathogenic action of *Penicillium* species on mosquito vectors of human tropical diseases. *Journal of Basic Microbiology*. 38(5-6): 337-341.
- Larrain, P.S. y C.E. Prado. 2000. Un método efectivo y ambientalmente amigable. Control de plagas chupadoras a través del riego. *Revista Tierra Adentro*. 30: 18-20.
- Liu T.X. and P.A. Stansly. 1995. Toxicity and repellency of some biorational insecticides to *Bemisia argentifolii* on tomato plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 74(2): 137-143.

- Liu T.X. and P.A. Stansly. 1996. Toxicological effects of selected insecticides on *Nephaspis oculatus* (Col., Coccinellidae), a predator of *Bemisia argentifolii* (Hom., Aleyrodidae). *Journal of Applied Entomology*. 120(6):369-373.
- Lord, J.C. and R. W. Howard. 2004. A proposed role for the cuticular fatty amides of *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelidae) in preventing adhesion of entomopathogenic fungi with dry-conidia. *Mycopathologia*. 158: 211-217.
- Lucero, A.M.; L.A. Peña, and T. Bacca. 2004. Evaluación de la actividad biocontroladora de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Ancognatha scarabaeiodes* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Corpoica*. 5(1): 43-48.
- Luz, C.; M.H.H. Tai, A.H. Santos, L.F.N. Rocha, D.A.S. Albernaz, and H.H.G. Silva. 2007. Ovicidal Activity of entomopathogenic hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidad Federal de Goiás. *Journal of Medical Entomology* 44(5): 799-804.
- Macarena, G.G.; A.I. France, and E.A. Cisternas. 1999. Evaluation of chilean strains of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* against *Otiorhynchus sulcatus* Fab. (Coleoptera: curculionidae). *Agricultura Técnica (Chile)*. 60(3): 216-223.
- Macías. H.H. 1993. Manual práctico de viticultura. 1^{er}. ed. Trillas. México. 112p.
- Malakar-Kuenen, R.; K.M. Daane, W.J. Bentley, G.Y. Yokota and L. Martín. 2001. Population dynamics of the vine mealybug and its natural enemies in the Coachella and San Joaquín Valleys. University of California. *Plant Protection Quarterly*. 11:1-3.

- Martínez, G.D. 2002. Determinación de daños en la fructibilidad en vid por el piojo harinoso, *Planococcus ficus*. Reporte técnico (Inédito). CECH-INIFAP.
- Meyerdirk, D.E.; R. Warkentin, B. Attavian, E. Gersabeck, A. Francis, M. Adams, and G. Francis. 2003. Manual del proyecto para el control biológico de la cochinilla rosada del hibisco. 2nd. Ed. United States Department of Agriculture (USDA). USA. 194 pp.
- Méndez, A.; J.C. Contreras, F. Lara, R. Rodríguez, y C.N Aguilar. 2007. Producción fúngica de un pigmento rojo empleando la cepa xerofílica *Penicillium purpurogenum* GH-2. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 60:267-273.
- Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas. (Costa Rica). 63:95-103.
- Peacock, B; K. Daane, B. Beede, D. Haines and J. Kretsch. 2000. Vine mealybug. A serious new pest in the San Joaquin Valley. University of California. Agr. and Nat. Res. Publ. IPM6-00.
- Pierick, R.L.M. 1990. Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. 324 p.
- Prado, E. and R. Ripa. 2000. Insectos y Ácaros. En: Uva de Mesa en Chile. Ed. J. Valenzuela B. INIA No. 5. Chile. 234-249 pp.
- Ripa, R. y L. Caltagirone. 1994. Implementación del control integrado de plagas. Revista Frutícola (Chile). 15(2): 67-73.

- Rivera, M.W. 2002. Control de calidad en el proceso de producción de hongos entomopatógenos y antagonistas mediante fermentación en sustrato sólido. Cartago, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Biología. 109 p.
- Rodríguez, Ch.J.; D.C. Peck, y N. Canal. 2002. Biología comparada de tres especies de salivazo de los pastos del género *Zulia* (Homóptera: Cercopidae). Revista Colombiana de Entomología. 28: 17-25.
- Rogg, H., y N. Tovar. 1998. Guía práctica de producción del entomopatógeno *Beauveria bassiana* para el control biológico de insectos plaga y vectores en Bolivia. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. Universidad Autónoma Gabriel René Moreno. Instituto de Investigaciones Agrícolas. El Vallecito. 36 p.
- Sahagún A., R. Lezama-Gutiérrez, J. Molina-Ochoa, E. Galindo-Velasco, M. López-Edwards, O. Rebolledo-Domínguez, C. Cruz-Vázquez, W. P. Reyes-Velázquez, S. R. Skoda, and J.E. Foster. 2005. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). Journal of Insect Science 5:50-58.
- Sánchez, D. y A.C. Bellotti. 1997. Patogenicidad de hongos hyphomicetes sobre *Cryptomenus bergi* F. (Hemiptera: Cynidae) chinche subterráneo de la Yuca. Revista Colombiana de Entomología. 23(1-2): 31-37.
- Samson R.A.; E.S. Hoekstra, and C.A.N. van Oorschot. 1984. Introduction to food-borne fungi (2nd ed). Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn (Netherlands).
- Samson, R.A.; H.C. Evans, and J.P. Latgé. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer Verlag, Berlin Heidelberg. New York.

- Sha P.A., and J.K. Pell. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61: 413–423.
- Tanada, Y. and H. Kaya. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press. San Diego, California. (USA). 666 p.
- Trujillo, Z.; R.P. Pérez, D. Borroto, y E. Concepción. 2003. Efectividad de hongos entomopatógenos y *Bacillus thuringiensis* sobre *Thrips palmy* Karny en el cultivo del pepino. *Fitosanidad*. 7(4): 13-18.
- Vidal, C.; L.A. Lacey, and J. Fargues. 1997. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* (*Deuteromycotina: Hyphomycetes*) against *Bemisia argentifolii* (*Homoptera: Aleyrodidae*) with a Description of a Bioassay Method. *Journal of Economic Entomology*. 90(3): 765-772.
- Walton, V.M. 2003. Development of an integrated pest management system for vine mealybug, *Planococcus ficus* (Signoret) in vineyards in the Western Cape Province. South Africa. Tesis de doctorado. University of Stellenbosch, South Africa.
- Webster J. 1986. *Introduction to fungi*. 2nd Ed. Reprint. Cambridge University Press. 669 pp.
- Wraight, S.P.; R.I. Carruthers, C.A. Bradley, S.T. Jaronsky, L.A. Lacey, P. Word, and S. Galaini–Wraight. 1998. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 71: 217-226
- Zavaleta-Mejía, E. 1999. Control Biológico de Fitopatógenos. En: X Curso Nacional de Control Biológico. Colegio de Postgraduados. Montecillo. México. 162-163 pp.