

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Efectividad de *Lecanicillium lecanii* Z. para el Control de *Trialeurodes vaporariorum* W. en Plantas de Frijol

Por:

FREDY HERRERA AGUAYO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México

Marzo 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Efectividad de *Lecanicillium lecanii* Z. para el Control de *Trialeurodes vaporariorum*
W en Plantas de Frijol

Por:

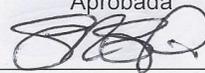
FREDY HERRERA AGUAYO

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada



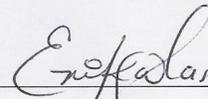
Dr. Sergio Rene Sánchez Peña

Asesor Principal



M.C. Denisse Ramírez Rodríguez

Coasesor



M.C. Erika Lizzeth Ramos Salas

Coasesor



Dr. Leobardo Bañuelos Herrera

Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Marzo 2015

Dedicatoria

Este trabajo lo dedico a Dios por permitir realizar a lo largo de este tiempo mis sueños caminando de manera lenta pero siempre segura, lo dedico a mis Padres Dolores Aguayo e Hipólito Herrera por su apoyo incondicional durante mi tiempo de estudiante donde pude lograr todas las metas propuestas al principio de este gran sueño. A mi hermano Marco P. Herrera por estar siempre a mi lado apoyándome, lo dedico a mis amigos de los cuales siempre su amistad me ayudo con motivación para seguir en el camino siempre compartiendo experiencias de vida.

MORRITAS RULES UAAAN FOREVER.

Agradecimientos

- Le agradezco principalmente a Dios de donde siempre provenía mi fuerza para levantarme de cada tropiezo y a quien siempre en sus manos puse mis planes al llegar a esta ciudad.
- Agradezco a mis Padres Hipólito Herrera V. y Dolores Aguayo Yáñez quien gracias a su amor, oraciones y compañía siempre me ayudaron.
- Agradezco a mis hermanos Marco P. Herrera A., Monserrat Herrera A. y Hernán Herrera de los cuales siempre obtuve una sonrisa que me ayudo a salir adelante.
- A mi asesor el Dr. Sergio R. Sánchez Peña del cual obtuve apoyo académico, personal y un gran amigo.
- Mi Asesora la M.C. Erika L. Ramos Salas por su incondicional apoyo durante el proceso de tesis, gracias por estar allí y apoyarnos siempre.
- A la M.C. Dennis Ramírez Rodríguez gracias por su apoyo académico, personal y su amistad, gracias por confiar en mí.
- A mis amigos de los cuales recibí sonrisas, apoyo, su amistad, gracias a todos en verdad.
- Gracias a mi compa Fabián Quintero con el cual formamos una amistad duradera y siempre buscar lo principal que eran las damas.

- Gracias a Mi compa el Boni por apoyar esta causa y siempre rolar buenas experiencias.
- A mi gran amiga Livier Guizar G. la güerita consentida, siempre apoyándome en las buenas y en las malas, gracias Livier.
- Gracias a Rosa Isela Santiago gracias por todo y cada una de las palabras recibidas de tu parte por el gran cariño incondicional y ese apoyo duradero, gracias Rosy también dedico mi trabajo a ti por ser la personas que me acompaña diariamente.
- Gracias a la cámara de los ILUMINATI'S con los cuales tuvimos experiencias de vida, viajes, fiestas, lágrimas risas y amor. I MISS YOU GUYS SO MUCH.
- Gracias al departamento de Parasitología y a mi ALMA MATER la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Gracias a GreenCorp, Agrobiological Control, por apoyarme con este proyecto llamado TESIS.

Resumen

Efectividad de *Lecanicillium lecanii* Z. para el Control de *Trialeurodes vaporariorum* W en Plantas de Frijol

Trialeurodes vaporariorum, conocida como Mosquita Blanca de los Invernaderos (MBI) es una plaga muy común en una gran variedad de cultivos hortícolas y en invernaderos y para su control existen diferentes herramientas como: el Manejo Integrado de Plagas (MIP) donde se ve desde la prevención de daños por el insecto y hasta el último recurso que es el uso del control químico como alternativa de control. Debido al uso de insecticidas o agentes químicos para el control de plagas ha aparecido un gran número de casos de resistencia adquirida por los diferentes mecanismos de defensa en los insectos. En el presente trabajo se usa una alternativa biológica para la reducción de poblaciones y control de *T. vaporariorum* W. a nivel invernadero e *in vitro*, usando el hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii* Z., evaluando su patogenicidad a través de soluciones de esporas (1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8) preparadas para su aplicación sobre los estadios ninfales de *T. vaporariorum* en dos sitios experimentales *in vitro* e invernadero.

L. lecanii logra reducir poblaciones de MIB en más de un 50 % de las poblaciones tratadas en ambos sitios experimentales (laboratorio e invernadero). En los análisis estadísticos *L. lecanii* muestra diferencias significativas en los tratamientos, donde se tiene la mejor respuesta en la dosis baja (1×10^6) con una mejor respuesta en el invernadero. En cuanto a las fechas de aplicación, la última fecha de aplicación en ambos sitios experimentales mostro una mejor reducción de la población de MIB, esto porque el hongo cuenta con el tiempo suficiente para completar su ciclo biológico. Un factor importante en el experimento con *L. lecanii* es la temperatura y la humedad (riego) debido a que el hongo requiere niveles favorables para su desarrollo.

Es por ello que los trabajos de tesis se realizaron en dos sitios diferentes así para mantener la temperatura y humedad (riego) en la parte *in vitro* y enfrentarse a condiciones naturales en invernadero. Y fue en invernadero donde *L. lecanii* logra mostrar mayor virulencia en ninfas de *T. vaporariorum* logrando ser más efectivo en este lugar para el control de poblaciones de MBI. Las dosis utilizadas son recomendables para posteriores aplicaciones así como para la formulación de bioplaguicidas a base de *L. lecanii*.

Palabras clave: *Trialeurodes vaporariorum*, *Lecanicillium lecanii*, Resistencia, *in vitro*, insecticidas, invernadero.

Índice General

Capítulo 1	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Mosquitas Blancas.....	1
1.3 Clasificación de <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	1
1.4 Clasificación taxonómica de <i>T. vaporariorum</i>	2
1.5 Biología y hábitos.....	2
1.5.1 Ciclo biológico de <i>T. vaporariorum</i>	2
1.5.2 Diferencias entre <i>T. vaporariorum</i> y <i>Bemisia tabaci</i>	4
1.5.3 Daños causados por <i>T. vaporariorum</i>	4
1.5.4 Perdidas económicas.....	5
1.5.5 Perdidas económicas en México.....	6
1.6 Control biológico.....	6
1.6.1 Control biológico de <i>T. vaporariorum</i>	6
1.6.2 Control legal.....	7
1.6.3 Control cultural.....	7
1.6.4 Control químico.....	8
1.6.5 Resistencia.....	8
1.6.6 Resistencia cruzada.....	8
1.6.7 Resistencia por comportamiento.....	9

1.6.8 Resistencia morfológica.....	9
1.6.9 Resistencia no metabólica.....	9
1.6.10 Resistencia metabólica.....	9
1.6.11 Resistencia natural.....	10
1.7 Hongos Entomopatógenos.....	11
1.8 Principales Hongos entomopatógenos en mexicano.....	11
1.9 <i>Lecanicillium lecanii</i>	12
1.9.1 Ubicación taxonómica <i>L. lecanii</i>	12
1.9.2 Origen de <i>L. lecanii</i>	12
1.9.3 Fisiología.....	14
1.9.4 Actividad entomopatogénica.....	14
1.9.5 Reportes de <i>Lecanicillium lecanii</i> en México.....	16
1.9.6 Importancia.....	16
Capítulo 2.....	18
2.1 Justificación.....	18
Capítulo 3.....	19
3.1 Objetivos.....	19
3.1.1 Objetivo generales.....	19
3.1.2 Objetivos específicos.....	19
Capítulo 4.....	20
4.1 Materiales y métodos.....	20

4.1.2 Ubicación del experimento.....	20
4.2 experimento <i>in vitro</i>	20
4.2.1 Medios de cultivo.....	20
4.2.1.1 Medio Tenebrio.....	20
4.2.1.2 Medio arroz.....	21
4.2.1.3 Medio SDY.....	21
4.3 Conteo de esporas.....	22
4.4 Infección en larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	22
4.5 Bioensayo de eficacia <i>in vitro</i> con <i>L. lecanii</i>	23
4.6 Ensayo de bioeficacia de <i>L. lecanii</i> en invernadero.....	25
4.6.1 Preparación del suelo para siembra de frijol.....	25
4.6.2 Método de siembra.....	25
4.6.3 Infestación de plantas con <i>T. vaporariorum</i>	26
4.6.4 Aplicación de <i>L. lecanii</i>	26
Capítulo 5.....	28
5.1 Resultados y discusión.....	28
5.2 Medios de cultivo.....	28
5.3 Bioensayo de eficacia <i>in vitro</i> con <i>L. lecanii</i>	30
5.4 Mortalidad por dosis en laboratorio.....	32
5.5 Ensayo de bioeficacia de <i>L. lecanii</i> en invernadero.....	34
5.6 Mortalidad por dosis en invernadero analizados por Anova.....	36

5.7. Temperatura de los sitios experimentales.....	37
Capítulo 6.....	41
6.1 Conclusiones.....	41
Capítulo 7.....	42
7.1 Bibliografía.....	42
7.2 Referencias web.....	48
Capítulo 8.....	49
8.1 Anexos.....	49
8.2 Datos originales del experimento.....	49
8.2.1 Datos de bioensayo <i>in vitro</i>	49
8.2.2 Datos originales del invernadero.....	51
8.3 Datos transformados para el análisis estadístico.....	54
8.4 Análisis estadístico.....	57
8.4.1 Datos invernadero porcentaje de mortalidad SAS.....	57
8.4.2 Datos bioensayo porcentaje de mortalidad SAS.....	62

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	3
Figura 2. Ciclo infeccioso de los hongos entomopatógenos.....	16
Figura 3. Materiales para la preparación del medio Tenebrio.....	21

Figura 4. Conteo de esporas de <i>L. lecanii</i>	22
Figura 5. Aplicación de esporas de <i>L. lecanii</i> sobre larvas de <i>T. molitor</i>	23
Figura 6. Concentraciones de esporas 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8	24
Figura 7. Invernadero de entomología UAAAN.....	25
Figura 8. Solución de esporas <i>L. lecanii</i>	27
Figura 9. Matraz Erlenmeyer con Medio Tenebrio.....	28
Figura 10. Medio arroz.....	29
Figura 11. Cajas Petri con SDY.....	30
Figura 12. Bioensayo con <i>T. vaporariorum in vitro</i>	30
Figura 13. Diferentes estadios de <i>T. vaporariorum</i> infectados con <i>L. lecanii</i>	31
Figura 14. Gráfica de la mortalidad de <i>T. vaporariorum</i> por las dosis de <i>L. lecanii</i> en invernadero.....	33
Figura 15. . Gráfica de mortalidad de <i>T. vaporariorum in vitro</i>	35
Figura 16. Gráfica de mortalidad de <i>T. vaporariorum</i> por <i>L. lecanii in vitro</i>	36
Figura 17. Gráfica de mortalidad de <i>T. vaporariorum</i> en invernadero.....	38
Figura 18. Esporulación y crecimiento de <i>L. lecanii</i>	39
Figura 19. <i>Aspergillus</i> sp.....	40
Figura 20. Gráfica de las temperaturas invernadero y laboratorio.....	41

Índice de cuadro y tablas

Tabla 1. Composición química del Tenebrio.....	28
Tabla 2. Valores de Pr <i>in vitro</i>	32
Tabla 3. Análisis de comparación de medias según la fecha de muestreo por prueba de Tukey <i>in vitro</i>	32
Tabla 4. Análisis de comparación de medias (ninfas infectadas) según el tratamiento aplicado por prueba de Tukey <i>in vitro</i>	33
Tabla 5. Anova de aplicación de <i>L. lecanii in vitro</i> , para la última fecha de evaluación (día 8 después de la aplicación).	34
Tabla 6. Valores de Pr en invernadero.....	36
Tabla 7. Análisis de comparación de medias según la fecha de muestreo por prueba de Tukey en invernadero.....	36
Tabla 8. Análisis de comparación de medias según el tratamiento aplicado por prueba de Tukey en invernadero.....	37
Tabla 9. Anova de aplicación de <i>L. lecanii</i> en invernadero, para los datos de la última fecha de evaluación (día 12 después de la aplicación).....	38
Tabla10. De temperaturas de invernadero y laboratorio.....	42

Capítulo 1

1.1 Introducción

1.2 Mosquitas blancas

Las moscas blancas son consideradas como la principal plaga a nivel mundial. Existen casi 1200 especies de moscas blancas (Homóptera: Aleyrodidae) de las cuales la mayoría son consideradas plaga, algunas de ellas primarias o secundarias dependiendo del cultivo. Uno de los problemas fitosanitarios de mayor connotación en los últimos 10-15 años ha sido, sin duda, las afectaciones causadas en diversos cultivos por las grandes poblaciones de mosquita blanca de las diferentes especies que existen. La mosca blanca de los invernaderos, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), Hemíptera: Aleyrodidae es una plaga difundida mundialmente que causa pérdidas de rendimiento por ingestión de la savia del floema. Además, favorece la producción de fumagina, causando disminuciones importantes del valor comercial de los frutos (Johnson *et al.*, 1992) así como transmisión de fitopatógenos.

1.3 Clasificación de *Trialeurodes vaporariorum*

Existen varios puntos de vista para la clasificación de este grupo de insectos. Algunos autores hacen una distinción entre el orden Homóptera y el orden Hemíptera y los tratan por separado; sin embargo otras alternativas como la adoptada por Nomina Insecta Nearctica evitan utilizar el término Hemíptera y utilizan el término Heteróptera. En Norteamérica se ha propuesto un orden Hemíptera conformado por los subórdenes: Heteróptera y Homóptera (Borrer *et al.*, 1989).

1.4 Clasificación taxonómica de *T. vaporariorum*

La clasificación utilizada en el presente texto es la propuesta por Borror *et al.*, 1989:

Reino: Animalia

Phyllum: Artrópoda

Clase: Hexápoda

Subclase: Insecta

Orden: Hemíptera

Suborden: Homoptera

Familia: Aleyrodidae

Género: *Trialeurodes*

Especie: *Trialeurodes vaporariorum*

1.5 Biología y hábitos

1.5.1 Ciclo biológico

Los individuos del complejo mosca blanca poseen reproducción sexual pero especies como *T. vaporariorum*, y otras de la familia Aleyrodidae pueden presentar partenogénesis de tipo telitokia (Sánchez, 1997). La hembra de *T. vaporariorum* oviposita en el envés de la hoja entre 150 y 500 huevos (Saldarriaga 1993 citado por García y Monroy, 1995) lo que varía según la planta hospedera, estos huevos se disponen en arco o en forma circular y están sostenidos por un pedicelo en la base del huevo que lo adhiere a la hoja. El desarrollo ninfal comprende cuatro instares (Vélez, 1997) que se diferencian entre sí por su tamaño y longitud; el último instar ninfal se divide en tres subestados y los dos últimos subestados juntos son denominados estado pupal importante para la identificación de *T. vaporariorum* (García y Monroy, 1995).

T. vaporariorum como el resto de la subclase insecta es poiquilotermo lo cual se

refiere a que su metabolismo depende sustancialmente de la temperatura ambiental. Pueden desarrollarse óptimamente entre los 20-30 grados centígrados, en donde el tiempo generacional se acorta y la fecundidad aumenta lo que incrementa las poblaciones. En condiciones de laboratorio la población de *T. vaporariorum* aumenta 11 a 12 veces por generación y se presenta un porcentaje de mortalidad que permite regular la densidad de la población aunque las condiciones sean óptimas para su desarrollo (Sánchez, 1997). El ciclo de vida de *T. vaporariorum* es de aproximadamente 42 días en campo según la estación (Hernández, 1972 citado por Vélez, 1997). En zonas tropicales el insecto muestra hasta 17 generaciones por año, siempre que las condiciones ambientales y el alimento lo permitan (Salguero y Gunaray, 1993). Los adultos de *T. vaporariorum* emergen de la ninfa a través de una sutura en forma de T invertida (García y Monroy, 1995). El tórax es la primera parte del cuerpo que surge, luego la cabeza, las patas y por medio de estas el insecto saca las alas y finalmente el abdomen.

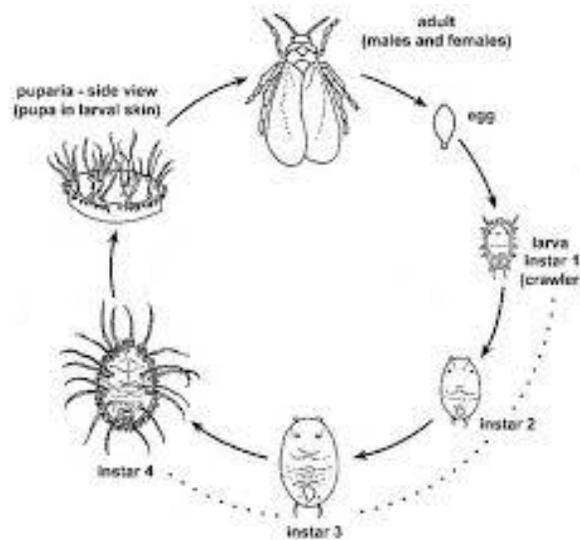


Figura 1. Ciclo biológico de *Trialeurodes vaporariorum*. (Huevo, 1, 2, 3, 4 instar, pupa y adulto).

1.5.2 Diferencias entre especies de *Bemisia* sp. y *Trialeurodes* sp.

Las principales diferencias perceptibles entre ambas especies en estado adulto son:

1. Las alas de mosquita blanca adulta en reposo están dispuestas en forma paralela y en tejado para el caso de *Bemisia*, mientras que para el caso de *Trialeurodes* forman un triángulo, están solapadas y prácticamente sobre un plano horizontal.
2. Los ojos compuestos son rojizos, pero están totalmente separados en *Trialeurodes*, mientras que en *Bemisia* están juntos.
3. Aunque ambas especies son pequeñas (1.2 a 1.6 mm), *Trialeurodes* tiende a ser más larga.

T. vaporariorum presenta adultos pequeños, cubiertos por un polvo harinoso de color blanco llamado Aleyron, producido por las glándulas cerasas ventrales; poseen antenas de siete segmentos, aparato bucal picador chupador trisegmentado (Sánchez, 1997) y pueden alcanzar una longitud entre 0,95 y 1,4 mm. El macho es de menor tamaño que la hembra y posee un pene externo entre un par de arpones (Vélez, 1997).

T. vaporariorum presenta cuatro placas cerosas abdominales en los machos y dos en las hembras; el parronquio o pulvilio tarsal está engrosado y recubierto con espínulas y microsetas en la parte inferior de la pata (Gill, 1990). La venación de las alas anteriores está reducida a las venas Costal, Subcostal, Radial y ocasionalmente a las Cubitales (Vélez, 1997).

1.5.3 Daños en cultivos causados por *Trialeurodes vaporariorum*

T. vaporariorum afecta los cultivos como pepino, berenjena, sandía, melón, pimiento, tomate, chile, frijol, calabacita entre otras hortalizas, debido al daño mecánico y alimenticio que causa, la excreción de melazas lo cual favorece el desarrollo de fumagina causada por el hongo *Capnodium* sp. (Byrne *et al.*, 1990) y a

la transmisión de virus. Recientemente se ha encontrado que algunos virus transmitidos por *T. vaporariorum* son especies de Crinivirus dentro de los que hasta el momento se han identificado cuatro especies relacionadas con esta mosca blanca. Dichos virus causan síntomas que incluyen amarillamiento intervenal de las hojas, lo cual está asociado a reducción de la capacidad fotosintética de la planta, hojas quebradizas, reducción en los rendimientos y senescencia prematura. Las mencionadas especies de virus incluyen el virus pseudoamarillo de la remolacha (BPYV), el virus de la palidosis de la fresa (SPaV), el virus infeccioso de la clorosis del tomate (TICV), y el virus de la clorosis del tomate (ToCV) (Wintermantel, 2005).

Entre otros virus más comunes transmitidos por mosquita blanca se encuentran: en las solanáceas, el virus chino del tomate (con sus siglas en inglés TLCV), el virus moteado del tomate (ToMoV), el virus del chile jalapeño (PJV), el virus dorado del pimentón serrano (PSGMV), y el virus rugoso de la hoja de tomate (TLCrV); en cucurbitáceas, el virus de enrollamiento de las hojas de las cucurbitáceas (CuLCV), y el virus del amarillamiento y achaparramiento de las cucurbitáceas (CYSDV) (Ortega 2008 a).

1.5.4 Pérdidas económicas

Aunque es difícil cuantificar adecuadamente el impacto causado por las moscas blancas sobre la producción, se ha demostrado que *B. tabaci* ha causado pérdidas anualmente por más de US \$ 500 millones en la producción agrícola de USA, durante los últimos 15 años (Byrne y Bellows, 1991; Perring *et al.*, 1993; Gerling, 2002). En el caso de *T. vaporariorum* en Colombia los cultivos más afectados son frijol, tomate, habichuela, cucurbitáceas y papa entre otros (Bustillo *et al.*, 1986; Rodríguez *et al.*, 1996; López-Ávila y García, 2000; Quintero *et al.*, 2001).

1.5.5 Perdidas económicas en México

En 1994 en el Valle del Fuerte la mosquita blanca de la hoja plateada (MBHP) causó pérdidas totales en 10% de la superficie sembrada con soya (López, 1995). En el sur de Sonora, 127 mil hectáreas fueron afectadas drásticamente por la mosquita

blanca reduciendo el rendimiento promedio de 2.1 a 1.3 ton/ha lo que provocó, que para 1995 sólo se sembraran 27 mil hectáreas (Castillo *et al.*, 1995).

En Sinaloa, este insecto ocasiona pérdidas mayores a 80% en superficies de tomate que se establecen en etapas tardías (enero, febrero, marzo, etc.), época en que se incrementa la población del insecto, ocasionando una fuerte incidencia de virosis en este cultivo (García-Quintero 2015).

1.6 Control Biológico

El control biológico es una tecnología que introduce o manipula poblaciones de organismos benéficos en los cultivos agrícolas para disminuir la población de las plagas y evitar que causen daño a los vegetales. Bajo este principio los organismos benéficos son enemigos naturales que tienen capacidad de atacar y matar a los organismos que dañan a las plantas cultivadas. Esta tecnología se ha aplicado para el control de insectos, ácaros, caracoles, algunos vertebrados, así como algas, hongos, hierbas, arbustos y árboles (SENASICA 2015).

1.6.1 Control biológico de *T. vaporariorum*

Mosquita blanca tiene gran habilidad para generar resistencia a los insecticidas rápidamente; la brevedad de su ciclo de vida y la partenogénesis facultativa contribuyen en este sentido. Esa es una de las principales razones que el uso de sistemas de control biológico resulta económicamente más rentable que el control químico.

El control biológico por conservación puede ser una opción más de control de esta plaga, es posible permitir la acción de parasitoides de ninfas de mosca blanca presentes entre los que se encuentran *Encarsia pergandiella*, *Encarsia* sp., *Eretmocerus haldemani* y un *Scelionido* sp., que en conjunto pueden llegar a parasitar hasta el 70 % de ninfas de plaga, y algunos depredadores como *Crysopa* spp. y entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii* o *Paecilomyces fumosoroseus* (Bravo y López, 2007; López-Ávila, 2006).

1.6.2 Control legal

Dado que la mosquita blanca es de alto riesgo para la Olericultura y Floricultura se estableció el plan de emergencia contra la mosquita blanca , con fundamentos en los artículos 9,12 y 18 de la ley Federal de Sanidad Vegetal de los Estados Unidos Mexicanos, que administra la dirección de Sanidad Vegetal de SAGARPA, que emite la norma NOM-020-FITO-1995. Que establece la campaña contra la mosquita blanca, con el fin de evitar la dispersión de esta plaga, para regular la movilización de productos vegetales, que contempla la Norma Oficial Mexicana, establecido como requisito previo a la movilización de productos que representa riesgo de diseminación de la plaga, el certificado fitosanitario para la movilización nacional (DGSV, 2004).

1.6.3 Control cultural

Las prácticas culturales por su naturaleza preventiva juega un papel importante dentro de los programas de manejo integrado de *T. vaporariorum* sin embargo debido a la dificultad de evaluación por métodos convencionales, prácticas como la rotación de cultivos, manejo de residuos de cultivo y malezas, han recibido poca atención de los investigadores. Los agricultores no han adoptado prácticas culturales como: barreras vivas, altas densidades de siembra, cobertura con plásticos y cultivos trampa porque aplica cambios significativos en sus cultivos, sin embargo, han adoptado otras prácticas como; periodos libres de cultivo y varias formas protectoras (Hilje *et al.*, 2001).

La fecha de siembra es la principal estrategia dentro del manejo de la plaga impactada la curva de crecimiento mediante fechas tempranas de siembra lo anterior, con el fin de que no coincida la fase exponencial de la plaga con mayor susceptibilidad del cultivo (Hilje *et al.*, 2001).

1.6.4 Control químico

Los insecticidas son herramientas útiles en el manejo integrado de plagas, importantes investigaciones han sido realizadas evaluando grupos químicos con nuevos modos de acción, debido a la aparición frecuente de resistencia a insecticidas como piretroides y fosforados (Zou y Zheng, 1988). Los neonicotinoides

representan una nueva clase muy activa contra insectos chupadores resistentes a los grupos mencionados previamente (Yamamoto y Casida, 1999). Imidacloprid, tiametoxam, tiacloprid y acetamiprid han demostrado su eficacia en el control de mosca blanca, como se recoge en la revisión de donde se proporciona una relación muy detallada de referencias anteriores que así lo han demostrado. Para el control de la mosca blanca de los invernaderos (*T. vaporariorum*) en frutilla, Bi *et al.* (2002) recomienda como una herramienta importante el uso de imidacloprid y tiametoxam. (Palumbo et al. 2001).

1.6.5 Resistencia

La resistencia puede ser definida como un cambio heredable en la sensibilidad de una población plaga que se refleja en la falta repetida de un producto para alcanzar el nivel esperado de control cuando se utiliza de acuerdo con la recomendación de la etiqueta para las especies de plagas (IRAC 2015).

1.6.6 Resistencia cruzada

La resistencia cruzada ocurre cuando la resistencia a un insecticida confiere resistencia a otro insecticida, incluso cuando el insecto no ha sido expuesto a este último producto. Es evidente, pues las poblaciones de insectos plagas suelen ser grandes en tamaño y se reproducen rápidamente, siempre hay un riesgo de que la resistencia a insecticidas puede evolucionar, sobre todo cuando los insecticidas se utilizan mal o se reutilizan. Georghiou (1965) clasificó la resistencia en tres tipos: por comportamiento, morfológica y fisiológica. Donde esta última es el tipo de resistencia más importante según McNally (1962).

1.6.7 Resistencia por comportamiento

Es una disminución del contacto con el Insecticida para aumentar la probabilidad de supervivencia en un entorno tratado con insecticida, estos cambios pueden implicar una menor tendencia a entrar en las casas rociadas o una mayor tendencia a alejarse de las superficies tratadas una vez que se hace el contacto. Se trata de un mecanismo de resistencia menor en comparación con los otros mecanismos (Hemingwa y Ranson, 2005).

1.6.8 Resistencia morfológica

La resistencia morfológica, es un mecanismo físico de resistencia y contempla muchos casos de penetración reducida que causan resistencia en los insectos la velocidad de penetración depende de las características moleculares del insecticida y de las propiedades del integumento del insecto, las cuales varían considerablemente entre los estadios de vida y de una especie a otra. Una penetración demorada provee un mayor tiempo para la detoxificación de una dosis tomada (Brattsten *et al.*, 1986). Resistencia fisiológica: Con fines de manejo, este tipo de resistencia se agrupa en dos mecanismos (Resistencia metabólica y no metabólica). Según Miller (1988).

1.6.9 Resistencia no metabólica

Son cambios en sensibilidad del sitio activo, en la tasa de penetración, almacenamiento o excreción, así como en el comportamiento o la forma de los insectos (Miller, 1988).

1.6.10 Resistencia metabólica

Resistencia metabólica es el mecanismo más común y a menudo se presenta el mayor desafío. Los insectos utilizan sus sistemas enzimáticos internos para descomponer los insecticidas. Las cepas resistentes pueden poseer niveles más altos o formas más eficientes de estas enzimas. Además de ser más eficiente, estos sistemas enzimáticos también pueden tener un amplio espectro de actividad (es decir, que pueden degradar muchos insecticidas diferentes), (Irac 2015).

Cuando se involucran cambios enzimáticos en la vía metabólica del insecto llega a ser modificada detoxificándose el insecticida o negando el metabolismo del compuesto aplicado en su forma tóxica la forma más importante de resistencia metabólica incluye la multifunción oxidasas, las glutatión-transferasas y las esterasas (Miller, 1988).

1.6.11 Resistencia natural

Actualmente se sabe que las poblaciones de organismos cambian sus frecuencias génicas y genotípicas debido a la acción de varias fuerzas evolutivas en donde la más importante es la selección natural (Falconer, 1989). Por lo tanto, la quimiodiversidad de las plantas o diversidad fitoquímica, es una característica de la vida en la Tierra. Los organismos vivos producen miles de estructuras de compuestos con bajo peso molecular, se estima que se han descrito más de 200,000 estructuras (Harborne, 2000; Picherski y Gershenzon, 2002). Toda la diversidad fitoquímica implícita en esas matrices biológicas tienen efectos en los organismos que interactúan con las plantas (Langenheim, 1994; Poelman *et al.*, 2008). Dado a que enfrentan a múltiples herbívoros y patógenos simultánea o secuencialmente (Linhart, 1991), se piensa que los metabolitos secundarios que se encuentran actualmente en las plantas son producto de la coevolución (difusa o directa) con sus enemigos naturales (herbívoros y plagas) y sus mutualistas (Lason *et al.*, 2011). Muchos insectos son capaces de desintoxicar potencialmente metabolitos secundarios, utilizando monooxigenasas del citocromo P450 y glutatión S-transferasa; por ejemplo, xantotoxina induce la expresión de P450 en *Helicoverpa zea* (Li, 2000).

1.7 Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos poseen extrema importancia en el control de insectos, virtualmente todos los insectos son susceptibles a las enfermedades fungosas y existen aproximadamente 700 especies y alrededor de 100 géneros de hongos entomopatógenos. Dentro de los más importantes se mencionan: *Metarhizium spp*, *Beauveria spp*, *Aschersonia spp*, *Entomophthora spp*, *Zoophthora spp*, *Erynia spp*, *Eryniopsis spp*, *Akanthomyces spp*, *Fusarium spp.*, *Hirsutella spp.*, *Hymenostilbe spp*, *Paecilomyces spp* y *Verticillium spp*, pertenecientes a la clase Zygomycetes y Ascomycetes (López y Hans Börjes, 2001).

1.8 Principales hongos entomopatógenos en México

En México, los hongos entomopatógenos en la producción de bioinsecticidas son principalmente *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii* (= *Verticillium lecanii*), *Paecilomyces* (= *Isaria*) *fumosoroseus*. Se viene realizando en muchos estados de la República Mexicana como Colima, Guanajuato, Oaxaca, Sinaloa, S.L.P, Tamaulipas entre otros y se usan para el control de plagas de hortalizas, poaceas y fabáceas: (Vergara, 2004).

De forma natural, cuando la humedad relativa es alta, algunos hongos atacan a las larvas de Mosca blanca; principalmente *Lecanicillium lecanii*, *Paecilomyces farinosus*, *P. fumosorosus*, y *Aschersonia aleyridis*. Se han aislado estos hongos de moscas en estados inmaduros y se producen comercialmente para su aplicación en invernaderos, considerando que se pueden propiciar las condiciones necesarias de humedad. En México se comercializa principalmente *Lecanicillium lecanii*, *Paecilomyces* (= *Isaria*), *Beauveria bassiana* y *Entomophthora virulenta*. La desventaja de aplicar *Verticillium* es que requiere de humedades relativas muy altas. Existen cepas regionales muy efectivas de entomopatógenos, es conveniente buscar información con los Comités Estatales de Sanidad Vegetal para conseguir este tipo de organismos. Y siempre hay que cuidar de no liberarlos cuando se hayan aplicado fungicidas o bactericidas. Al inicio del cultivo, cuando se hayan realizado desinfecciones o esterilizaciones, lo mejor es inocular con organismos benéficos (Muñiz y Zarco, 2011).

1.9 *Lecanicillium lecanii*

1.9.1 Ubicación Taxonómica

Phylum: Eumycota

Clase: Hyphomycetes

Subdivisión: Deuteromycotina

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género: *Lecanicillium*

Especie: *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) Gams & Zare

Tal como lo indica su nombre (*entomon*: insecto, *pathos*: enfermedad, *gennân*: engendrar), los hongos entomopatógenos son un amplio grupo de microorganismos que proveen múltiples servicios a los sistemas agroecológicos. Entre esos está la capacidad de regular las plagas para mantenerlas por debajo del umbral económico.

1.9.2 Origen de *Lecanicillium lecanii*

El año de 1898, en la isla de Java, Indonesia, Zimmerman descubrió el hongo identificado como *Cephalosporium lecanii*. Sin embargo, hacia el año 1939 el mismo hongo fue reportado como *Verticillium lecanii* por Viegas, quien hizo referencia al característico halo blanco formado sobre el insecto *Coccus viridis* (Green) (Hem: Coccidae) (Samson y Rombach, 1985, Carreño, 2003). Zare y Gams en el año 2001 propusieron que los aislamientos de *Verticillium lecanii* sean renombrados como pertenecientes al Género *Lecanicillium*.

Lecanicillium lecanii es ahora un nombre aprobado de una especie de hongos entomopatógenos, que fue ampliamente conocido como *Verticillium lecanii* (Viegas, 1939) pero ahora se entiende que es una forma anamórfica en el grupo de Cordyceps de géneros en la familia Clavicipitaceae.

Los insectos se infectan cuando entran en contacto con las esporas del hongo que luego crecen e invaden el cuerpo, por lo tanto se consumen los órganos

internos, conduciendo a su muerte. En la horticultura y la agricultura *L. lecanii* a veces se utiliza como insecticida biológico para el control de plagas como la mosca blanca, trips y pulgones.

Este hongo que es utilizado como agente de control biológico, se usa para el control de insectos dañinos a las plantas; es muy efectivo y provoca en el insecto la pérdida de sensibilidad, dificultad de movimientos, obstrucción mecánica de los conductos respiratorios, agotamiento de las reservas, interrupción de los órganos y parálisis. (EcuRed 2015).

L. lecanii (Ascomycota: Hypocreales) es un importante patógeno de áfidos, mosca blanca, trips y escamas, que considerando su alta virulencia ha sido desarrollado como agente de control biológico o micoinsecticida (Hall, 1981; Deshpande, 1999; Shah y Pell, 2003). Los micoinsecticidas constituyen un porcentaje muy pequeño del total del mercado de los insecticidas (Tamez *et al.*, 2001). Una consideración importante en el desarrollo de micoinsecticidas es que éstos, comparados con los insecticidas organosintéticos requieren de más tiempo para matar a los insectos, tiempo durante el cual los insectos infectados pueden causar daños a los cultivos (St. Leger *et al.*, 1996). El incremento en la virulencia de *L. lecanii* puede lograrse mediante el entendimiento de los mecanismos de patogénesis, la modificación genética de factores de la virulencia y la formulación de productos que permitan reducir el inóculo y el tiempo de mortalidad de los insectos (St. Leger *et al.*, 1996).

1.9.3 Fisiología

El hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii* Z. Gams y Zare (Deuteromycete: Moliniales), es un hongo imperfecto que se reproduce asexualmente por conidias, las cuales son pequeñas, hialinas, cilíndricas o elipsoidales y redondeadas, con medidas que varían de 2.3 a 10 milimicras de largo por 1-2.5 milimicras de ancho; estas conidias se encuentran insertadas en los extremos de conidióforos erectos, con fiálides colocadas de manera verticilar. Es un hongo de amplia distribución que

puede ocasionar epizootias de gran magnitud en regiones de clima tropical y subtropical, así como en los ambientes cálidos y húmedos.

Lecanicillium lecanii posee un amplio rango de hospederos atacando insectos de los órdenes Homoptera, Coleoptera, Diptera y Collembola entre otros (Mier *et al.*, 1991; Bustillo *et al.*, 1988; Samson y Rombach, 1985 citados por García 1996).

1.9.4 Actividad entomopatogénica.

Se ha reportado que este hongo tiene un alto poder infectivo sobre mosca blanca especialmente sobre los instares uno y dos (Fransen, 1990; García, 1996).

El proceso infectivo del hongo se cumple en tres fases: La primera fase de germinación de conidios y penetración de hifas al cuerpo del huésped dura de 3 a 4 días. La penetración del hongo en el huésped ocurre a través de la cutícula. Cuando la penetración se da por la cutícula intervienen lipasas, quitinasas y proteasas. El tubo germinativo de la conidia invade directamente, produciendo unas estructuras abultadas llamadas apresorios que penetran la epicutícula, dando lugar a cuerpos hifales, los cuales se desarrollan en el hemocele y circulan en la hemolinfa (Fransen, 1990; Cloyd, 2004).

La patogenicidad del hongo sobre los insectos depende de una compleja relación entre la habilidad del hongo para penetrar la cutícula y el fortalecimiento del sistema inmunológico del insecto para prevenir el desarrollo del hongo. Esta relación se debe a factores muy concretos, la penetración cuticular y las reacciones inmunes. El desarrollo del hongo sobre el insecto puede ser influenciado por la eficacia de los hemocitos en encapsular y melanizar el patógeno.

Casi siempre los hematocitos se agregan al lugar de la penetración cuticular, formando algunas veces nódulos alrededor de los conidios. En el interior de los insectos la germinación usualmente procede de esporas que están fuera de la agregación de hematocitos (Cloyd, 2004).

La segunda fase es la invasión de los tejidos por parte del micelio del hongo hasta causar la muerte del insecto, dura de 2 a 3 días. Durante el proceso de

invasión del hongo se producen una gran variedad de metabolitos tóxicos, *Lecanicillium lecanii* produce metabolitos secundarios, como son: ácidos Hidroxicarboxílicos, ácido dipicolínico, Fenilalanina anhidra, 2,6 Dimetoxi-P-Benzoquinona, Aphidicolina, ácido picolínico. Los síntomas de la enfermedad en el insecto son la pérdida de sensibilidad, descoordinación de movimientos y parálisis. Cuando el insecto muere queda momificado. Algunas veces se pueden presentar zonas de pigmentación localizadas que corresponden a los sitios de penetración de los conidios en el tegumento (Cloyd, 2004).

Finalmente sigue la tercera fase, la cual es la esporulación y el inicio de un nuevo ciclo. El micelio del hongo se observa primero en las articulaciones y partes blandas de los insectos y en días posteriores se incrementa a todo el cuerpo hasta finalmente cubrirlo. Tras la muerte del insecto y bajo unas condiciones de humedad relativa alta las conidiosporas pueden extenderse a través del cuerpo cubriéndolo con material fungoso característico. En el caso de las moscas blancas, las ninfas y pupas muertas son de color amarillo pálido a oscuro, rugosas y ya sin brillo, y pasado un tiempo puede verse una pelusa fúngica blanca sobre los insectos afectados (Rodríguez *et al.*, 1996).

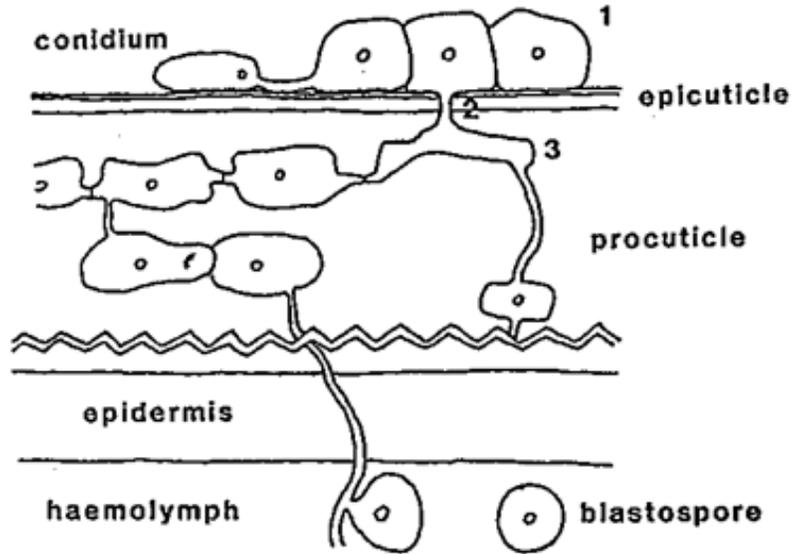


Figura 2. Ciclo infeccioso de los hongos entomopatógenos. 1.- Adhesión de la espora a la cutícula. 2.- Penetración en el hemocele. 3.- Replicación del hongo en el hemocele.

1.9.5 Reportes de *Lecanicillium lecanii* en México

En México hay una diversidad de estudios acerca de *L. lecanii* principalmente usado como agente de control biológico lo cual permite obtener bases sobre la patogenicidad de este hongo. La patogenicidad de *L. lecanii* presentadas en mecanismos enzimáticos utilizando cutícula de *Sphenarium purpurascens* como inductor de las enzimas degradadoras de la cutícula en un medio mineral impregnado en bagazo de caña (Barranco 2004).

Se observó la patogenicidad de los conidios de *L. lecanii* evaluada en los áfidos *T. aurantii* y *Aphis gossypii*. (Madrigal 2007).

1.9.6 Importancia

En la agricultura sustentable, el control biológico se ha convertido en una parte fundamental para el manejo de plagas. Los hongos entomopatógenos, entre ellos *Lecanicillium lecanii*, se han utilizado para la producción de bioinsecticidas para el control de plagas. Una de las principales razones de usar agentes microbianos para el control de plagas es la necesidad de restringir el uso de los pesticidas químicos y

orientar la agricultura hacia una actividad ecológicamente sustentable. Los bioinsecticidas han sido definidos como el uso de organismos vivos como agentes para el control de plagas, entre los que se encuentra: baculovirus, bacterias, hongos, nemátodos y protozoario (Cannon R., 1989).

Capítulo 2

2.1 Justificación

Debido al uso de insecticidas y la resistencia que se adquiere con el uso de éstos, el control biológico busca nuevas opciones para disminuir la población de insectos plaga. El presente trabajo se basa en el uso del hongo entomopatógeno *L. lecanii* como una alternativa para el control de la mosca blanca en invernadero y bajo condiciones *in vitro*, realizando actividades de siembra en condiciones de laboratorio, para lograr reactivar su virulencia y evaluar su patogenicidad en *T. vaporariorum*.

Capítulo 3

3.1 Objetivos

3.1.1 Objetivo general

Determinar *in vitro* y en invernadero, la patogenicidad de *Lecanicillium lecanii* Z. en ninfas de *Trialeurodes vaporariorum* W. en plantas de frijol.

3.1.2 Objetivos específicos

- Evaluar *in vitro*, el control de poblaciones de ninfas de *T. vaporariorum*, con la aplicación de diferentes concentraciones de esporas de *L. lecanii*.
- Evaluar en invernadero, el control de poblaciones de ninfas de *T. vaporariorum*, con tres concentraciones de esporas de *L. lecanii*.

Capítulo 4

4.1 Materiales y métodos

4.1.2 Ubicación del experimento

Este trabajo se realizó en el Departamento de Parasitología de la UAAAN y en el Laboratorio del Centro de Microbiología Aplicada en Saltillo Coahuila. Dicho trabajo se realizó en dos partes: la parte *in vitro* y la parte *in situ* (Invernadero) UAAAN.

4.2 Experimentos *in vitro*

La cepa que se utilizó corresponde a *L. lecanii* identificada por el CEMAP (Centro de Microbiología Aplicada) como V16/TBCS-1. Dicha cepa se reactivó su virulencia en medios cultivos nutritivos para su uso en posteriores experimentos, los cuales fueron: **Medio tenebrio, Medio Arroz y SDY.**

Los medios de cultivo se prepararon usando diferentes procesos de fermentación: Fermentación en Medio Líquido (FML), Fermentación en medio sumergido (FsM) y Fermentación en medio sólido (FMS).

4.2.1 Medios de cultivo

4.2.1.1 Medio tenebrio

Medio tenebrio es un medio sumergido (FsM). Se colocaron 100 ml de H₂O destilada estéril en 4 matraces Erlenmeyer a los cuales se les agrego 5 gramos de tenebrio macerado y 12.5 µl de Gentamicina 80 mg. Una vez colocados los materiales se homogenizó la mezcla agitándola constantemente durante 5 minutos, después se colocaron los matraces en la autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Después de la esterilización los matraces fueron colocados a temperatura ambiente expuesta a las horas luz del día durante 8 días.



Figura 3. Materiales para la preparación del medio Tenebrio: Mortero, Polvo de tenebrio y agua destilada, para la preparación del medio.

4.2.1.2 Medio sólido arroz

En la preparación de este medio se usaron 600g. De arroz los cuales fueron precocidos en 1 L agua a 80 °C, después se le agregaron 10 ml de hipoclorito de sodio comercial 0.3 % para desinfectar y se dejó por 5 minutos. Posteriormente el arroz se lavó con agua corriente, se escurrió y se colocó con papel secante por 10 minutos a temperatura ambiente. Al arroz lavado se agregaron X ml de caldo de soya (soya hervida en agua 150g/L), y se añadieron X μ l de antibiótico (gentamicina), 0.03 ml de Tween 80. Todo este material fue debidamente esterilizado en autoclave a 121°C durante 15min.

4.2.1.3 Medio sólido SDY

Para el medio SDY (Bioxon) se usaron, extracto de Levadura 15g, Agar Dextrosa Sabouraud 65 g y Agar Bacteriológico en 1L de H₂O. El medio fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, posteriormente el medio fue vaciado en cajas Petri y una vez que solidificó dicho medio, el hongo fue sembrado por el método de estría cruzada, bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar.

Las placas fueron incubadas condiciones de temperaturas entre 28° y 30 °C

durante 4 días y cada 24 horas se observaba su desarrollo.

4.3 Conteo de esporas de *L. lecanii*

Se utilizaron cajas con cultivos masivos de *L. lecanii*, una vez esporulados se realizó un raspado de la caja de Petri usando un portaobjeto, las esporas se diluyeron en agua y después se homogenizó la mezcla en un matraz Erlenmeyer. Después se tomaron 50 μ l de la suspensión de esporas de *L. lecanii* y se colocaron en la cámara de Neubauer para realizar un conteo bajo el microscopio compuesto en el objetivo 40X., una vez que se obtuvo el número de esporas se continuo con la infección.

Se usó la siguiente fórmula: **Esporas/ml= (x) (10⁴) (25) (10)**

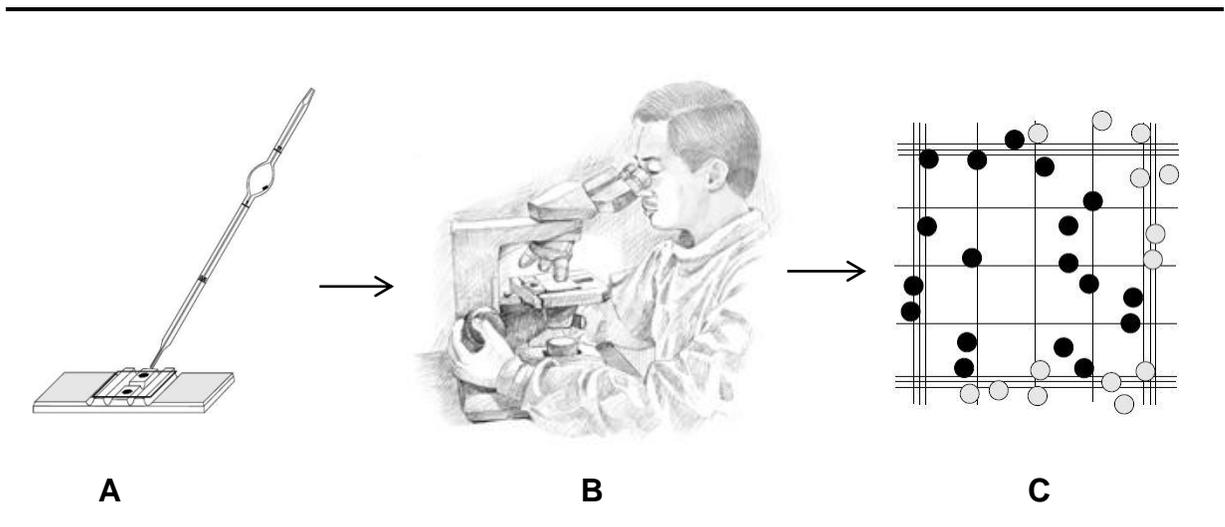


Figura 4. (A) Dilución de esporas de 50 μ l sobre cámara de Neubauer, (B) Observación de esporas en Microscopio compuesto a 40X, (C) Conteo de esporas sobres cuadrícula de cámara de Neubauer.

4.4 Infección en larvas de *Tenebrio molitor*

La infección se llevó a cabo sobre larvas de *Tenebrio molitor*, esto se logró mediante la siguiente técnica. Primero con una espátula se realizó un raspado de la

superficie de la caja Petri, la cual contenía esporas de *Lecanicillium lecanii* en el medio SDY. Se realizó un conteo de esporas en cámara de Neubauer para saber que concentración de esporas se aplicaría sobre las larvas. Se usó 1 ml de la 1×10^7 Esporas/ml de *L. lecanii* para inocular las larvas, bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, dichas larvas se colocaron en cámaras húmedas y estuvieron en observación durante 4 días a una temperatura de 28-30°C durante los cuales alcanzo su desarrollo. De allí se tomó muestra para realizar de nuevo siembras sobre placas SDY.

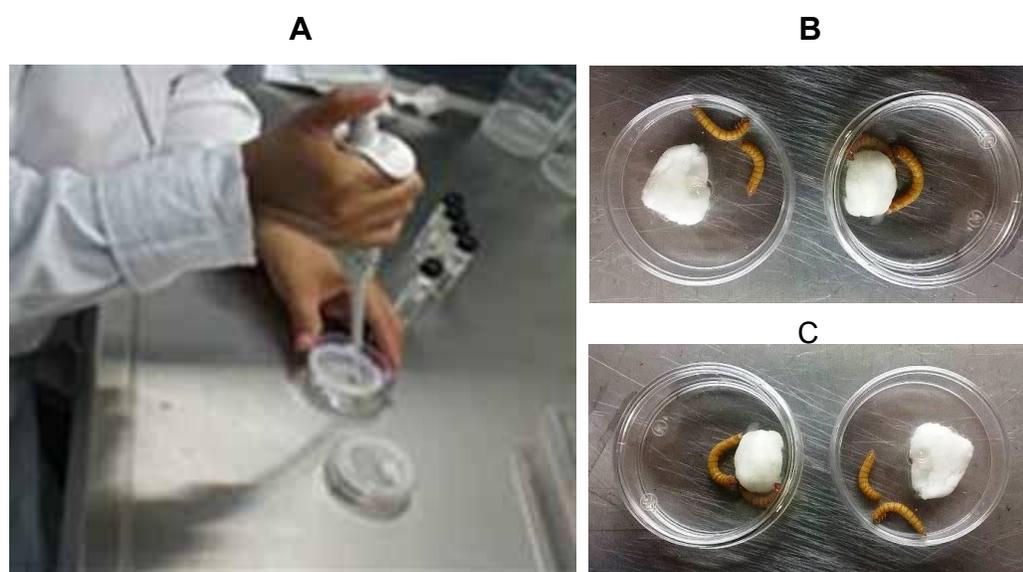


Figura 5. (A) Aplicación de esporas de *L. lecanii* sobre larvas de *T. molitor* **(B-C)** Cámaras húmedas con larvas y algodón.

4.5 Bioensayo de eficacia in vitro con *L. lecanii*

Se realizó un bioensayo con *Trialeurodes vaporariorum*, las cuales fueron colectadas en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, para dicho experimento se colectaron ninfas de mosquita blanca de los invernaderos (MBI). El experimento se estableció bajo el diseño experimental de bloques al azar, los cuales contaban de 4 tratamientos y cada uno con 5 repeticiones (las repeticiones tenían 20 ninfas de mosquitas blanca) estas fueron asperjadas con soluciones de esporas de

Lecanicillium lecanii a las concentraciones de 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 esporas/ml, teniendo como testigo un tratamiento al cual solo se le aplico H₂O destilada estéril. Se utilizaron 200 μ l para la aplicación de suspensión de esporas por repetición.

El estudio se realizó en el mes de junio durante 8 días donde se realizaron las observaciones obteniendo los siguientes resultados.

Una vez establecido el experimento y asperjado con las soluciones de esporas de *L. lecanii* Para la toma de datos los intervalos de muestreo se dividieron en 3, el primero se realizó al día 4 después de la aplicación y de allí fue al 6 y 8 día teniendo así un intervalo de tiempo de 4 días en la primera fase de muestreo y dos días en la segunda fase. Esto debido a la presencia e infestación del hongo sobre las ninfas de *T. vaporariorum*.

El bioensayo se mantuvo a una temperatura constante de 23-25° C las 24 horas durante 8 días, así mismo con la humedad necesaria para cada repetición usando algodón húmedo con agua estéril. Las ninfas se mantuvieron en observación desde el momento de la aplicación de esporas. El parámetro que se evaluó, fue la eficacia de mortalidad de *L. lecanii* sobre ninfas de *T. vaporariorum* bajo condiciones abióticas controladas.

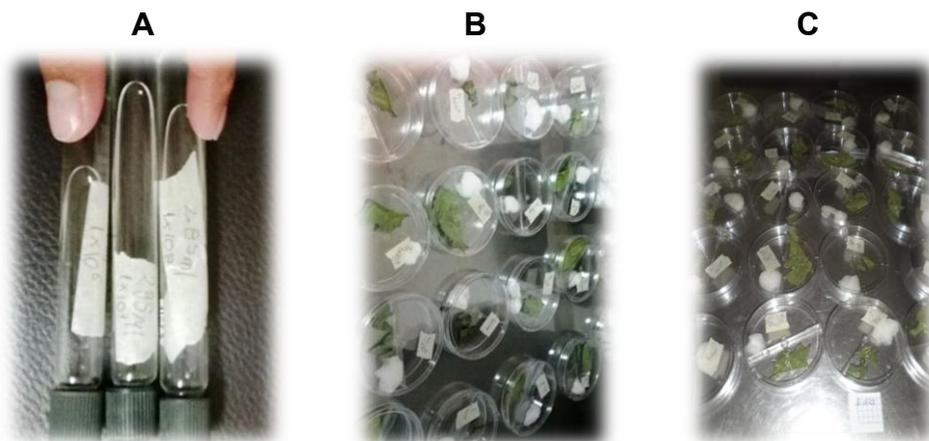


Figura 6. (A) Concentraciones de esporas 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 , **(B-C)** Bioensayo en bloques al azar con 5 repeticiones y ninfas de *T. vaporariorum*.

4.6 Ensayo de bioeficacia de *L. lecanii* a nivel Invernadero

El experimento se llevó a cabo en el invernadero de Entomología ubicado en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Se estableció un diseño de bloques al azar, el experimento contó con 20 plantas de Frijol (*Phaseolus vulgaris*) distribuidas en 4 tratamientos para realizar la comparación en diferencias de mortalidad de ninfas de *T. vaporariorum* y cada tratamiento constaba de 5 repeticiones, de donde se obtenía la unidad de muestreo (hoja) posteriormente tres tratamientos de plantas fueron asperjadas con solución de esporas de *L. lecanii* a concentraciones de 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 Esporas/ml del al cuarto tratamiento solo se le agrego agua corriente y se usó como testigo absoluto.



Figura 7. (A) Invernadero de Entomología UAAAN, **(B)** Bloques para el establecimiento del experimento.

4.6.1 Preparación del suelo para siembra de frijol

Se usó una mezcla de a base de Peat moss, perlita y suelo agrícola para establecer las plantas usadas en el experimento, la mezcla se colocó en macetas, las cuales se regaron para humedecer el suelo donde se sembraría la semilla de frijol.

4.6.2 Método de siembra

Se sembraron dos semillas de frijol por maceta, a una profundidad de 1 cm.

Las plantas se mantuvieron en constante revisión y riego para lograr un buen desarrollo y vigorosidad; una vez que se presentaron las hojas trifoliadas que fue el momento óptimo para la infestación de Mosquita blanca de los invernaderos.

4.6.3 Infestación de plantas con *T. vaporariorum*

Las plantas sanas se colocaron sobre la maleza (Asteraceae) que se encontraba cerca del invernadero, en la cual se encontraba presente *T. vaporariorum*. Las plantas de frijol fueron expuestas a la mosca blanca durante 72 horas esto para lograr que hubiera la ovoposición sobre envés de las hojas de las plantas de frijol,

Una vez transcurridas las 72 horas las plantas de frijol fueron removidas y colocadas de nuevo en el invernadero de Entomología donde se esperó el desarrollo de la mosquita blanca, este invernadero es más pequeño y específico para tratamientos de control biológico.

4.6.4 Aplicación de *L. lecanii*

Las plantas se monitorearon durante una semana y media, mientras *T. vaporariorum* alcanzaba el estadio ninfal.

Se realizó 1 aplicación de *L. lecanii*, 4 días después de la aplicación se tomaron muestras de hojas, esto fue tomando al azar una hoja de cada planta durante los tres muestreos realizados, después se llevó acabo la toma de datos de las ninfas parasitadas por *L. lecanii*, considerando 80 individuos de *T. vaporariorum* por hoja.

La variable a medir fue la mortalidad por la *L. lecanii* en las ninfas de *T. vaporariorum* con los tres tratamientos a base de hongo que se aplicó y el cuarto fue el testigo absoluto y solo se evaluó usando agua corriente para este tratamiento.

La aplicación de esporas fue asperjada directamente a la planta usando atomizadores comerciales, se aplicaron 40 ml de solución por tratamiento directamente sobre el envés de la hojas y cerciorando que se contara con la cobertura total de líquido sobre la planta.

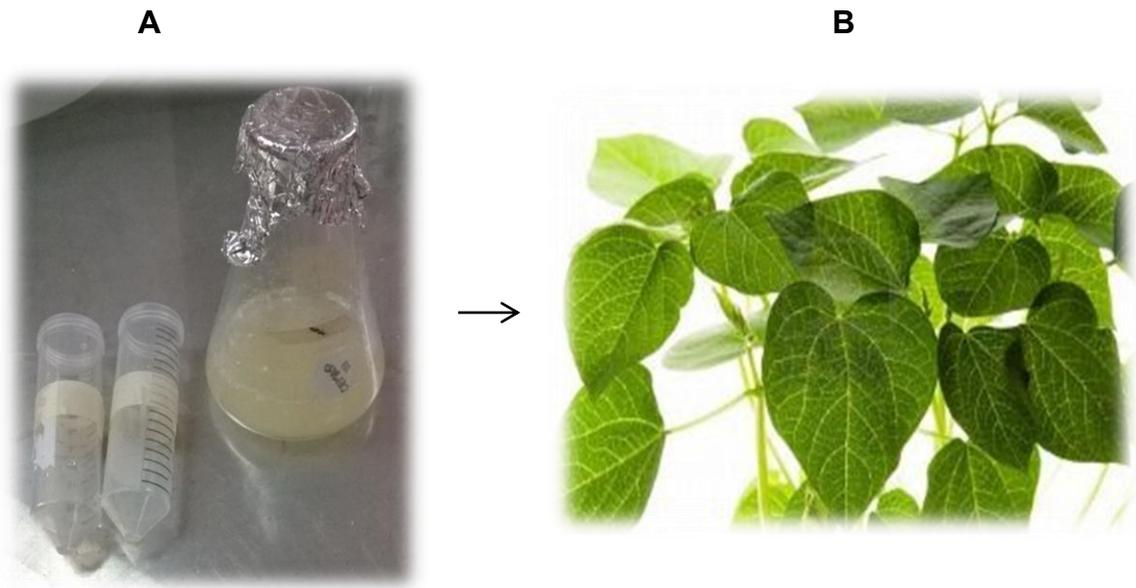


Figura 8. (A) Solución de esporas de *L. lecanii*, (B) *Phaseolus vulgaris* con ninfas de *T. vaporariorum*.

Capítulo 5

5.1 Resultados y Discusión

5.2 Medios de cultivo

Para la reactivación de la cepa de *L. lecanii* se utilizó el medio de Tenebrio, y para su reproducción se usaron los medios de arroz y SDY;

En el medio sumergido (Medio tenebrio) *L. lecanii* logra un crecimiento rápido y efectivo para su reactivación ya que cuenta con las condiciones óptimas para su desarrollo; creando un medio natural en el cual resaltan los altos niveles de proteína, calcio y fósforo; que por sí solos justifican plenamente la fama del tenebrio como “complemento alimenticio altamente indicado para todo tipo de insectívoros”. Este perfil nutritivo tiene efectos fisiológicos altamente beneficiosos sobre el crecimiento, el desarrollo y la fertilidad.

Tabla 1. Composición del tenebrio

Insecto	% Agua	% Extracto libre de Nitrógenos	% Fibra	% Grasas	% Cenizas	% Calcio	% Fósforo	% Proteínas
Tenebrio	58,02	0,47	4,28	16,00	1,00	57,34	0,27	20,23



Figura 9. (A) Matraz Erlenmeyer con Medio tenebrio, (B) *L. lecanii* sobre Medio tenebrio

Como lo muestran las fotografías pero se logra observar la capacidad de *L. lecanii* de crecer sobre *M. tenebrio* y reactivar su virulencia, en este medio el hongo desarrolla ampliamente micelio sobre la superficie donde se le inocula y posteriormente logra esporular recibiendo las condiciones ambientales para completar su ciclo, en este medio no se recomienda su reproducción masiva pues solo es medio para activar la cepa de un estado de reposo.

El medio sólido en arroz, es ampliamente utilizado en la producción masiva de hongos entomopatógenos, ya que en este medio es rico en proteína (7.4g), en Almidón (70.4g) y Lípidos (2.4g) esto en relación a un kilogramo de arroz necesarios para el crecimiento de *L. lecanii* por lo cual se obtiene una alta producción de esporas.



Figura 10. (A-B) Medio Arroz y sobre el micelio blanco de *L. lecanii*.

En las placas con SDY, se observó un mejor crecimiento del micelio y esporulación de *L. lecanii*, de estas cajas Petri se obtuvo suficiente micelio para realizar los raspados de donde se obtenían las concentraciones de esporas para realizar las soluciones de aplicación para los tres tratamientos en invernadero e *in vitro*, las cuales se usarían sobre ninfas de *T. vaporariorum*.

La producción de esporas en los diferentes raspados realizados siempre obtuvo concentraciones de 1×10^7 y 1×10^8 así que para preparar la solución más baja se realizaron diluciones y así obtener 1×10^6 . Por lo tanto comercialmente *L. lecanii*

produce una excelente cantidad de esporas para su reproducción masiva y formulación de más soluciones o productos.

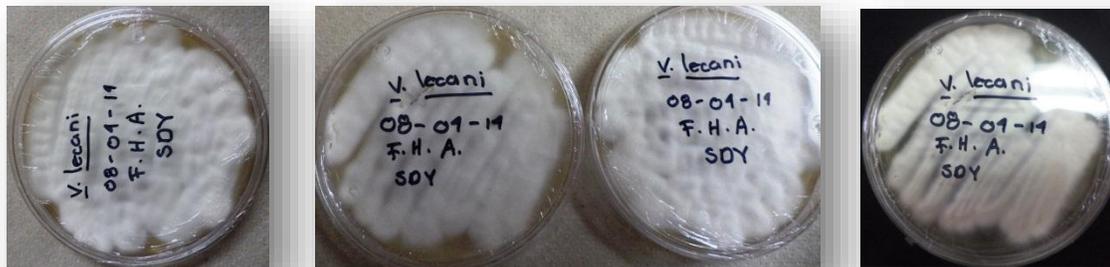


Figura 11. Cajas Petri SDY y sobre ellas micelio y esporas de *L. lecanii*. Sembrado para la obtención de esporas.

5.3 Bioensayo de eficacia (mortalidad de insectos) in vitro con *L. lecanii*

El bioensayo en laboratorio se estableció en bloques al azar con 4 tratamientos y cada tratamiento tenía 5 repeticiones, cada repetición contaba con 20 ninfas de mosquita a las cuales se les aplicaría *L. lecanii*.



Figura 12. Bioensayo con *T. vaporariorum* para evaluar la efectividad en mortalidad de *L. lecanii*

La aspersión de esporas se hizo en el mes de junio durante 8 días que se evaluó el experimento. Se aplicaron 200 µl/hoja, sobre 20 ninfas, y después se esperó 48 horas para realizar la primera observación donde los datos fueron 0%. Después del día 6 después de la aplicación de *L. lecanii* mostró las primeras mortalidades.

La mortalidad de MBI a partir del 6 día después de la aplicación, donde los intervalos de muestreo fueron de 2 días. El último día de evaluación (8 días) *L. lecanii* ya había parasitado un alto número de Mosquitas blancas. En todos los tratamientos *L. lecanii* logra causar muertes.

Fotografías (Infestación *L. lecanii*)



Figura 13. Diferentes estadios ninfales de *T. vaporariorum* parasitados por *L. lecanii* *in vitro*.

Se hizo una comparación de mortalidad entre invernadero y laboratorio, tomando en cuenta que los intervalos de tiempo para la toma de datos en invernadero fueron de 4 días y en laboratorio de 2 días.

5.4 Mortalidad por dosis en laboratorio analizados por Anova

Los agrupamientos en SAS para las tres dosis y las fechas, arrojan diferencias claras en comparación con el testigo. Las fechas y dosis fueron factores significativos ($Pr > 0.0001$) (Tabla 3-5). Pero la interacción entre tratamiento-fecha no es altamente significativa, $Pr > 0.7947$.

Tabla 2. Valores de Pr *in vitro*:

Fuente	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tra	436.6018514	145.5339505	367.47	<.0001
Fecha	11.7555631	5.8777815	14.84	<.0001
Tra*Fecha	1.2216912	0.2036152	0.51	0.7947

Tabla 3. Análisis de comparación de medias según la fecha de muestreo por prueba de Tukey *in vitro*.

*Tukey Agrupamiento	Media (transf)	Media (% orig.)	***Fecha
A	8.1479	68.5	F3
A			
A	7.7441	81.5	F2
B	7.0746	85.5	F1

* Grupos de acuerdo a Medias en Tukey, Medias transformadas, Medias originales en % de mortalidad y ** F fechas de muestreo.

A) Para los tratamientos asperjados con esporas del hongo y **(B)** para el testigo.

La Tabla 4 no muestra diferencia entre tratamientos (dosis) dejando así que en el laboratorio las tres dosis son efectivas para su aplicación.

Tabla 4. Análisis de comparación de medias (ninfas infectadas) según el tratamiento aplicado por prueba de Tukey *in vitro*.

Tukey Agrupamiento	Media (trans)	Media (% orig.)	**T
A	9.3766	68.5	media
A			
A	9.2834	81.5	alta
A			
A	8.9716	85.5	baja
B	2.9905		Testigo

* Grupos de acuerdo a Medias en Tukey, Medias transformadas, Medias originales en % de mortalidad y ** T tratamientos.

En la gráfica de mortalidad a causa de *L. lecanii* sobre las ninfas de *T. vaporariorum*, y las diferencias entre los tratamientos aplicados a nivel *in vitro*. *L. lecanii* en sus diferentes concentraciones logra alcanzar en la dosis mínima de 1×10^6 una mortalidad del más de 50% por lo cual en poblaciones bajas de *T. vaporariorum* es eficiente y por otros lados en poblaciones altas la dosis media y alta de 1×10^7 y 1×10^8 es más recomendable su uso.

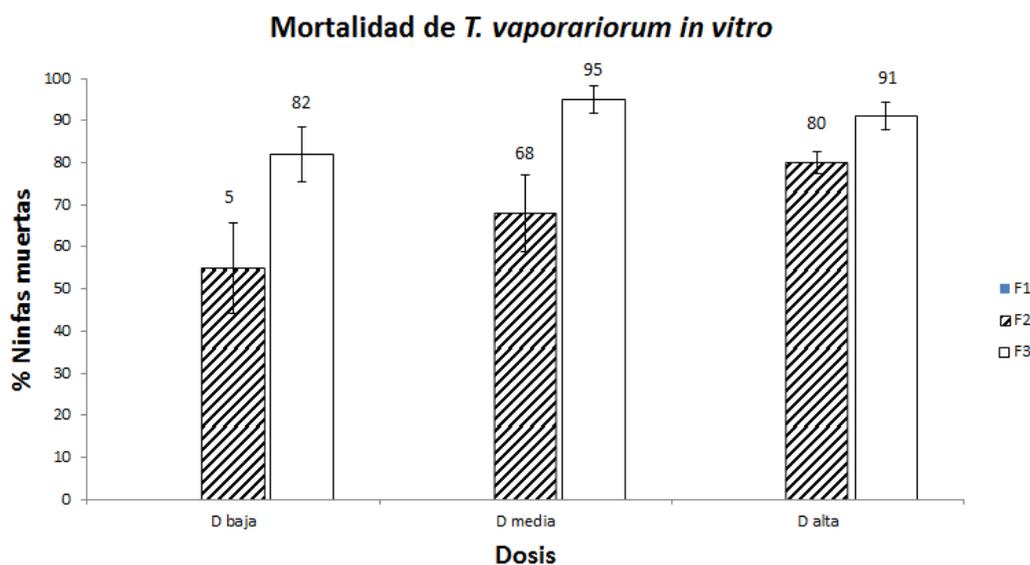


Figura 15. Gráfica de mortalidad de *T. vaporariorum* in vitro. F1, F2, F3 = Fechas de evaluación (2,4, y 8 días respectivamente) después de la aplicación. F1 = 0% mortalidad para todos los tratamientos. D baja = 1×10^6 , D media = 1×10^7 y D alta = 1×10^8 .

Tabla 5. Anova de aplicación de *L. lecanii* in vitro, para la última fecha de evaluación (día 8 después de la aplicación).

standard weighted-means analysis					
ANOVA Summary		4			
Source	SS	df	MS	F	P
Treatment [between groups]	134.2275	3	44.7425	175.54	<.0001
Error	4.0782	16	0.2549		
Ss/Bl					Graph Maker
Total	138.3057	19			

Tabla 2. Cuadro Anova de análisis estadístico de aplicación de *L. lecanii* en laboratorio.

Los valores de $P < 0.0001$ son altamente significativos en los tratamientos en laboratorio lo cual indica que hay diferencia entre tratamientos, posteriormente Tukey muestra diferencia entre un tratamiento y el otro.

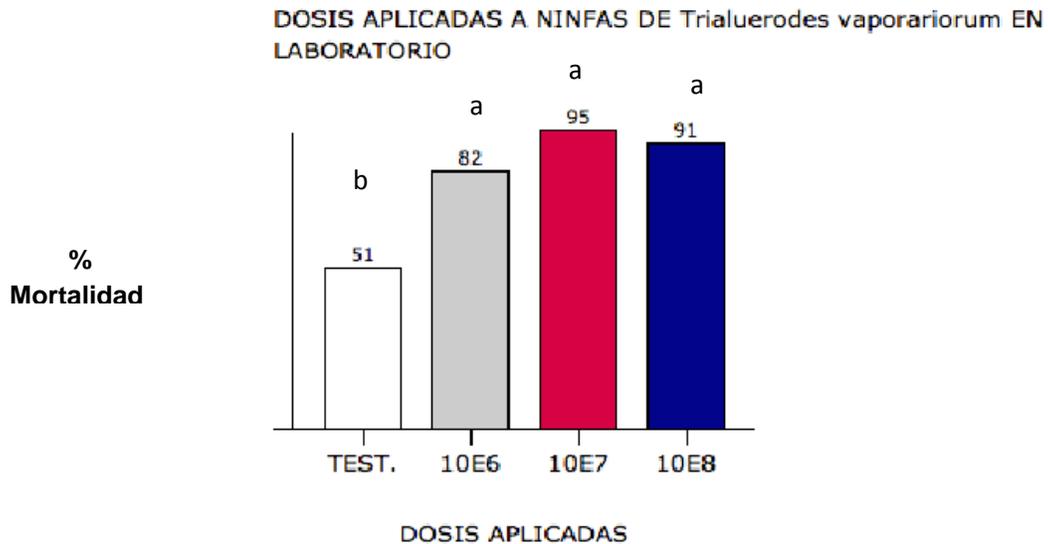


Figura 14. Gráfica de la mortalidad de *T. vaporariorum* por las dosis de *L. lecanii* en invernadero. Test = Testigo, 10E6 = Dosis baja, 10E7 = Dosis media, 10E8 = Dosis alta. Medias con la misma letra minúscula no son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0.05$).

5.5 Ensayo de bioeficacia de *Lecanicillium lecanii* en invernadero.

El experimento se estableció en bloques al azar, distribuido en cuatro tratamientos con cinco repeticiones cada uno, cada repetición con 80 ninfas de *T. vaporariorum*. De los cuatro tratamientos, a tres se les aplicó solución de esporas de *L. lecanii* y al cuarto sólo se le aplicó agua corriente. Durante los 12 días de evaluación en invernadero los intervalos de muestreo fueron de 4 días después las aplicación de *L. lecanii*. Sin embargo se mantuvieron inspecciones diarias de mantenimiento. A las 24 horas aún no se presentaba algún tipo de esporulación. Al día 4 (96 horas) ya había presencia micelial del hongo en los tratamientos y

aparecían ninfas muertas que presentaban una coloración café-marrón que oscilaban de entre 1 a 15 ninfas promedio en los tratamientos, así mismo como la eclosión de algunas pupas a adultos que quedaban atrapadas por el micelio del hongo o volaban libremente por el experimento.

5.6 Mortalidad por dosis en invernadero analizados por Anova

Los datos del invernadero analizados en SAS. Se agrupan de la siguiente manera: ($Pr > 0.2862$) la diferencia no es significativa entre tratamiento-fecha, pero nuevamente aparece diferencia altamente significativa entre tratamientos ($Pr > 0.0001$) y entre las fechas ($Pr > 0.0001$) pues a mayor dosis y mayor tiempo hay una cantidad más alta de mortalidad.

Tabla 6. Valores de Pr en invernadero

Fuente	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tra	436.6018514	145.5339505	367.47	<.0001
Fecha	11.7555631	5.8777815	14.84	<.0001
Tra*Fecha	1.2216912	0.2036152	0.51	0.7947

Por otro lado los agrupamientos de fechas se ordenan de menor a mayor en tres grupos diferentes **A-B** demostrando que la mortalidad en la última fecha de muestreo es mayor, esto debido a que *L. lecanii* tiene mejor tiempo de exposición con el insecto y así es más fácil completar su ciclo y como se mencionó anteriormente, entre mayor tiempo tenga el hongo será más virulento pues habrá mayor desarrollo y una mejor esporulación.

Tabla 7. Análisis de comparación de medias según la fecha de muestreo por prueba de Tukey en invernadero.

*Tukey Agrupamiento	Media (Trans)	Media (% orig.)	**Fecha
A	8.1479	79.91	F3
A			
A	7.7441	87.08	F2
B	7.0746	85.5	F1

* Grupos de acuerdo a Medias en Tukey, Medias transformadas, Medias originales del % de mortalidad ** F fechas de muestreo.

En invernadero se presenta mayor estabilidad, pero en el análisis por dosis comparten características en común demostrando así que cualquiera de las dosis son efectivas, este factor es considerable en la producción o formulación de un producto debido que el recurso económico para la obtención de esporas es importante, si se tiene una concentración alta al inicio no es necesario aumentar o bajar, el modificarla significaría inversión por lo cual se debe considerar ese punto, debido que las dos son estables y amigable a la condiciones ambientales.

Tabla 8. Análisis de comparación de medias según el tratamiento aplicado por prueba de Tukey en invernadero.

*Tukey Agrupamiento	Media (trans)	Media (% orig.)	**T
A	9.3766	79.91	media
A			
A	9.2834	87.08	alta
A			
A	8.9716	85.5	baja
B	2.9905		Testigo

* Grupos de acuerdo a Medias en Tukey, Medias transformadas, Medias originales en % de mortalidad ** T tratamientos.

La siguiente gráfica muestra las diferencias de mortalidad entre fecha y tratamientos en el invernadero:

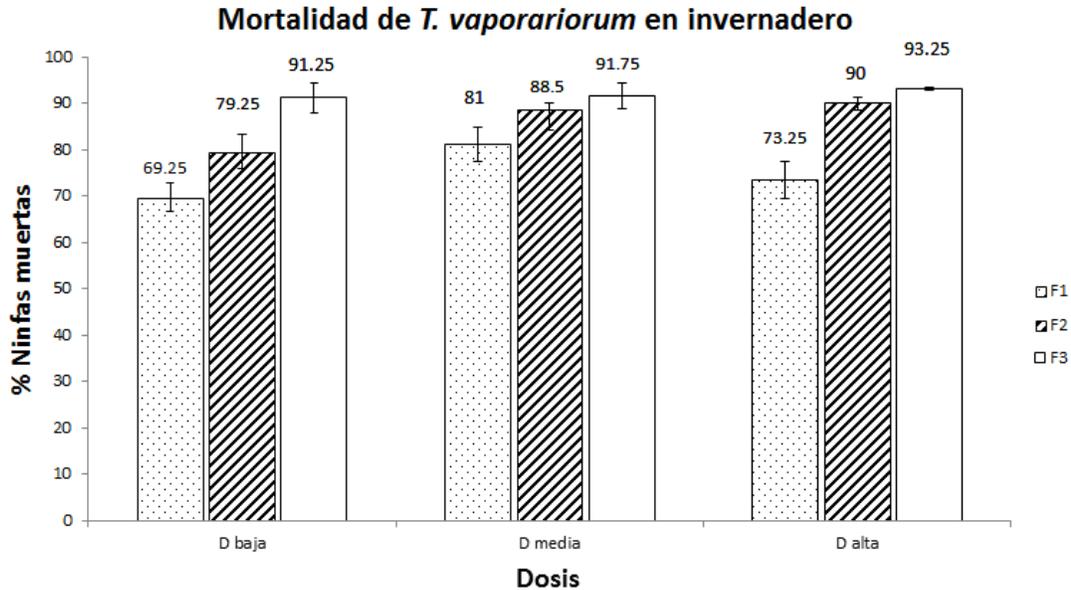


Figura 17. Gráfica de mortalidad de *T. vaporariorum* en invernadero. F1, F2, F3 = Fechas de evaluación (4,8, y 12 días respectivamente) después de la aplicación. D baja = 1×10^6 , D media = 1×10^7 y D alta = 1×10^8

Las barras de la gráfica muestra que en las 3 dosis aplicadas en laboratorio son efectivas de manera diferente pues la dosis más alta matan más, aquí se deja los criterios de importancia económica o para investigación, pues de donde se le mire se le obtiene la mejor respuesta. Solo el testigo donde la mortalidad es muy baja pues solo fue agua corriente, se puede dar por casos naturales como parasitismo, depredación o muerte natural por el medio ambiente, pues son muchos los factores que la naturaleza tiene para regular poblaciones naturales.

Tabla 9. Anova de aplicación de *L. lecanii* en invernadero, para los datos de la última fecha de evaluación (día 12 después de la aplicación).

standard weighted-means analysis					
ANOVA Summary		4			
Source	SS	df	MS	F	P
Treatment [between groups]	26.6283	3	8.8761	5.29	0.010016
Error	26.8554	16	1.6785		
Ss/Bl					Graph Maker
Total	53.4837	19			

Tabla 8. Cuadro Anova de análisis estadístico de aplicación de *L. lecanii* en invernadero.

Los valores de $Pr < 0.010016$ son significativos lo cual indica que hay diferencia entre los tratamientos, posteriormente Tukey muestra la diferencia entre uno y otro.

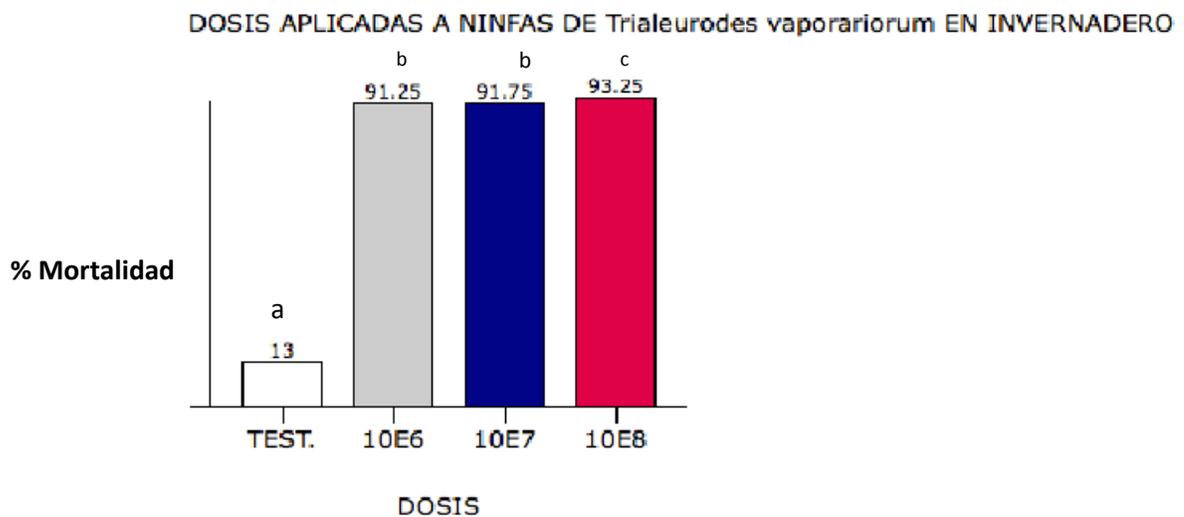


Figura 16. Gráfica de mortalidad de *T. vaporariorum* por *L. lecanii* *in vitro*. Test = Testigo, 10E6 = Dosis baja, 10E7 = Dosis media, 10E8 = Dosis alta. Medias con la misma letra minúscula no son significativamente diferentes (Tukey, $p < 0.05$).

Después de realizar el último conteo para ver la mortalidad causada por el hongo, se tomaron algunas muestras al azar para corroborar que había sido el hongo *Lecanicillium lecanii* el que había matado las ninfas de mosquitos, por lo que se pasaron a una cámara húmeda para esperar que estas esporularan o mostraran algún otro tipo de patógeno.

Se presentó *L. lecanii* (esporulación) sobre *T. vaporariorum* de tal manera el hongo completó su ciclo, así como presencia de otros patógenos como *Aspergillus* sp.

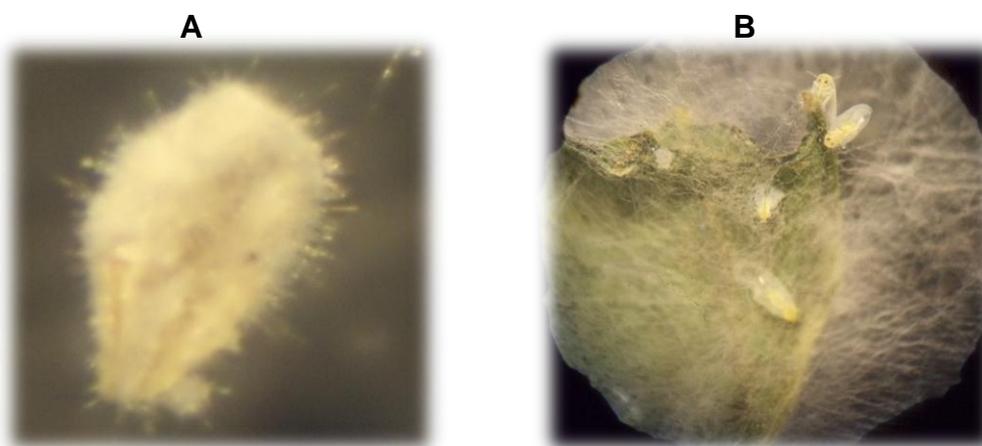


Figura 18. (A) Esporulación y crecimiento de *L. lecanii* sobre ninfa de *T. vaporariorum*, **(B)** Adultos de *T. vaporariorum* atrapados en micelio de *L. lecanii*.

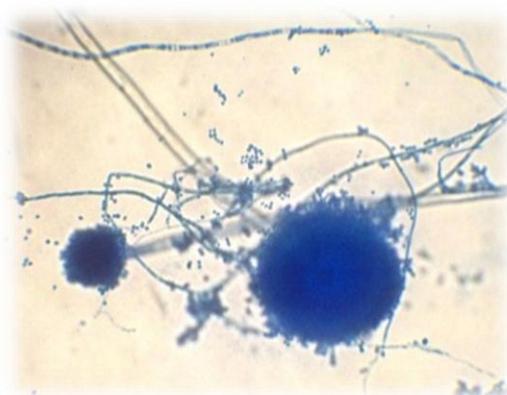


Figura 19. *Aspergillus* sp. crecido en cámara húmeda durante el bioensayo a lado de *L. lecanii*.

5.7 Temperatura de los sitios experimentales

Las temperaturas son un factor muy importante en todos los experimentos y pruebas biológicas debido a que pueden alterar o favorecer los cambios en los individuos tratados o en los organismos utilizados como control, tal es el caso de *L. lecanii* la temperatura influye muy poco como se mostró en las gráficas anteriores, sin embargo la humedad es un factor que a este hongo le favorece más. Las esporas de *L. lecanii* son más móviles dentro de moléculas de agua, y fue lo que paso en el invernadero a diferencia del laboratorio donde se usaron cámaras húmedas, en el invernadero el riego fue asperjado favoreciendo con esto a la movilidad de las esporas del hongo en la planta.

Mientras que en laboratorio la temperatura constante del laboratorio nos deja ver que el desarrollo del hongo bajo esas condiciones actúa más lento que en el invernadero donde la temperaturas fueron más alta y diferentes.

Mediante este trabajo se pueden observar patrones de comportamiento del hongo *L. lecanii* y del insecto *T. vaporariorum*.

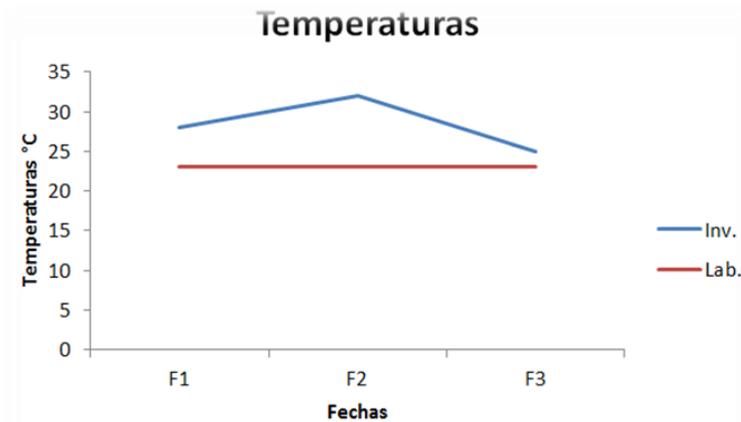


Figura 20. Gráfica de las temperaturas invernadero y laboratorio.

Tabla10 de temperaturas de invernadero y laboratorio

Temperaturas	*F 1	**F2	***F3
Inv.	28°C	32°C	25°C
Lab.	23°C	23°C	23°C

Tabla 10. *F1, **F2, ***F3 son las fechas de evaluación de los experimentos y fue tomada en grados centígrados.

Las temperaturas en el invernadero no varían y en invernadero fueron temperaturas medias, debido que hay una estabilidad a lo largo de la duración del día en este factor, la cobertura de polietileno del invernadero también hace que estas varíen un poco menos generando un microclima menos inestable que el medio ambiente en sí.

Capítulo 6

6.1 Conclusiones

A nivel *in vitro* la cepa V16/TBCS-1 de *L. lecanii* mostró una reducción de la población de *T. vaporariorum* tratada.

A nivel invernadero la cepa V16/TBCS-1 de *L. lecanii* en sus tres dosis de esporas aplicadas son virulentas y logran disminuir más de la mitad la población de *T. vaporariorum*. Por lo tanto en invernadero se obtuvo un mejor resultado que a nivel *in vitro*.

De manera comercial, *L. lecanii* es recomendable para su aplicación en invernadero para regular poblaciones de MIB.

Para formular un bioinsecticida a base de *L. lecanii* dependerá de la concentración de esporas que una compañía formuladora le sea rentable obtener sin alterar o elevar costos de producción y mano de obra.

Capítulo 7

7.1 Bibliografía

Bi, J.L., N.C. Toscano y G.R. Ballmer. 2002. Greenhouse and field evaluation of six novel insecticides against the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* on strawberries. *Crop Protection*, 21: 49-55.

Borror. D.J.; Triplehorn, C.A. and Johnson, N.F. 1989 An Introduction to study of insect. 6th . Edition. Philadelphia. New York. 639p.

Boucias, D.G. and Pendland, J.C. 1991. Attachment of mycopathogen to cuticle. In: Cole, G.T. and Hoch, H.C. (ed) 1991. The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Plenum Press, USA. pp. 101-127.

Brattsten L. B., C. V: Holyoke, J. R. Leeper and K. F. Raffa. 1986. Insecticideresistance: Challenge to pest management and basic research. *Science*. 2: 1255-1260.

Bravo M., E. y López L., P. 2007. El de agua: un chile típico de los valles de Oaxaca, Principales plagas. *Revista Agroproduce*, fundación Produce Oaxaca, A.C. Oaxaca, Mexico. 36 p.

Bustillo, A.; Gonzales, J.; Tamayo, P. 1986. Evaluación del hongo *Verticillium lecanii* en el control de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* en frijol. *Revista Colombiana de Entomología*. 23 (2): 26-31.

Byrne D.; Bellows, T. 1991. Whytefly biology. *Annual Review Entomology*. 36: 431-457.

Byrne, N. D.; Bellows, T.; Parrella, M. 1990. Whiteflies in agricultural systems. En: D. Gerling (Ed). *Whiteflies: Their bionomics, pest status and management*. Athenaeum

Newcastle, UK. pp. 227-262.

Carapia-Ruíz, V.E. 2007. Description of a new species and new records of genus *Trialeurodes* Cockerell (Homoptera: Aleyrodidae) from Mexico. *Folia Entomológica Mexicana* 46 (2): 79-84.

Deshpande, M.V. 1999. Mycopesticide Production by Fermentation: Potential and Challenges. *Critical Reviews in Microbiology* 25(3):229-243.

EcuRed. 2015. Conocimientos para todo. [www.ecured.cu/index.php/Verticillium Lecanii](http://www.ecured.cu/index.php/Verticillium_Lecanii) consulta 16/02/15.

Falconer, D.S. 1989, *Introducción to quantitative genetics*. Richard Clay Ltd., Bungay Suffolk, Great Britain pp 129-185.

García-Paez, J.M. y Monroy-Sánchez, J.C. 1995. Estudios para la cría masiva de *Amitus fuscipennis* MacGown & Nebeker (Hymenoptera: Platigastridae), Parasitoide de la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía.

García-Quintero, J. 2015. Estudio de evaluación de la efectividad biológica de Movento para el combate de ninfas de mosca blanca (*Bemisia* sp.) y su fitocompatibilidad en tomate Saladette bajo agricultura protegida. Bayer de México. [http://www.bayercropscience.com.mx/bayer/cropscience/bcsmexico.nsf/id/Abejorros_BCS/\\$file/mosca_bca.pdf](http://www.bayercropscience.com.mx/bayer/cropscience/bcsmexico.nsf/id/Abejorros_BCS/$file/mosca_bca.pdf)

García-Valente, F. y L.D. Ortega-Arenas. 2008. Capítulo 14. Mosquita blanca, *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) (pp. 167-176). En: Arredondo-Bernal, H.C. y L.A. Rodríguez del Bosque (Eds.). *Casos de Control Biológico en México*. Mundi Prensa México.

- Georghiou, G.P., 1965, Genetic studies on insecticide resistance, *adv.Pest Control Res.*, 6: 171pp.
- Gerling, D. 2002. Una reinterpretación sobre las moscas blancas. *Revista Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica.* 63: 13-21pp.
- Gerling, D. 2002. Una reinterpretación sobre las moscas blancas. *Revista Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica.* 63: 13-21pp.
- Gill, R.J. 1990. The morphology of Whiteflies. En: Gerling, D. (edit). *Whiteflies: their bionomics, pest status and management.* 1993. Intercept Ltda. 13-46 pp.
- Hall, R.A. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphid and scales. In: Burges, H.D. (ed) *Microbial Control of Pest and Plant Disease.* Academic Press, New Yourk.483-498 pp.
- Hemingway, J.; Ranson H.2005. Biology of disease vectors. Chapter41. *Chemical Control of Vectors and Mechanisms of Resistance.* Second Edition. Elsevier Academic Press. 785 pp.
- Hilje, L. Costa, H.S. and Stanli, P.A. 2001. Cultural Practices For Managing Bemisia tabaci an associated viral diseases. *Crop. Prrot.* 20:801-812 pp.
- Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science* 259: 74-77pp.
- IRAC. 2015. (Insecticide Resistance Action Committee) 2009. Susceptibility Test Methods Series: Method 5 "Bemicia. <http://www.irc-online.org/about/resistance/>. www.irc-online.org IRAC consulta 12/02/15.
- Kershaw, M.J. and Talbot, N.J. 1998. Hydrophobins and repellents: Proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal Genetic Biology* 23:18-33 pp.

- Langenheim, J. H. 1994. Higher plant terpenoids: A phyto centric overview of their ecological roles. *J. Chem. Ecol.* 20:1223-1280 pp.
- Li, X.C., Berenbaum, M.R., Schuler, MA:2000 Molecular cloning and expression of CYP6B8: a xanthotoxin-inducible cytochrome P450 cDNA from *Helicoverpa zea*. *Insect BiochemMol. Biol.* 30:75-84 pp.
- Linhart, Y. B. 1991. Disease, parasitism and herbivory - Multidimensional challenges in plant evolution. *Trends in Ecology Evolution* 6: 392-396 pp.
- López Á., A. 2006. Biología y control biológico de las moscas blancas. Programa de investigación en el manejo integrado de plagas –MIP-Corpoica. Centro de Investigación Tibaitatá, Bogotá. 13 pp.
- López Ávila, A.; García, J. 2000. Manejo integrado sostenible de moscas blancas como plaga y vectores de virus en los trópicos: reconocimiento, diagnóstico y caracterización de especies de mosca blanca como plagas en el trópico alto de América Latina. Convenio Danida – Corpoica – Ciat. Informe Final. Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas “MIP” Corpoica C. I. “Tibaitata”. Santafé de Bogotá. p. 43
- López L.V.; Hans Börje J. (2001) Biodiversidad del suelo: control biológico de nemátodos fitopatógenos por hongos nematófagos. *Cuaderno de Biodiversidad* 6: 12-15 pp.
- Miller T.A. Today 1988, Mechanism of resistance to pyrethroid insecticides parasitol; 4: SB-512 pp.
- Ortega A. L. D. 2008 a. Bioecología de las Moscas Blancas pp: 1-6. In: *Moscas Blancas: Temas selectos sobre su manejo*. Infante G., S. (ed). Editorial Colegio de Postgraduados- Mundi Prensa. México, D.F. 146 p.
- Palumbo, J.C., horowitz, A.R., Prabhaker, N., 2001. Insecticidal control and resistance management for *Bemisia tabaci*. *CropProt.* 20, 739-765 pp.

- Perring, T. M.; Cooper, A. D.; Rodriguez, R. J.; Farrar, C.A.; Bellows, T. S. 1993. Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science* 259: 74-77 pp.
- Picherski E., Gershenzon J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfume for pollinator attraction and defense. *Cur Opin Plant Biol.* 5: 237-243 pp.
- Quintero, C.; Rendón, F.; García, J.; Cardona, C.; López-Ávila, A.; Hernández, P. 2001. Especies y biotipos de moscas blancas (Homóptera: Aleyrodidae) en cultivos semestrales de Colombia y Ecuador. *Revista Colombiana de Entomología.* 27(1-2): 27-31 pp.
- Rodríguez, A.; Hiller, M.; Willians, E. 1996. Umbral de acción para la mosca blanca de los invernaderos, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae), en tomate. *Revista Colombia de Entomología.* 22 (1): 87-92 pp.
- Salguero, V. Y Gunaray, F. 1993. La Mosca Blanca. MIP-CATIE. N°4.
- Sanchez, L.M. 1997. Evaluación de las fluctuaciones de Mosca blanda *Trialeurodes vaporariorum* Westwood al introducir el parasitoide *Encarsia formosa* Gahan como alternativa del manejo de la plaga en cultivos de Rosas para exportación, en la Sabana de Bogotá. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Colombia.
- SENASICA. 2015. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB). . www.senasica.gob.mx/?id=4157. Consulta 16/02/15.
- Shah, P.A. and Pell. J.K. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61:413-423.
- pp".Enwww.iraonline.org/documents/method5.pdf (fecha de consulta: octubre 08, 2012).

- St. Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, J.M., Rizzo, W.N. and Roberts, W.D. 1996. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviridae*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Applied and Environmental Microbiology* 62(39):907-912 pp.
- Tamez, G.P., Galán, W. L.J., Medrano, R. H., Gacrcía, G. C., Rodríguez, P. C., Gómez, F.R.A. y Tamez, G.R.S. 2001. Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL* 4 (2): 143-152 pp.
- Vergara R.R. 2004. Enfoque agroecológico del empleo de Entomopatógenos para el control de plagas, conferencia dictada en el octavo Seminario de Agroecología Agromedicina y Medio Ambiente. Tunja. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. 34 pp.
- Velez, R. 1997. *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Homoptera: Aleyrodidae). En: plagas agrícolas de impacto económico en Colombia: bionomía y manejo integrado. Segunda edición. Ed. Universidad de Antioquía. 482 p.
- Wintermantel, W. 2005. Emergence of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) transmitted criniviruses as threats to vegetable and fruit production in North America. E-mail: wwintermantel@pw.ars.usda.gov.
- Yamamoto, I. y J.E. Casida.1999. Nicotinoid insecticides and the nicotinicacetylcholine receptor. Springer-Verlag, Tokyo, 300 p.
- Zou, Y.Q. y Zheng, B.Z.1988.The toxicity of some insecticides to greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*. Westw.) and monitoring of resistance. *ActaPhytophylacicaSinica*, 15:277-281pp.

7.2 Referencias web

[http://www.bayercropscience.com.mx/bayer/cropscience/bcsmexico.nsf/id/Abejorros_BCS/\\$file/mosca_bca.pdf](http://www.bayercropscience.com.mx/bayer/cropscience/bcsmexico.nsf/id/Abejorros_BCS/$file/mosca_bca.pdf), consulta 16/02/15.

www.senasica.gob.mx/?id=4157. Consulta 16/02/15.

www.irc-online.org consulta 16/02/15.

www.irc-online.org IRAC consulta 12/02/15.

www.ecured.cu/index.php/Verticillium_Lecanii consulta 16/02/15.

<http://diamantemandarin.es/> consulta 17/02/15.

<https://ingjulian.wordpress.com/bromatologia-de-alimentos/> consulta 17/02/15.

wwintermantel@pw.ars.usda.gov.

http://14.139.61.86/ebook_potato_pest/white_flies.htm

Capítulo 8

8.1 Anexos

8.2 Datos originales del experimento

8.2.1 Datos del bioensayo

Cada tabla corresponde a un tratamiento.

Testigo M	Testigol V	Total V-M	% Mortalidad
0	20	20	0
0	20	20	0
0	20	20	0
0	20	20	0
0	20	20	0

Testigo M	Testigol V	Total V-M	% Mortalidad
2	18	20	10
4	16	20	20
0	20	20	0
10	10	20	50
8	12	20	40

Testigo M	Testigol V	Total V-M	% Mortalidad
7	13	20	35
6	14	20	30
17	3	20	85
18	2	20	90
3	17	20	15

Tratamiento 2 M	Tratatmiento 2 M	Tratamiento 2 V-M	% Mortalida
0	20	20	0
0	20	20	0
0	20	20	0
0	20	20	0
0	20	20	0

Tratamiento 2 M	Tratamiento 2 V	Tratamiento 2 V- M	% Mortalida
16	4	20	80
10	10	20	50
16	4	20	80
7	13	20	35
6	14	20	30

Tratamiento 2 M	Tratamiento 2 V	Tratamiento 2 V- M	% Mortalida
18	2	20	90
20	0	20	100
17	3	20	85
13	7	20	65
14	6	20	70

Tratamiento 3 M	Tratamiento 3 V	Tratamiento 3 V- M	% Mortalidad
0	20	20	0
0	20	20	0
0	20	20	0
0	20	20	0
0	20	20	0

Tratamiento 3 M	Tratamiento 3 V	Tratamiento 3 V- M	% Mortalidad
9	11	20	45
14	6	20	70
18	2	20	90
17	3	20	85
10	10	20	50

Tratamiento 3 M	Tratamiento 3 V	Tratamiento 3 V- M	% Mortalidad
18	2	20	90
20	0	20	100
20	0	20	100
20	0	20	100
17	3	20	85

Tratamiento 4 M	Tratamiento 4 V	Tratamiento 4 V- M	% Mortalidad
0	20	20	0
0	20	20	0
0	20	20	0
0	20	20	0
0	20	20	0

Tratamiento 4 M	Tratamiento 4 V	Tratamiento 4 V- M	% Mortalidad
16	4	20	80
15	5	20	75
15	5	20	75
16	4	20	80
18	2	20	90

Tratamiento 4 M	Tratamiento 4 V	Tratamiento 4 V- M	% Mortalidad
16	4	20	80
18	2	20	90
19	1	20	95
20	0	20	100
18	2	20	90

8.2.1 Datos originales invernadero

Testigo M	Testigo V	Total V-M	% Mortalidad
1	79	80	1.25
4	76	80	5
4	76	80	5
0	80	80	0
12	68	80	15

Testigo M	Testigo V	Total V-M	% Mortalidad
1	79	80	1.25
4	76	80	5
8	72	80	10
8	72	80	10
16	64	80	20

Testigo M	Testigo V	Total V-M	% Mortalidad
9	79	80	11.25
4	76	80	5
8	72	80	10
15	65	80	18.75
16	74	80	20

Tratamiento 2 M	Tratamiento 2 V	Tratamiento 2 V-M	% Mortalida
55	25	80	68.75
64	16	80	80
52	28	80	65
47	33	80	58.75
59	21	80	73.75

Tratamiento 2 M	Tratamiento 2 V	Tratamiento 2 V-M	% Mortalida
74	6	80	92.5
66	14	80	82.5
54	26	80	67.5
64	16	80	80
59	21	80	73.75

Tratamiento 2 M	Tratamiento 2 V	Tratamiento 2 V-M	% Mortalida
77	8	80	96.25
66	14	80	82.5
74	6	80	92.5
68	12	80	85
80	0	80	100

Tratamiento 3 M	Tratamiento 3 V	Tratamiento 3 V-M	% Mortalidad
68	12	80	85
54	26	80	67.5
68	12	80	85
72	8	80	90

62	18	80	77.5
----	----	----	------

Tratamiento 3 M	Tratamiento 3 V	Tratamiento 3 V-M	% Mortalidad
72	8	80	90
73	7	80	91.25
71	9	80	88.75
72	8	80	90
66	4	80	82.5

Tratamiento 3 M	Tratamiento 3 V	Tratamiento 3 V-M	% Mortalidad
76	4	80	95
78	2	80	97.5
68	12	80	85
68	12	80	85
77	3	80	96.25

Tratamiento 4 M	Tratamiento 4 V	Tratamiento 4 V-M	% Mortalidad
57	27	80	71.25
55	25	80	68.75
56	24	80	70
53	27	80	66.25
72	8	80	90

Tratamiento 4 M	Tratamiento 4 V	Tratamiento 4 V-M	% Mortalidad
73	7	80	91.25
74	6	80	92.5
68	12	80	85
73	7	80	91.25
72	8	80	90

Tratamiento 4 M	Tratamiento 4 V	Tratamiento 4 V-M	% Mortalidad
75	5	80	93.75
74	6	80	92.5
75	5	80	93.75
75	5	80	93.75
74	6	80	92.5

8.3 Datos transformados para el análisis estadístico

Tratamiento	Repetición	% Mortalidad	Proporción	Arcoseno	Raíz (x+1)	R (x+1) %M
Testigo	1	1.25	0.0125	6.41928407	1.00623059	1.5
Testigo	2	5	0.05	12.92096638	1.024695077	2.449489743
Testigo	3	5	0.05	12.92096638	1.024695077	2.449489743
Testigo	4	0	0	0	1	1
Testigo	5	15	0.15	22.786498	1.072380529	4
D baja	1	68.75	0.6875	56.01215642	1.299038106	8.351646544
D baja	2	80	0.8	63.43494882	1.341640786	9
D baja	3	65	0.65	53.72880156	1.284523258	8.124038405
D baja	4	58.75	0.5875	50.03932905	1.259960317	7.729812417
D baja	5	73.75	0.7375	59.17967501	1.318142633	8.645808233
D media	1	85	0.85	67.213502	1.360147051	9.273618495
D media	2	67.5	0.675	55.24365756	1.294217911	8.276472679
D media	3	85	0.85	67.213502	1.360147051	9.273618495
D media	4	90	0.9	71.56505118	1.378404875	9.539392014
D media	5	77.5	0.775	61.68350648	1.332291259	8.860022573
D alta	1	71.25	0.7125	57.57533171	1.308625233	8.5
D alta	2	68.75	0.6875	56.01215642	1.299038106	8.351646544
D alta	3	70	0.7	56.78908924	1.303840481	8.426149773
D alta	4	66.25	0.6625	54.48278749	1.289379696	8.200609733
D alta	5	90	0.9	71.56505118	1.378404875	9.539392014
Testigo	1	1.25	0.0125	6.41928407	1.00623059	1.5
Testigo	2	5	0.05	12.92096638	1.024695077	2.449489743
Testigo	3	10	0.1	18.43494882	1.048808848	3.31662479
Testigo	4	10	0.1	18.43494882	1.048808848	3.31662479
Testigo	5	20	0.2	26.56505118	1.095445115	4.582575695
D baja	1	92.5	0.925	74.10583469	1.387443693	9.669539803
D baja	2	82.5	0.825	65.27080094	1.350925609	9.137833441
D baja	3	67.5	0.675	55.24365756	1.294217911	8.276472679
D baja	4	80	0.8	63.43494882	1.341640786	9
D baja	5	73.75	0.7375	59.17967501	1.318142633	8.645808233
D media	1	90	0.9	71.56505118	1.378404875	9.539392014
D media	2	91.25	0.9125	72.79424567	1.382931669	9.604686356
D media	3	88.75	0.8875	70.40251629	1.373863166	9.473647661
D media	4	90	0.9	71.56505118	1.378404875	9.539392014
D media	5	82.5	0.825	65.27080094	1.350925609	9.137833441
D alta	1	91.25	0.9125	72.79424567	1.382931669	9.604686356
D alta	2	92.5	0.925	74.10583469	1.387443693	9.669539803

D alta	3	85	0.85	67.213502	1.360147051	9.273618495
D alta	4	91.25	0.9125	72.79424567	1.382931669	9.604686356
D alta	5	90	0.9	71.56505118	1.378404875	9.539392014
Testigo	1	11.25	0.1125	19.59748371	1.054751155	3.5
Testigo	2	5	0.05	12.92096638	1.024695077	2.449489743
Testigo	3	10	0.1	18.43494882	1.048808848	3.31662479
Testigo	4	18.75	0.1875	25.65890627	1.089724736	4.444097209
Testigo	5	20	0.2	26.56505118	1.095445115	4.582575695
D baja	1	96.25	0.9625	78.8341775	1.400892573	9.861541462
D baja	2	82.5	0.825	65.27080094	1.350925609	9.137833441
D baja	3	92.5	0.925	74.10583469	1.387443693	9.669539803
D baja	4	85	0.85	67.213502	1.360147051	9.273618495
D baja	5	100	1	90	1.414213562	10.04987562
D media	1	95	0.95	77.07903362	1.396424004	9.797958971
D media	2	97.5	0.975	80.90256383	1.405346932	9.924716621
D media	3	85	0.85	67.213502	1.360147051	9.273618495
D media	4	85	0.85	67.213502	1.360147051	9.273618495
D media	5	96.25	0.9625	78.8341775	1.400892573	9.861541462
D alta	1	93.75	0.9375	75.52248781	1.391941091	9.733961167
D alta	2	92.5	0.925	74.10583469	1.387443693	9.669539803
D alta	3	93.75	0.9375	75.52248781	1.391941091	9.733961167
D alta	4	93.75	0.9375	75.52248781	1.391941091	9.733961167
D alta	5	92.5	0.925	74.10583469	1.387443693	9.669539803

Tratamiento	Repetición	% Mortalidad	Proporción	Arcoseno	Raíz (x+1)	Raiz(x+1) %M
Testigo	1	0	0	0	1	1
Testigo	2	0	0	0	1	1
Testigo	3	0	0	0	1	1
Testigo	4	0	0	0	1	1
Testigo	5	0	0	0	1	1
D baja	1	0	0	0	1	1
D baja	2	0	0	0	1	1
D baja	3	0	0	0	1	1
D baja	4	0	0	0	1	1
D baja	5	0	0	0	1	1
D media	1	0	0	0	1	1
D media	2	0	0	0	1	1
D media	3	0	0	0	1	1
D media	4	0	0	0	1	1

D media	5	0	0	0	1	1
D alta	1	0	0	0	1	1
D alta	2	0	0	0	1	1
D alta	3	0	0	0	1	1
D alta	4	0	0	0	1	1
D alta	5	0	0	0	1	1
Testigo	1	10	0.1	18.43494882	1.048808848	3.31662479
Testigo	2	20	0.2	26.56505118	1.095445115	4.582575695
Testigo	3	0	0	0	1	1
Testigo	4	50	0.5	45	1.224744871	7.141428429
Testigo	5	40	0.4	39.23152048	1.183215957	6.403124237
D baja	1	80	0.8	63.43494882	1.341640786	9
D baja	2	50	0.5	45	1.224744871	7.141428429
D baja	3	80	0.8	63.43494882	1.341640786	9
D baja	4	35	0.35	36.27119844	1.161895004	6
D baja	5	30	0.3	33.21091076	1.140175425	5.567764363
D media	1	45	0.45	42.13041476	1.204159458	6.782329983
D media	2	70	0.7	56.78908924	1.303840481	8.426149773
D media	3	90	0.9	71.56505118	1.378404875	9.539392014
D media	4	85	0.85	67.213502	1.360147051	9.273618495
D media	5	50	0.5	45	1.224744871	7.141428429
D alta	1	80	0.8	63.43494882	1.341640786	9
D alta	2	75	0.75	60	1.322875656	8.717797887
D alta	3	75	0.75	60	1.322875656	8.717797887
D alta	4	80	0.8	63.43494882	1.341640786	9
D alta	5	90	0.9	71.56505118	1.378404875	9.539392014
Testigo	1	35	0.35	36.27119844	1.161895004	6
Testigo	2	30	0.3	33.21091076	1.140175425	5.567764363
Testigo	3	85	0.85	67.213502	1.360147051	9.273618495
Testigo	4	90	0.9	71.56505118	1.378404875	9.539392014
Testigo	5	15	0.15	22.786498	1.072380529	4
D baja	1	90	0.9	71.56505118	1.378404875	9.539392014
D baja	2	100	1	90	1.414213562	10.04987562
D baja	3	85	0.85	67.213502	1.360147051	9.273618495
D baja	4	65	0.65	53.72880156	1.284523258	8.124038405
D baja	5	70	0.7	56.78908924	1.303840481	8.426149773
D media	1	90	0.9	71.56505118	1.378404875	9.539392014
D media	2	100	1	90	1.414213562	10.04987562
D media	3	100	1	90	1.414213562	10.04987562
D media	4	100	1	90	1.414213562	10.04987562
D media	5	85	0.85	67.213502	1.360147051	9.273618495

D alta	1	80	0.8	63.43494882	1.341640786	9
D alta	2	90	0.9	71.56505118	1.378404875	9.539392014
D alta	3	95	0.95	77.07903362	1.396424004	9.797958971
D alta	4	100	1	90	1.414213562	10.04987562
D alta	5	90	0.9	71.56505118	1.378404875	9.539392014

8.4 Análisis estadístico

8.4.1 DATOS INVERNADERO % MORTALIDAD SAS

Obs	Fecha	Tra	Rep	DP
1	F1	Testigo	1	1.50000
2	F1	Testigo	2	2.44949
3	F1	Testigo	3	2.44949
4	F1	Testigo	4	1.00000
5	F1	Testigo	5	4.00000
6	F1	baja	1	8.35165
7	F1	baja	2	9.00000
8	F1	baja	3	8.12404
9	F1	baja	4	7.72981
10	F1	baja	5	8.64581
11	F1	media	1	9.27362
12	F1	media	2	8.27647
13	F1	media	3	9.27362
14	F1	media	4	9.53939
15	F1	media	5	8.86002
16	F1	alta	1	8.50000
17	F1	alta	2	8.35165
18	F1	alta	3	8.42615
19	F1	alta	4	8.20061
20	F1	alta	5	9.53939
21	F2	Testigo	1	1.50000
22	F2	Testigo	2	2.44949
23	F2	Testigo	3	3.31662
24	F2	Testigo	4	3.31662
25	F2	Testigo	5	4.58258
26	F2	baja	1	9.66954
27	F2	baja	2	9.13783
28	F2	baja	3	8.27647
29	F2	baja	4	9.00000
30	F2	baja	5	8.64581
31	F2	media	1	9.53939
32	F2	media	2	9.60469
33	F2	media	3	9.47365
34	F2	media	4	9.53939
35	F2	media	5	9.13783
36	F2	alta	1	9.60469
37	F2	alta	2	9.66954
38	F2	alta	3	9.27362
39	F2	alta	4	9.60469
40	F2	alta	5	9.53939
41	F3	Testigo	1	3.50000
42	F3	Testigo	2	2.44949
43	F3	Testigo	3	3.31662
44	F3	Testigo	4	4.44410

45	F3	Testigo	5	4.58258
46	F3	baja	1	9.86154
47	F3	baja	2	9.13783
48	F3	baja	3	9.66954
49	F3	baja	4	9.27362
50	F3	baja	5	10.0499
51	F3	media	1	9.7980
52	F3	media	2	9.9247
53	F3	media	3	9.2736
54	F3	media	4	9.2736
55	F3	media	5	9.8615
56	F3	alta	1	9.7340
57	F3	alta	2	9.6695
58	F3	alta	3	9.7340
59	F3	alta	4	9.7340
60	F3	alta	5	9.6695

Clase	Niveles	Valores
Tra	4	Testigo alta baja media
Rep	5	1 2 3 4 5
Fecha	3	F1 F2 F3

Número de observaciones 60

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: DP

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	11	449.5791057	40.8708278	103.20	<.0001
Error	48	19.0099051	0.3960397		
Total correcto	59	468.5890108			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	DP Media
0.959432	8.220442	0.629317	7.655511

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tra	3	436.6018514	145.5339505	367.47	<.0001
Fecha	2	11.7555631	5.8777815	14.84	<.0001
Tra*Fecha	6	1.2216912	0.2036152	0.51	0.7947

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para DP

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene

un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	48
Error de cuadrado medio	0.39604
Valor crítico del rango estudentizado	3.76375
Diferencia significativa mínima	0.6116

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Tra
A	9.3766	15	media
A			
A	9.2834	15	alta
A			
A	8.9716	15	baja
B	2.9905	15	Testigo

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para DP

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene

un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	48
Error de cuadrado medio	0.39604
Valor crítico del rango estudentizado	3.42026
Diferencia significativa mínima	0.4813

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Fecha
A	8.1479	20	F3
A			
A	7.7441	20	F2
B	7.0746	20	F1

Nivel de Tra	Nivel de Fecha	N	Media	Dev std
Testigo	F1	5	2.27979590	1.14702369
Testigo	F2	5	3.03306300	1.14593238
Testigo	F3	5	3.65855749	0.87675332
alta	F1	5	8.60355961	0.53474525

alta	F2	5	9.53838460	0.15499648
alta	F3	5	9.70819262	0.03528503
baja	F1	5	8.37026112	0.48570669
baja	F2	5	8.94593083	0.52478753
baja	F3	5	9.59848176	0.38592068
media	F1	5	9.04462485	0.49340817
media	F2	5	9.45899030	0.18541358
media	F3	5	9.62629081	0.32504858

Clase	Niveles	Valores
Tra	4	Testigo alta baja media
Rep	5	1 2 3 4 5
Fecha	3	F1 F2 F3

Número de observaciones 60

Variable dependiente: DP

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	436.6018514	145.5339505	254.79	<.0001
Error	56	31.9871594	0.5711993		
Total correcto	59	468.5890108			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	DP Media
0.931737	9.872329	0.755777	7.655511

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tra	3	436.6018514	145.5339505	254.79	<.0001

PRUEBAS DE HOMOGENEIDAD

Test de Bartlett para la homogeneidad de la varianza DP

Fuente	DF	Chi-cuadrado	Pr > ChiSq
Tra	3	14.8727	0.0019

Nivel de Tra	N	Media	Dev std
Testigo	15	2.99047213	1.14505604
alta	15	9.28337895	0.58451018
baja	15	8.97155791	0.67703299
media	15	9.37663532	0.41667488

Test Brown y Forsythe para la homogeneidad de la varianza DP
ANOVA de desviaciones absolutas de las medianas de grupo

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tra	3	3.4699	1.1566	4.52	0.0066
Error	56	14.3259	0.2558		

Nivel de Tra	N	Media	Dev std
Testigo	15	2.99047213	1.14505604
alta	15	9.28337895	0.58451018
baja	15	8.97155791	0.67703299
media	15	9.37663532	0.41667488

Test de Levene para homogeneidad de la varianza DP
ANOVA de desviaciones absolutas de las medias de grupo

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tra	3	3.3683	1.1228	6.93	0.0005
Error	56	9.0709	0.1620		

Nivel de Tra	N	-----DP-----	
		Media	Dev std
Testigo	15	2.99047213	1.14505604
alta	15	9.28337895	0.58451018
baja	15	8.97155791	0.67703299
media	15	9.37663532	0.41667488

8.4.2 DATOS BIOENSAYO % MORTALIDAD EN SAS

Obs	Fecha	Tra	Rep	DP
1	F1	Testigo	1	1.50000
2	F1	Testigo	2	2.44949
3	F1	Testigo	3	2.44949
4	F1	Testigo	4	1.00000
5	F1	Testigo	5	4.00000
6	F1	baja	1	8.35165
7	F1	baja	2	9.00000
8	F1	baja	3	8.12404
9	F1	baja	4	7.72981
10	F1	baja	5	8.64581
11	F1	media	1	9.27362
12	F1	media	2	8.27647
13	F1	media	3	9.27362
14	F1	media	4	9.53939
15	F1	media	5	8.86002
16	F1	alta	1	8.50000
17	F1	alta	2	8.35165
18	F1	alta	3	8.42615
19	F1	alta	4	8.20061
20	F1	alta	5	9.53939
21	F2	Testigo	1	1.50000
22	F2	Testigo	2	2.44949
23	F2	Testigo	3	3.31662
24	F2	Testigo	4	3.31662
25	F2	Testigo	5	4.58258
26	F2	baja	1	9.66954
27	F2	baja	2	9.13783
28	F2	baja	3	8.27647
29	F2	baja	4	9.00000
30	F2	baja	5	8.64581
31	F2	media	1	9.53939
32	F2	media	2	9.60469
33	F2	media	3	9.47365
34	F2	media	4	9.53939
35	F2	media	5	9.13783
36	F2	alta	1	9.60469
37	F2	alta	2	9.66954
38	F2	alta	3	9.27362
39	F2	alta	4	9.60469
40	F2	alta	5	9.53939
41	F3	Testigo	1	3.50000
42	F3	Testigo	2	2.44949
43	F3	Testigo	3	3.31662
44	F3	Testigo	4	4.44410
45	F3	Testigo	5	4.58258
46	F3	baja	1	9.86154
47	F3	baja	2	9.13783

48	F3	baja	3	9.66954
49	F3	baja	4	9.2736
50	F3	baja	5	10.0499
51	F3	media	1	9.7980
52	F3	media	2	9.9247
53	F3	media	3	9.2736
54	F3	media	4	9.2736
55	F3	media	5	9.8615
56	F3	alta	1	9.7340
57	F3	alta	2	9.6695
58	F3	alta	3	9.7340
59	F3	alta	4	9.7340
60	F3	alta	5	9.6695

Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
Tra	4	Testigo alta baja media
Rep	5	1 2 3 4 5
Fecha	3	F1 F2 F3

Número de observaciones 60

Variable dependiente: DP

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	11	449.5791057	40.8708278	103.20	<.0001
Error	48	19.0099051	0.3960397		
Total correcto	59	468.5890108			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	DP Media
0.959432	8.220442	0.629317	7.655511

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tra	3	436.6018514	145.5339505	367.47	<.0001
Fecha	2	11.7555631	5.8777815	14.84	<.0001
Tra*Fecha	6	1.2216912	0.2036152	0.51	0.7947

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para DP

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene

un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	48
Error de cuadrado medio	0.39604
Valor crítico del rango estudentizado	3.76375
Diferencia significativa mínima	0.6116

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Tra
A	9.3766	15	media
A			
A	9.2834	15	alta
A			
A	8.9716	15	baja
B	2.9905	15	Testigo

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para DP

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene

un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	48
Error de cuadrado medio	0.39604
Valor crítico del rango estudentizado	3.42026
Diferencia significativa mínima	0.4813

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Fecha
A	8.1479	20	F3
A			
A	7.7441	20	F2
B	7.0746	20	F1

Procedimiento ANOVA

Nivel de Tra	Nivel de Fecha	N	Media	Dev std
Testigo	F1	5	2.27979590	1.14702369
Testigo	F2	5	3.03306300	1.14593238
Testigo	F3	5	3.65855749	0.87675332
alta	F1	5	8.60355961	0.53474525
alta	F2	5	9.53838460	0.15499648
alta	F3	5	9.70819262	0.03528503
baja	F1	5	8.37026112	0.48570669
baja	F2	5	8.94593083	0.52478753

baja	F3	5	9.59848176	0.38592068
media	F1	5	9.04462485	0.49340817
media	F2	5	9.45899030	0.18541358
media	F3	5	9.62629081	0.32504858

Variable dependiente: DP

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	436.6018514	145.5339505	254.79	<.0001
Error	56	31.9871594	0.5711993		
Total correcto	59	468.5890108			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	DP Media
0.931737	9.872329	0.755777	7.655511

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tra	3	436.6018514	145.5339505	254.79	<.0001

PRUEBAS DE HOMOGENEIDAD

Test de Bartlett para la homogeneidad de la varianza DP

Fuente	DF	Chi-cuadrado	Pr > ChiSq
Tra	3	14.8727	0.0019

Nivel de Tra	N	Media	Dev std
Testigo	15	2.99047213	1.14505604
alta	15	9.28337895	0.58451018
baja	15	8.97155791	0.67703299
media	15	9.37663532	0.41667488

Test Brown y Forsythe para la homogeneidad de la varianza DP
ANOVA de desviaciones absolutas de las medianas de grupo

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tra	3	3.4699	1.1566	4.52	0.0066
Error	56	14.3259	0.2558		

Nivel de Tra	N	Media	Dev std
--------------	---	-------	---------

Testigo	15	2.99047213	1.14505604
alta	15	9.28337895	0.58451018
baja	15	8.97155791	0.67703299
media	15	9.37663532	0.41667488

Test de Levene para homogeneidad de la varianza DP
ANOVA de desviaciones absolutas de las medias de grupo

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tra	3	3.3683	1.1228	6.93	0.0005
Error	56	9.0709	0.1620		