

# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO  
POSTGRADO DE FITOSANIDAD  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

*Pandora neoaphidis* (REMAUDIÈRE & HENNEBERT)  
HUMBER, CAUSANTE DE EPIZOOTIAS NATURALES  
SOBRE ÁFIDOS

**MARCO ANTONIO REYES ROSAS**

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2008

La presente tesis titulada: ***Pandora neoaphidis* (REMAUDIÈRE & HENNEBERT) HUMBER CAUSANTE DE EPIZOOTIAS NATURALES SOBRE ÀFIDOS**, realizada por el alumno **MARCO ANTONIO REYES ROSAS**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

Montecillo, Texcoco, Edo., de México, enero de 2008



*Pandora neoaphidis* (REMAUDIÈRE Y HENNEBERT) HUMBER CAUSANTE DE  
EPIZOOTIAS NATURALES SOBRE ÁFIDOS

Marco Antonio Reyes Rosas, Dr.  
Colegio de Postgraduados, 2008

*Pandora neoaphidis* es un hongo específico de áfidos y de distribución mundial con potencial para usarse como agente de control biológico. Sin embargo, en México no existe información relevante respecto a su distribución, hospederos, biología y requerimientos climáticos. Ésta investigación se desarrolló con el objetivo de generar información básica sobre aspectos biológicos del patógeno y requerimientos de temperatura para su desarrollo, esporulación y germinación. Para esto, durante los años 2005 y 2006 en la zona norte del estado de Tamaulipas, México, se observó una epizootia sobre áfidos de importancia agrícola tales como el pulgón del cogollo (*Rhopalosiphum maidis*) en sorgo, el pulgón verde del durazno (*Myzus persicae*) y el pulgón cenizo de la col (*Brevicoryne brassicae*) en canola. En éstas especies se alcanzaron mortalidades hasta del 90%.

De este material se colectaron siete aislamientos de *P. neoaphidis* en los que se evaluó *in vitro* el efecto de la temperatura (10, 15, 20, 25 y 30 °C) sobre diferentes atributos entre estos el crecimiento radial, esporulación, morfología y germinación. También se evaluó la virulencia de los aislamientos a una dosis sobre *B. brassicae*. Se encontró una estrecha relación entre la temperatura y los parámetros evaluados. La temperatura óptima para el desarrollo, esporulación y germinación de los diferentes aislamientos de *P. neoaphidis* se encuentra entre los 15 y 20°C con inhibición a los 30°C. Se aporta información relevante de la biología de *P. neoaphidis* sobre la estructura de sus tubos germinativos y la capacidad para la producción de esporas secundarias y de posterior generación. Por último, en las pruebas de virulencia se obtuvieron mortalidades entre el 60 y 90%.

Debido a la especificidad de *P. neoaphidis* y a las altas tasas de mortalidad que provocó en *B. brassicae* en laboratorio, y en *R. maidis*, *M. persicae*, y *B. brassicae* en campo este hongo debe recibir mayor atención para usarse como un agente de control biológico.

Palabras clave: Entomopatógenos, Aphididae, *conidia*, tubo germinativo, esporulación.

*Pandora neoaphidis* (REMAUDIÈRE AND HENNEBERT) HUMBER CAUSE OF  
NATURAL EPIZOOTICS ON APHIDS

Marco Antonio Reyes Rosas, Dr.  
Colegio de Postgraduados, 2008

*Pandora neoaphidis* is a fungal pathogen specific of many aphid species, worldwide distributed and whose potential as a biological control agent is promising. However, in Mexico there is not relevant information regarding its distribution, hosts range, biology and climate requirements. This research was conducted in order to generate basic information on biological aspects of the pathogen and temperature requirements for its development, germination and sporulation, and thus understand its biology in natural conditions. Then, during the years 2005 and 2006 at the northern state of Tamaulipas, Mexico, was followed up an epizootic on aphids of agricultural relevance such as the corn leaf aphid (*Rhopalosiphum maidis*) in sorghum, the green peach aphid (*Myzus persicae*) and the grey cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) in canola.

Aphid mortalities up to 90% were observed. Seven isolates of *P. neoaphidis* were collected and their radial growth, sporulation, and germination were studied *in vitro* under different temperatures (10, 15, 20°C 25 y 30 °C ). Additionally, isolates pathogenicity was evaluated at single dose of  $62 \pm 8$  spores per mm<sup>2</sup> on *B. brassicae*. There was a strong effect of temperature on development, germination and sporulation of *P. neoaphidis*. The optimum temperature for these three parameters was between 15 and 20°C with inhibition at 30°C. We described relevant information on the biology of *P. neoaphidis*, specially on the structure of their germination tubes and its ability to produce spores for subsequent generations. Finally, mortalities between 60 and 90% of *B. brassicae* were observed at the virulence tests.

Because *P. neoaphidis* specificity and its high mortality rates on *B. brassicae* in lab, and *R. maidis*, *M. persicae*, and *B. brassicae* in the field, this aphid pathogen should get more attention for using it as a biological control agent.

Palabras clave: Entomopathogens, Aphididae, *conidia*, germinative tube, sporulation.

*Con amor y cariño a mi esposa Noradely, a mis adorables hijos  
Lucía Mayte y Marco Antonio...*

*Gracias por su paciencia, la confianza y el amor que siempre me  
han profesado y ser parte fundamental de mis logros*

*A toda mi familia...*

*Gracias por todo su apoyo*

## **Agradecimientos**

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** el apoyo económico que me brindo para la realización de mis estudios.

Al **Colegio de Postgraduados (CP)** y a su personal docente por darme la oportunidad de aprender entre sus aulas.

Al **Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)** y en especial al **Campo Experimental Río Bravo (CERIB)** por las facilidades otorgadas para mi capacitación.

Agradezco a la **Dra. Raquel Alatorre Rosas** todo el valioso conocimiento brindado y la buena disposición para ceder parte de su tiempo en la dirección de mi trabajo. Gracias por su amistad y el privilegio de trabajar a su lado.

A mi buen amigo el Dr. **Francisco Hernández Rosas** por su acertada participación y apoyo durante la realización de mi trabajo.

Al **Dr. Gustavo Mora Aguilera** por la excelente revisión de mi tesis. Gracias por sus acertados comentarios.

Al **Dr. José Isabel López Arroyo**, le agradezco sus rudas pero precisas observaciones para la mejora de éste manuscrito.

Al **Dr. Humberto Vaquera Huerta** por su apreciable participación en el apoyo estadístico.

Al **M.C. Jorge A. Valdez** por las facilidades otorgadas para la toma de imágenes que complementan éste trabajo.

Al **Dr. Jesús Loera Gallardo** y al **MC. Mario Marín Silva** del CERIB, por las facilidades de información, equipo y personal para los trabajos de campo.

Al **Dr. Luís Ángel Rodríguez del Bosque** por impulsarme a alcanzar nuevas metas personales.

Al Sr. **Julian Robles Escarreola** y **Griselda Robles Cervantes**, por las colectas realizadas de material biológico y base de datos de clima.

A todas aquellas personas que contribuyeron de manera directa e indirecta en la conclusión de éste documento.

## **Agradecimientos**

A los MC: **Martha Mendoza Lucas, Martha Estrada López y Gabriela Hernández** por su gran apoyo, amistad y compañerismo durante mi estancia en el CP, así como a mi buen amigo **Jhony Navat Enríquez Vara**. Mi gratitud y respeto como profesionistas y seres humanos.

A las inmejorables amigas y compañeras de tantos momentos de trabajo, alegría y tristezas: **Verónica Romero, Carolina Pérez, Juliana Osorio, Erika Muñiz, Katina Satamatiu, María Elsa Rodríguez , Imelda de León**.

A mis estimados amigos: **Ernesto López, Carlos Ramos, Sabino Onorio, Misael Martínez, Leonardo Crespo, Eliu Herrera, Hugo Herrera, Carlos Acatitla, Jaime Reyes, José Anastasio, Fernando Salazar, Nicolás Ramírez, Benjamín Hernández, Mario Saavedra, Luis Antonio Mariscal, Ignacio Zarco Raúl Veristain y Ulises Blanco**.

A todos ellos, mi más sincero agradecimiento por dar un sentido más amplio a la palabra amistad y proporcionar un ameno entorno durante mi estancia en el CP.

Una disculpa a las personas que involuntariamente omití pero que con su granito de arena contribuyeron afanosamente con el acabado del manuscrito.

Hasta pronto...Gracias !!!

## CONTENIDO

Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
Dedicatoria y agradecimientos.....	v
Contenido.....	viii
Índice de figuras .....	xi
Índice de cuadros.....	xii
Introducción general.....	xiii
Objetivos.....	xiv

## CAPÍTULO 1

### Revisión de Literatura

1.1 Hongos Entomopatógenos.....	1
1.2 Entomophthorales.....	3
1.3 Entomophthoraceae.....	3
1.4 Género <i>Pandora</i> .....	3
1.5 <i>P. neoaphidis</i> .....	4
1.5.1 Hospederos.....	4
1.5.2 Biología.....	4
1.5.2.1 Penetración y colonización.....	5
1.5.2.2 Esporulación.....	6
1.5.3 Requerimientos ambientales.....	6
1.6. <b>Dispersión</b> .....	7
1.7 <b>Literatura citada</b> .....	11

## CAPÍTULO 2

### 2. Presencia de *Pandora neoaphidis* (Remaudière & Hennebert) Humber, en áfidos (Homoptera: Aphididae) de cultivos agrícolas en el norte de Tamaulipas

2.1 Resumen.....	16
2.2 Introducción.....	16
2.3 Materiales y Métodos.....	18
2.3.1 Zona geográfica de investigación.....	18
2.3.2. Colecta y obtención de muestras.....	19
2.3.3 Identificación del patógeno.....	19
2.3.4 Aislamiento del entomopatógeno.....	20
2.4 Resultados.....	21
2.4.1 Identificación del patógeno y hospederos.....	21
2.4.2 Ocurrencia de <i>P. neoaphidis</i> en el norte de Tamaulipas.....	21
2.4.3 Condiciones climáticas.....	24
2.4.4 Características de áfidos infectados.....	24
2.4.5 Aislamientos.....	25
2.5 <b>Discusión</b> .....	26

2.5.1. Mortalidad causada por <i>P. neoaphidis</i> .....	26
2.5.2 Características de infección.....	27
2.5.3 Supervivencia del hongo.....	28
2.5.4 Factores que favorecen la epizootia.....	28
2.5.5 Implicaciones para el uso de <i>P. neoaphidis</i> en control de áfidos	29
<b>2.6 Conclusión</b> .....	29
<b>2.7 Literatura citada</b> .....	32

### CAPÍTULO 3

<b>Efecto de la temperatura en el crecimiento radial, esporulación y germinación <i>in vitro</i> de siete aislamientos nativos de <i>Pandora neoaphidis</i> (Remaudière y Hennebert) Humber</b> .....	35
<b>3.1 Resumen</b> .....	35
<b>3.2 Introducción</b> .....	35
<b>3.3 Materiales y Métodos</b> .....	37
3.3.1 Cultivo de <i>P. neoaphidis</i> .....	37
3.3.2. Características culturales.....	38
3.3.3 Efecto de temperatura en crecimiento radial.....	38
3.3.3.1 Temperatura óptima para el crecimiento radial de <i>P. neoaphidis</i> .....	39
3.3.4 Efecto de la temperatura en la esporulación.....	39
3.3.4.1 Efecto de la temperatura en la morfología de esporas.....	40
3.3.5 Ajuste del crecimiento radial y esporulación de <i>P. neoaphidis</i> a un modelo de crecimiento.....	40
3.3.6 Germinación de esporas primarias.....	41
3.3.7. Formación de <i>conidia</i> , “n” generación a partir de <i>conidia</i> primarias.....	41
<b>3.4 Resultados</b> .....	43
3.4.1 Características de la colonia.....	43
3.4.2 Desarrollo de <i>P. neoaphidis</i> .....	43
3.4.2.1Crecimiento radial a diferentes temperaturas.....	43
3.4.3. Temperatura óptima de desarrollo.....	46
3.4.4. Producción de esporas de <i>P. neoaphidis</i> a diferentes temperaturas.....	46
3.4.5 Efecto de la temperatura en el tamaño y morfología de las <i>conidia</i> .....	48
3.4.6 Modelos de desarrollo de crecimiento radial y esporulación.....	49
3.4.6.1 Crecimiento radial.....	49
3.4.6.2 Modelo de producción de <i>conidia</i> primaria.....	50
3.4.7 Germinación de <i>conidia</i> primarias.....	52
3.4.8 <i>Conidia</i> de diferente generación.....	53
<b>3.5 Discusión</b> .....	54
3.5.1. Morfología de las colonias de los aislamientos de <i>P. neoaphidis</i> .....	54
3.5.2. Crecimiento de <i>P. neoaphidis</i> .....	54
3.5.3 Producción de esporas.....	55

3.5.5 Morfología de las <i>conidia</i> .....	57
3.5.6 Modelo de crecimiento y esporulación.....	58
3.5.7 Germinación de <i>conidia</i> .....	59
3.5.8 <i>Conidia</i> de diferente generación.....	61
<b>3.6 Conclusiones</b> .....	62
<b>3.7 Literatura citada</b> .....	67

## CAPÍTULO 4

### **Patogenicidad de siete aislamientos de *Pandora neoaphidis* sobre el pulgón cenizo de la col *Brevicoryne brassicae* (Homoptera: Aphididae)**

<b>4.1 Resumen</b> .....	71
<b>4.2 Introducción</b> .....	71
<b>4.3 Materiales Y Métodos</b> .....	72
4.3.1 Cultivos de <i>P. neoaphidis</i> .....	72
4.3.2 Cría del pulgón cenizo de la col <i>B. brassicae</i> .....	72
4.3.3 Preparación de la solución nutritiva para el mantenimiento de las hojas de brócoli y de la colonia de áfidos.....	73
4.3.4 Bioensayo.....	73
4.3.4.1 Conteo de esporas.....	75
4.3.4.2 Evaluación de la mortalidad.....	75
<b>4.4 Resultados</b> .....	75
4.4.1 Insectos enfermos.....	77
<b>4.5 Discusiones</b> .....	77
4.5.1 Síntomas y signos de la enfermedad.....	77
4.5.2 Mortalidad provocada por <i>P. neoaphidis</i> .....	78
<b>4.6 Conclusiones</b> .....	80
<b>4.7 Literatura citada</b> .....	82

## CONCLUSIONES GENERALES 85

### APÉNDICE

<b>A-1</b>	Producción media acumulada de micelio de diferentes aislamientos de <i>P. neoaphidis</i> a diferentes temperaturas Tukey ( $P \leq 0.05$ ). .....	86
<b>A-2</b>	Combinación temperatura-aislamiento de crecimiento radial de los diferentes aislamientos de <i>P. neoaphidis</i> Tukey ( $P \leq 0.05$ ).....	87
<b>A-3</b>	Medias de la relación longitud y grosor de <i>conidia</i> primaria de <i>Pandora neoaphidis</i> a diferentes temperaturas Tukey ( $P \leq 0.05$ ).....	88
<b>A-4</b>	Porcentaje de germinación de <i>conidia</i> primarias de <i>P. neoaphidis</i> a las 24 horas a diferentes temperaturas.....	89
<b>A-5</b>	Comparación de la producción de micelio de diferentes aislamientos de <i>P. neoaphidis</i> con el Modelo Logístico en distintas temperaturas.....	90



## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b>	Ciclo biológico de <i>Pandora neoaphidis</i> .....	9
<b>Figura 2</b>	Principales dispersores de <i>Pandora neoaphidis</i> .....	10
<b>Figura 3</b>	Mortalidad provocada por <i>P. neoaphidis</i> en áfidos sobre cultivos de canola y sorgo en el municipio de Río Bravo en el 2005.....	22
<b>Figura 4</b>	Variación de clima en el Municipio de Río Bravo Tamaulipas, 2005.....	22
<b>Figura 5</b>	Mortalidad de <i>P. neoaphidis</i> sobre <i>R. maidis</i> en sorgo, en cuatro municipios del norte de Tamaulipas en el 2006.....	23
<b>Figura 6</b>	Variación del clima en el Municipio de Río Bravo, Tamaulipas, en 2006.....	23
<b>Figura 7</b>	Sitios de detección <i>P. neoaphidis</i> parasitando los áfidos <i>B. brassicae</i> y <i>R. maidis</i> en los cultivos de canola y sorgo en el norte de Tamaulipas.....	30
<b>Figura 8</b>	Áfidos atacados por <i>Pandora neoaphidis</i> .....	31
<b>Figura 9</b>	Crecimiento radial de micelio de todos los aislamientos de <i>P. neoaphidis</i> .....	44
<b>Figura 10</b>	Crecimiento radial promedio de 10°C a 30°C de cada aislamiento de <i>P. neoaphidis</i> .....	45
<b>Figura 11</b>	Crecimiento radial de diferentes aislamientos de <i>P. neoaphidis</i> a diferentes temperaturas.....	45
<b>Figura 12</b>	Producción de <i>conidia</i> de los diferentes aislamientos de <i>P. neoaphidis</i> a distintas temperaturas.....	47
<b>Figura 13</b>	Modelo Logístico en el desarrollo de <i>P. neoaphidis</i> .....	49
<b>Figura 14</b>	Producción diaria de <i>conidia</i> de <i>P. neoaphidis</i> a diferentes temperaturas y los modelos que las explican.....	51
<b>Figura 15</b>	Germinación de <i>Pandora neoaphidis</i> .....	64
<b>Figura 16</b>	<i>Conidia</i> de <i>Pandora neoaphidis</i> de diferente generación.....	65
<b>Figura 17</b>	Morfología de las colonias de diferentes aislamientos de <i>Pandora neoaphidis</i> .....	66
<b>Figura 18</b>	Porcentaje de mortalidad inducida por siete aislamientos de <i>P. neoaphidis</i> en ninfas ápteras de <i>B. brassicae</i> en condiciones de laboratorio.....	77
<b>Figura 19</b>	Patogenicidad de <i>P. neoaphidis</i> sobre <i>B. brassicae</i> .....	81

## Índice de Cuadros

<b>Cuadro 2.1</b>	Municipios muestreados en el norte de Tamaulipas.....	18
<b>Cuadro 2.2</b>	Condiciones climatológicas del primer cuatrimestre 2005 y 2006 en el norte de Tamaulipas.....	24
<b>Cuadro 3.1</b>	Características culturales de los diferentes aislamientos de <i>P. neoaphidis</i> .....	43
<b>Cuadro 3.2</b>	Temperatura óptima de desarrollo de los diferentes aislamientos de <i>P. neoaphidis</i> .....	46
<b>Cuadro 3.3</b>	Producción de esporas de <i>P. neoaphidis</i> en diferentes temperaturas.....	46
<b>Cuadro 3.4</b>	Producción de <i>conidia</i> de <i>P. neoaphidis</i> a diferentes temperaturas.....	48
<b>Cuadro 3.5</b>	Estimadores de la curva del Modelo Logístico en el desarrollo micelial de <i>P. neoaphidis</i> a diferentes temperaturas.....	50
<b>Cuadro 3.6</b>	Estimadores de la curva de los Modelos Logístico y Weibull a la producción de <i>conidia</i> de <i>P. neoaphidis</i> a diferentes temperaturas.....	52
<b>Cuadro 3.7</b>	Relación de medidas de <i>conidia</i> de <i>P. neoaphidis</i> de distintas generaciones.....	53
<b>Cuadro 3.8</b>	Producción media de micelio de aislamientos de <i>P. neoaphidis</i> a diferentes temperaturas.....	54
<b>Cuadro 4.1</b>	Mortalidad corregida (Abbot, 1925) provocada por los diferentes aislamientos de <i>P. neoaphidis</i> a <i>B. brassicae</i> a diferentes tiempos de evaluación.....	76

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Los insectos constituyen el grupo de organismos más numeroso y diverso, y muchos de ellos son considerados plagas agrícolas importantes. Lesiones por alimentación y oviposición, así como la transmisión de enfermedades, son consideradas entre los principales daños (Borrer *et al.*, 1989).

Los áfidos (Homoptera: Aphididae) están considerados como uno de los grupos de insectos que más daños causan a la agricultura a nivel mundial (Sorensen, 2003), ya que son vectores de virus que causan enfermedades, producen enrollamiento de hojas, formación de agallas, tumores e inyección de saliva toxinífera (Holman *et al.*, 1991)

Los métodos de control de estos insectos se han basado principalmente en el uso de insecticidas, sin embargo ésta herramienta ha conducido al desarrollo de resistencia (Foster y Devonshire, 1996). El uso de estrategias como el control biológico es una opción factible, debido a que realmente controla las poblaciones plaga en lugar de sólo reducirlas temporalmente como los plaguicidas (Doutt 1972, DeBach 1975, Luck *et al.*, 1995, Landis y Orr 1999).

Por los hábitos alimenticios de los áfidos al introducir su estilete en el floema de plantas hospederas, reduce la posibilidad de entrada de virus bacterias y protozoarios entomopatógenos vía oral. Los hongos entomopatógenos no necesitan ser ingeridos para provocar infección, ya que pueden atravesar el integumento del insecto directamente. Ésta característica coloca a los hongos entomopatógenos como el grupo más importante de patógenos de áfidos (Steinkraus, 2006).

*Pandora neoaphidis* (Remaunière y Hennebert) Humber es el entomopatógeno más importante en el control de poblaciones de áfidos a nivel mundial, al causar epizootias con mortalidades que pueden superar el 60% en forma natural (McLeod *et al.*, 1998; Pell *et al.*, 2001)

## **Planteamiento del problema**

*P. neoaphidis* ocurre en forma natural sobre poblaciones de áfidos plaga en nuestro país y representa el 80% de los casos observados de micosis sobre pulgones (Remaudière y Latgé, 1985), por lo que su uso como agente de control de áfidos es alentador. En México se conoce muy poco sobre éste patógeno y los estudios se reducen a reportes de presencia en los estados de Coahuila y Nuevo León (Sánchez-Peña 2000). Por lo tanto, se requiere de mayor información sobre la biología y condiciones climáticas propicias para el desarrollo de este agente biológico, como fase inicial para su posible utilización en futuros programas de control biológico y/o manejo integrado de áfidos en el país.

## **Objetivo**

Debido al potencial uso de *P. neoaphidis* como regulador de áfidos en México, el objetivo general de esta investigación fue generar información básica sobre hospederos, biología y condiciones climáticas para el desarrollo de epizootias causadas por *P. neoaphidis*.

Para alcanzar el objetivo mencionado, el trabajo de investigación se dividió en tres fases. La primera consistió en la observación de una epizootia de *P. neoaphidis* en condiciones naturales, a fin de identificar hospederos, síntomas y signos de la enfermedad, así como la mortalidad provocada por el hongo. En la segunda etapa, se evaluó *in vitro* el efecto de temperatura sobre siete aislamientos obtenidos del patógeno en condiciones de campo (cinco de Tamaulipas y dos del Estado de México), para determinar sus rangos óptimos de crecimiento, esporulación y germinación, así como aspectos morfológicos y biológicos. Por último, se evaluó la patogenicidad de los siete aislamientos sobre poblaciones del pulgón cenizo de la col B. *brassicae* y seleccionar los que provocaron mayor porcentaje de mortalidad.

## Literatura consultada

- Borror, J. B., C. A. Triplehorn and N. F. Jhonson. 1989.** An introduction to the study of insects. Six edition. Saunders Collage Publishing. Philadelphia. 875 p.
- DeBach, P. 1975.** Biological control by natural enemies. Reimpresion. Cambridge University Press. London. 323 p
- Doutt, R.L. 1972.** Biological control: Parasites and predators. pp. 228-297. *In:* Pest control strategies for the future. National Academic of Science. Washington, D.C.
- Foster, S. J. and A. L. Devonshire 1996.** The continuing threat of insecticide resistance. *Beet Review* 64:15-17
- Holman, J., R. Peña-Martínez y R. Bujanos-Muñoz. 1991.** Guía para la identificación y análisis de los pulgones alados (Homoptera: Aphididae) del Bajío México. *Folia Entomológica Mexicana.* 83:5-67.
- Landis, D.A. and D.B. Orr. 1999.** Biological control: Approaches and applications, *In* E.B Radcliffe and W.D. Hutchinson. (eds.) Radcliffe's IPM World Textbook, URL: <http://ipmworld.umn.edu>, University of Minesotta, St. Paul, MN.
- Luck, R.F., M.J. Tauber, and C.A Tauber. 1995.** The contributions of biological control to population and evolutionary ecology, pp. 25-45. *In:* J. R. Nichols (ed.). Biological control in the Western U.S. Accomplishment and benefits of regional research project W-84. 1964-1989. ANR Publications, Okland, CA.
- Mcleod, P., J., D.C. Steinkraus, J.C. Correll and T.E. Morelock. 1998.** Prevalence of *Erynia neoaphidis* (Entomophthorales: Entomophthorace) Infections of green peach aphid (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology* 27 (3): 796-800.
- Pell, J.K., J. Eilenberg, A.E. Hajek and D.C. Steinkraus. 2001.** Biology, ecology and pest management potential of entomophthorales. 71- 153 pp. *In:* T.M. Butt, C.W. Jackson and N. Magan (eds). Fungi as Biocontrol agents, progress, problems and potential. CABI Publishing.
- Remaudière, G. y Latgé, J.P. 1985.** Importancia de los hongos patógenos de insectos especialmente Aphididae y Cercopidae en Méjico y perspectivas de uso. *Bol. Serv. Plagas* 11: 217-225
- Sorensen, J, T. 2003.** Aphids. pp. 32-37. *In:* Resh, V. H. and R. T. Cardé (eds.) *Encyclopedia of insects.* Academic Press, San Diego.
- Steinkraus, D.C. 2006.** Factors affecting transmission of fungal pathogens of aphids. *J. of Inverteb. Pathol.* 92:127-131.
- Sánchez-Peña, S. 2000.** Entomopathogens from two chihuahuan desert localities in México. *Bio Control* 45:63-78.

## CAPÍTULO 1

### Revisión de literatura

#### 1.1 Hongos Entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos son capaces de causar niveles espectaculares de mortalidad en poblaciones de insectos. A partir de 1800 - 1925, se destacó la importancia del uso potencial de hongos en el control de insectos. En años recientes, debido al conocimiento sobre los riesgos e ineficiencia de los insecticidas sintéticos para el control de insectos, el interés en el desarrollo de hongos entomopatógenos se ha incrementado (Roberts y Hajek, 1992; Butt *et al.*, 2001, Shah y Pell, 2003). Los hongos son el *Phylum* más grande que incluye patógenos de insectos, con un número estimado de 750 especies.

Los hongos entomopatógenos se han aislado de insectos acuáticos y terrestres en regiones tropicales, subtropicales, templadas, y desérticas (Carruthers y Soper, 1987). Los insectos hospederos de hongos entomopatógenos viven en una gran diversidad de hábitats y en consecuencia los hongos se han adaptado a esos ambientes. Los monocultivos agrícolas han favorecido el desarrollo de significativos problemas de plagas; sin embargo, los hongos entomopatógenos pueden ejercer una regulación de las poblaciones de insectos plaga y ocasionar epizootias. A pesar del interés en utilizar su potencial como controladores biológicos, hay pocos estudios. El desarrollo de programas de control biológico más exitosos requiere mayor profundidad en el conocimiento sobre la ecología de la interacción de los hongos entomopatógenos con su insecto hospedero (Thomas y Wood, 1997; Inglis *et al.*, 2001; Vestergaard *et al.*, 2003; Meyling y Eilenberg, 2007)

El rango de insectos controlados por hongos es amplio. La infección ocurre principalmente a través de la cutícula y raras veces se presentan infecciones en el intestino por ingestión. La forma infectiva de los hongos entomopatógenos son las esporas (*conidia*), las cuales una vez que se encuentran sobre la cutícula de los insectos forman un tubo germinativo con

capacidad de invadir la cutícula. Los hongos entomopatógenos después de la invasión matan a su insecto hospedero, subsecuentemente forman esporas sobre la superficie del hospedero, las que se dispersan y reconocen a un nuevo hospedero para una infección exitosa. Las estrategias de infección de los principales grupos de hongos entomopatógenos, los Deuteromycetes y Entomophthorales, difiere sustancialmente. (Evans, 1989; Keller y Zimmerman, 1989).

Los Ascomycetos anteriormente clasificados como Deuteromycetes, u hongos Imperfectos (Jeffries y Young, 1994), es común que existan como estado anamórfico (asexual). Después de que las *conidia* se adhieren a la superficie del hospedero, germinan ocurriendo la penetración y desarrollo en el interior del insecto susceptible y posteriormente producen esporas sobre el cadáver. Las *conidia* no son descargadas activamente; sin embargo, pueden ser dispersadas por factores abióticos, viento, lluvia; estas se adhieren a nuevos hospederos por contacto directo o por deposición de esporas presentes en el ambiente, reiniciando los ciclos infectivos (Burges, 1998).

Las especies de Entomophthorales, en contraste, típicamente producen dos tipos de esporas, *conidia* (esporas asexuales) son producidas externamente sobre los cadáveres, y son descargadas activamente por presión hidrostática. Si la *conidia* primaria descargada no cae sobre un hospedero, estas pueden germinar o activamente proyectar una espora secundaria, que son muy similares pero de menor tamaño. Si la espora secundaria no cae sobre el hospedero, pueden expulsar *conidia* terciarias y este proceso puede ser repetido para la producción de *conidia* cuaternarias. Principalmente en *Zoophthora* y *Neozygites*, las *conidia* primarias germinan para producir capiloconidia adhesivas sobre un tallo, elevando la espora arriba de 250µm sobre la superficie. Las capiloconidia no se desprenden por el viento pero se adhieren a los insectos que entran en contacto con ellas. Las esporas de resistencia, formadas como acigosporas o cigosporas, son producidas generalmente sobre cadáveres y permiten la sobrevivencia en ausencia del hospedero o en condiciones ambientales desfavorables (King y Humber, 1981).

## 1.2 Entomophthorales

Papierok y Hajek (1997) mencionan que este orden posee aproximadamente 200 especies, las cuales son patógenas de insectos de los órdenes Lepidoptera, Orthoptera, Diptera y Homoptera, además de otros artrópodos como los ácaros (Aracnida). El orden de los Entomophthorales pertenece a la División Zygomycota, Subdivisión Zygomycotina, Zygomycetes. Actualmente se reconocen seis familias en los Entomophthorales: Completoriaceae, Ancylistaceae, Meristacraceae, Basidiobolaceae, Neozygitaceae y Entomomophthoraceae (Humber, 1998b, Nielsen *et al.*, 2001), siendo las dos últimas las más importantes desde el punto de vista entomológico y de patología de invertebrados. En general los entomofthorales tienden a tener un rango estrecho de hospederos, causando epizootias (Pell *et al.*, 2001).

## 1.3 Entomophthoraceae

En la familia Entomophthoraceae se encuentran los géneros *Batkoa* Humber, *Entomophaga* Batko, *Entomophthora* Fresenius, *Erynia* (Nowakowski ex Batko) Remaudière y Hennebert), *Eryniopsis* Humber, *Furia* (Batko) Humber, *Massospora* Peck, *Pandora* Humber, *Strongwellsea* Batko y Weiser, *Tarichium* Cohn y *Zoophtora* Batko (Humber, 1998a). Los géneros más representativos del grupo son *Entomophthora*, *Entomophaga*, *Zoophtora*, *Erynia* y *Pandora*. Existen varios reportes sobre el hongo *Pandora neoaphidis* (Remaudiere y Hennebert) Humber como causante de epizootias que reducen las poblaciones de áfidos (Wilding *et al.*, 1986; Hatting *et al.*, 1999).

## 1.4 Género *Pandora*

El género *Pandora* incluye especies de patógenos que atacan a especies de importancia agrícola dentro de los ordenes Homoptera (Aphididae, Delphacidae y Cicadellidae), Lepidoptera y Diptera. Se han descrito alrededor de 15 especies distintas de este género en el mundo (Humber, 1998a), de las cuales las más sobresalientes han sido *P. delphacis* (Hori) Humber, *P. bullata*



Thaxter y McLeod in Humber) Humber, *P. blunkii* (Lacón ex Zimmermann) Humber y *P. neoaphidis* (Reamudière y Hennebert) Humber, ésta última considerada una de las más importantes a nivel mundial por el control natural de poblaciones de áfidos (Shah *et al.*, 2004).

### **1.5 *P. neoaphidis***

*P. neoaphidis* (= *Entomophthora aphidis* Hoffmann y Fresenius; *Erynia neoaphidis* (Remaudière y Hennebert). *Pandora neoaphidis* es un entomopatógeno importante en el control de poblaciones de áfidos a nivel mundial (McLeod *et al.*, 1998; Hatting *et al.*, 1999; Pell, 2001; Feng *et al.*, 2004). En México se ha reportado en el norte del país en los estados de Coahuila y Nuevo León (Sánchez-Peña, 2000).

#### **1.5.1 Hospederos**

*P. neoaphidis* es el agente más común causante de epizootias en poblaciones de áfidos (Glare y Milner (1991). Se ha detectado en áfidos de importancia agrícola como *Diuraphis noxia* (Mordvilko), *Sitobium avenae* Fabricius, *Aphis gossipy* (Glover), *R. maidis* y *M. persicae* entre otros (Nielsen *et al.*, 1998; Macleod *et al.*, 1998; Hatting *et al.*, 1999; Pell *et al.*, 2001, Chen y Feng 2005). En México, *P. neoaphidis* se reporta como la especie más importante asociada a áfidos causante de epizootias principalmente en zonas tropicales del país (Remaudière y Latge, 1985), recientemente se detectó sobre *R. maidis* en el estado de Coahuila (Sánchez-Peña, 2000), *Brevicoryne brassicae* en Tamaulipas y *M. persicae* en Texcoco estado de México (Ver capítulo 3).

#### **1.5.2 Biología**

El ciclo de vida de *P. neoaphidis* es simple, comparado con *Entomophthora muscae* (Roy *et al.*, 2006). La infección inicia cuando las esporas primarias de *P. neoaphidis* se depositan sobre el áfido (Figuras 1A-B), forman un tubo germinativo y penetran al hospedero (Figuras 1C-1D), cuando las esporas

primarias no llegan a su objetivo se genera una espora secundaria (Glare y Milner, 1991).

*P. neoaphidis* carece de esporas de resistencia (Chen y Feng, 2005; Hatting *et al.*, 1999; Pell *et al.*, 2001), por lo que no se sabe como sobrevive. Feng *et al.* (1992) mencionan que bajo ciertas condiciones ambientales, los cuerpos hifales se modifican en estructuras esféricas que les permiten sobrevivir.

### **1.5.2.1 Penetración y colonización**

*P. neoaphidis*, forma un tubo germinativo que penetra directamente a través de la cutícula del hospedero y establece una infección en el hemocele (Figura 1D). Una vez dentro del hemocele los protoplastos o crecimiento inicial del hongo continúa con la invasión, estos carecen de una pared rica en azúcares y evitan ser detectados por el sistema inmunológico del insecto. Los protoplastos persisten hasta la muerte del hospedero (Butt *et al.*, 1981), la que ocurre en un período de 3 a 4 días posteriores a la infección. Poco o antes de la muerte del áfido, el hongo prolifera en cuerpos hifales, los que darán origen a cistidios conidióforos y rizoides (Kalkar, 2005). Antes de la diferenciación de los cuerpos hifales e hifas, éstos se concentran en grupos en todo el cuerpo del insecto, a excepción de los apéndices, cápsula cefálica, área medio-ventral de tórax y abdomen, dando la apariencia de tubérculos en la cutícula del insecto muerto (Kalkar, 2005).

Al morir el hospedero, los cistidios, que son hifas especializadas, atraviesan el cuerpo del insecto para producir conidióforos, los que paulatinamente cubren al hospedero. El cadáver es adherido al substrato por los rizoides (Figura 1E), que son hifas especializadas que emergen de la parte ventral del insecto y se adhieren al substrato por medio de discos, mismos que permiten que las esporas generadas por los conidióforos sean expulsadas para generar nuevas infecciones (Figuras 1F-J). Las esporas son expulsadas de los cadáveres y forman un halo alrededor del insecto muerto característico de los Entomophthorales (Glare y Milner, 1991; Papierok y Hajek, 1997; Hatting *et*

*al.*, 1999). Las esporas son descargadas a una distancia de dos a 11 mm con una elevación entre los 7 y 8 mm (Pell *et al.*, 2001). Esta característica permite a *P. neoaphidis* aumentar la probabilidad de contagio de áfidos vecinos.

### **1.5.2.2 Esporulación**

Las *conidia* primarias *in vivo* son ovales y con una pequeña papila (Figura 1A), su longitud oscila entre los 18 y 35  $\mu$ m de largo y de 10 a 15 de ancho (Pell *et al.*, 2001). Glare y Milner (1991) mencionan que los rangos oscilan entre los 20 y 25  $\mu$ m de largo y 10-13 de ancho. Estas diferencias están en función del aislamiento, medio de cultivo. Así en SEMA son esporas grandes y alcanzan hasta 36  $\mu$ m de largo y 20 de ancho. Si se trata de esporas secundarias son muy semejantes en tamaño y forma (Feng, 1990; Dara y Semtner, 1998).

Según Glare y Milner (1991), la infección en especies de áfidos pequeños produce menos esporas que en las especies grandes. Estos mismos autores mencionan que un áfido muerto de *Acyrtosiphon pisum*, puede generar hasta medio millón de esporas, mientras que *M. persicae*, solo 13,000.

### **1.5.3 Requerimientos ambientales**

Las principales limitantes para el desarrollo de *P. neoaphidis* son la humedad relativa (HR) y la temperatura. La temperatura óptima para su desarrollo se ubica entre los 18 y 23 °C (Morgan *et al.*, 1995, Dara y Semtner 1998), aunque se ha estimado que puede desarrollarse desde los 5 °C e inhibirse a 30 °C (Glare y Milner, 1991; Pell *et al.*, 2001). El punto óptimo de desarrollo es de 20 °C. Las temperaturas de 15 y 25 °C afectan la esporulación, pero no el número total de esporas producidas. La producción de esporas decrece por abajo de los 15°C, y desaparece a 0 y 30° C (van Roermund *et al.*, 1984).

*P. neoaphidis* requiere de humedades superiores al 93% para la producción de esporas. La incubación a 100% de HR produce la máxima generación de esporas. Glare y Milner (1991) reportan que áfidos muertos por *P. neoaphidis* con HR de 10% y 25% por 18 h, no alcanzaron la esporulación

máxima de *conidia* lo cual se logró cuando se colocaron nuevamente a 100% de HR.

### **1.6. Dispersión**

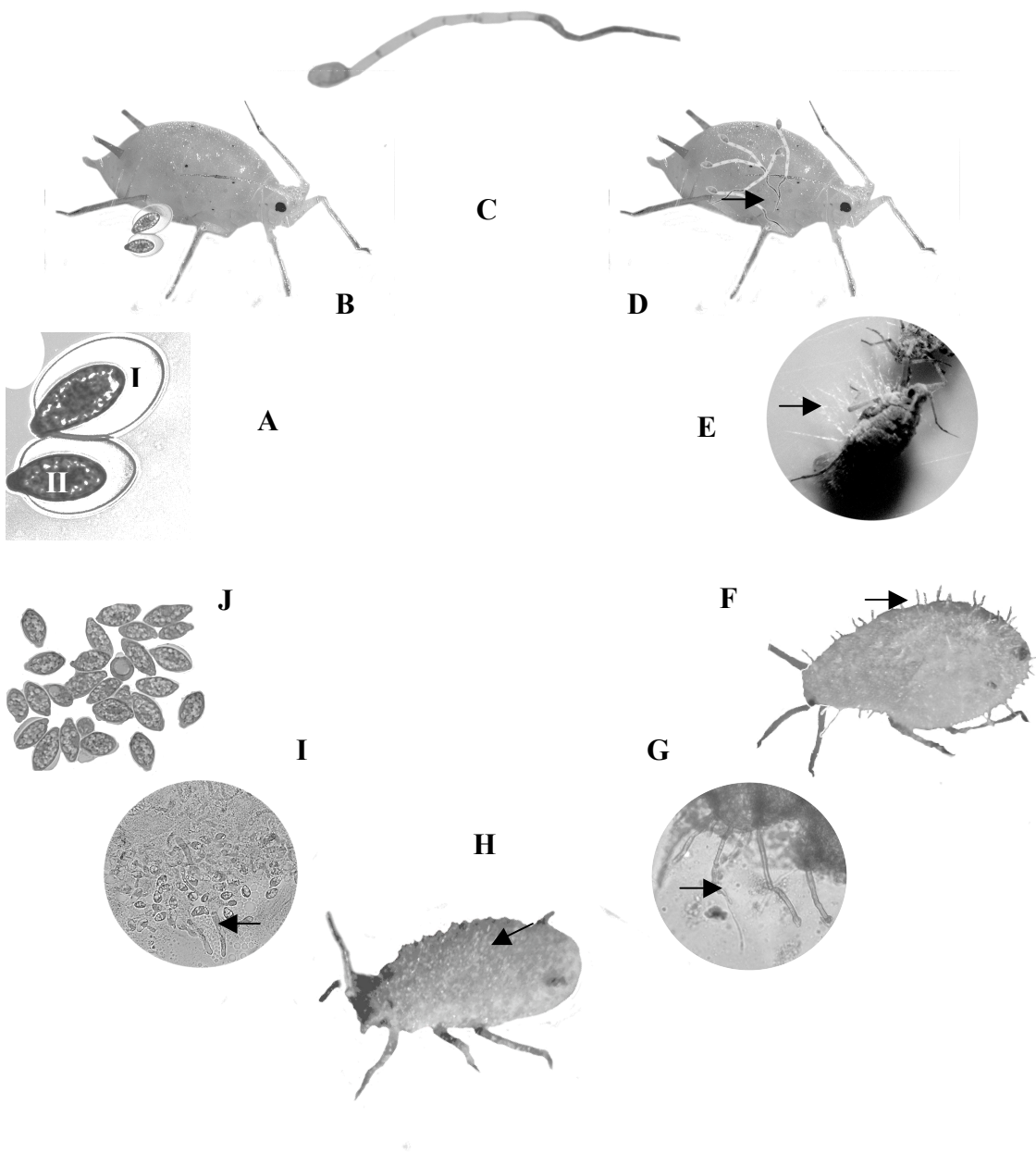
Los Entomophthorales se caracterizan por la capacidad de dispersión de sus esporas a partir de insectos muertos (Figuras 1F y 1H) (Hajek 1997; Shah y Pell, 2003) y de insectos infectados migratorios (Feng *et al.*, 2004). Las esporas producidas pueden entrar en contacto con sus hospederos por varias vías. La primera de ellas es vía pasiva. Después de que las *conidia* han sido descargadas, pueden entrar en corrientes de aire y alcanzar otras colonias de áfidos donde puedan iniciar una infección (Figura 2A) (Pell *et al.*, 2001; Hemmati *et al.*, 2002).

La forma activa involucra adultos alados y enemigos naturales (Figuras 2B y 2D). *P. neoaphidis* podría ser dispersado extensamente con el vuelo de sus hospederos alados. Se ha demostrado que alrededor del 30 % de insectos alados activos tienen algunas clases de patógeno fúngico, incluyendo *P. neoaphidis*. El potencial para la dispersión de los Entomophthorales con el vuelo migratorio de los alados es sobresaliente, ya que puede ocurrir a varios cientos de kilómetros (Holman *et al.*, 1991; Chen y Feng, 2005). Debido a que el tiempo de mortalidad provocada por *P. neoaphidis* puede variar en los áfidos (Wilding, 1970), algunos insectos alados pueden emprender el vuelo y llevar consigo al patógeno (Chen y Feng, 2005) y desarrollar la enfermedad en otras colonias (Figura 2C). Las hembras fundatrices enfermas constituyen una fuente de contagio cuando colonizan a la planta hospedera ya que producen una gran cantidad de ninfas antes de morir, que son altamente susceptibles al ataque de *P. neoaphidis*, el cual provoca mayor mortalidad en los primeros estadios ninfales que en los últimos, de igual manera la enfermedad se presenta más en adultos alados que en ápteros (Milner, 1982; Glare y Milner, 1991; Nielsen y Hajek, 2005).

Los enemigos naturales de los áfidos como Coccinellidae (Figura 2D), también pueden actuar como dispersores del patógeno. *Coccinella*

*septempunctata* demostró tener un efecto sobre la disposición espacial del patógeno y un gran potencial como vector de *P. neoaphidis* en colonias de *Acyrtosiphon pisum* en estudios de laboratorio y campo (Roy *et al.*, 2001; Roy *et al.*, 2003).

El entendimiento de los factores de dispersión de *P. neoaphidis*, aunado a otros estudios ecológicos, podrían ser esenciales para la incorporación de éste entomopatógeno en programas de manejo integrado de plagas mediante la inducción de epizootias en campo.



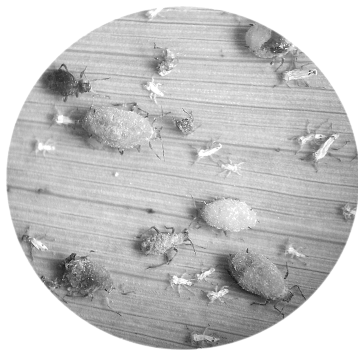
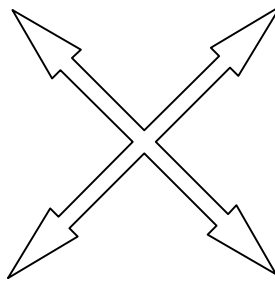
**Figura 1. Ciclo biológico de *Pandora neoaphidis*.** **1A**, *Conidia* primaria (**I**) con capa de mucílago (**II**). **1B**, Las conidia primaria entran en contacto con el áfido y se adhiere. **1C-1D**, La conidia germina y busca un sitio de penetración en el hospedero. **1E**. El insecto enfermo es fijado al substrato mediante hifas especializadas llamadas rizoides. **1F-1G**; **1F**, Dentro del hospedero, *P. neoaphidis* se reproduce y genera una momificación en el áfido; **1G**, Los cistidios rompen la cutícula del insecto para dar paso a los conidióforos. **1H-1I**; **1H**, Los conidióforos dan apariencia aterciopelada al insecto muerto y producen las conidia para la infección (**II**). **1J**, Las conidia son expulsadas al ambiente para continuar el ciclo se infección.



**A**



**B**



**C**



**D**

**Figura 2. Principales dispersores de *Pandora neoaphidis*.** **2A**, El viento es uno de los principales factores de dispersión en *P. neoaphidis*. **2B**, Dispersión de inóculo por medio de adultos alados. **2C**, Transmisión horizontal de insectos infectados a sanos dentro de una misma colonia. **2D**; Acarreo de inóculo por enemigos naturales (Coccinellidae) de colonias infectadas a colonias sanas, a través de la alimentación.

### 1.7 Literatura citada

- Burges, H. D. 1998.** Formulation of Mycoinsecticides. pp.132-185. *In:* Burgues, H. D. Formulation of Microbial Biopesticides (ed.). Kluwer Academic Publisher.
- Butt, .T. M, C. Jackson and N. Magan. 2001.** Introduction. pp. 1-8. *In:* Fungi as Biocontrol Agents. Butt, T.M., C. Jackson and N. Magan (eds.).Fungal Biological Control Agents, Progress, Problems and Potential CAB International.
- Butt, T. M., A. Beckett and N. Wilding. 1990.** A histological study of the invasive and developmental processes of the aphid pathogen *Erynia neoaphidis* (Zygomycotina: Entomophthorales) in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Can. J. Bot.* 68: 2153-2163.
- Butt, T. M., A Beckett and N. Wilding. 1981.** Protoplast in the in vivo life cycle of *Pandora neoaphidis*. *J. Gen. Microbiol.* 127:417-421.
- Carruthers, R. I. and Soper, R. S. 1987.** Fungal Diseases. pp. 359-416.*In:* Tanada, Y. and H. K. Kaya (eds.). Epizootiology of insect diseases. Wiley-Interscience Publications. N. Y.
- Chen, C. and M. G Feng. 2005.** Epizootiological modeling of *Pandora neoaphidis* mycosis transmission in *Myzus persicae* Colonies Initiated by Primarily Infected Alates. *Applied and Environmental Microbiology.* 71 (7): 4104-4107.
- Dara, S. K. and P. J. Semtner. 1998** Influence of substrate and temperature on the developmental morphology of *Pandora neoaphidis* (Zygomycetes: Entomophthorales). *J. Invertebr. Pathol.* 72:112-118.
- Evans, H. C. 1989.** Mycopathogens of insects of epigial and aerial habitats. pp. 205-238. *In:* N, Wilding, N. M. Collins and J. F. Webber (eds.) Insect-fungal interactions. Academic Press, London.
- Feng, M.G., C. Chen and B. Chen. 2004.** Wide dispersal of aphid- pathogenic Entomophthorales among aphids relies upon migratory alates. *Environmental Microbiology* 6: 510-516



- Feng, M. G., R. M. Nowierski, R. E. Klein, L. A. Scharen and D. C. Sands. 1992.** Spherical hyphal bodies of *Pandora neoaphidis* (Reamudière and Hennebert) Humber (Zygomycetes: Entomophthorales) on *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Homoptera: Aphididae): a potencial overwintering from. *Pan-Pacific Entomologist* 68:100-104.
- Feng, M. G., B.J. James and P. K. Leslie. 1990.** Survey of entomopathogenic fungi naturally infecting cereal aphids (Homoptera: Aphididae) of irrigated grain crops in southwestern Idaho. *Entomological Society of America* 19 (5): 1534-1542.
- Glare, T. R. and R. J. Milner. 1991.** Ecology of entomopathogenic fungi. *In:* Aurora, D.K., L. Ajello and K. G., Mukerji (eds). *Handbook of Applied Mycology. Human, Animals and Insects.* Marcel Dekker, New York. (2):547-612.
- Hajek, A. E. 1997.** Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. *Advances in Microbial Ecology* 15: 193-249.
- Hatting, L. H., R. A. Humber, T. J. Poprawski and R. M. Miller. 1999.** A survey fungal pathogens of aphids from South Africa, with special reference to cereal aphid. *Biological Control*, 16:1-12.
- Hemmati, F., J. K. Pell, H. A. Mc Cartney and M. L. Deadman. 2002.** Aerodynamic diameter of *conidia* of *Erynia neoaphidis* and other entomophthoralean fungi. *Mycological Research*. 106 (2): 233-238.
- Holman, J., R. Peña-Martínez and R. Bujanos-Muñoz. 1991.** Guía para la identificación y análisis de los pulgones alados (Homoptera: Aphididae) del Bajío México. *Folia Entomológica Mexicana*. 83:5-67.
- Humber, R. A. 1998a.** Entomopathogenic fungal identification. APS/ESA Joint Meeting 8-12 November 1998. Las Vegas, NV. 26 p
- Humber, R. A. 1998b.** Synopses of a revised classification for the Entomophthorales (Zygomycotina). *Mycotaxon* 34 (2): 441-460.

- Inglis, G. D., M. S. Goettel, T. M. Butt and H. Strasser. 2001.** Use of Hyphomycetous fungi for managing insects pests. pp 23-69. *In: Butt, T. M. and N. Magan (eds). Fungi as biocontrol agents. CABI Publishing. New York*
- Jeffries, P and T. W. K Young. 1994.** Interfungal parasitic relationships. Wallingford, Oxon UK: CAB International.
- Kalkar, Ö. 2005.** A SEM Study of The Sporulation Process of *Pandora neoaphidis* and *Neozygites fresenii*. *Turk J. Biol.* 29:137-147.
- Keller, S. and G. Zimmerman. 1989.** Mycopathogens of soil insects. pp. 240-270. *In: Wilding, N; N. M. Collins and J. F. Webber (eds.) Insect-fungal interactions. Academic Press, London.*
- King, D. S. and R. A. Humber 1981.** Identification of the Entomophthorales. pp. 107-127. *In: Burges, E. D. (ed.), Microbial control of pests and plant diseases. Academic Press, London.*
- Mcleod, P., J., D.C. Steinkraus, J.C. Correll and T. E. Morelock. 1998.** Prevalence of *Erynia neoaphidis* (Entomophthorales: Entomophthorace) Infections of green peach aphid (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology* 27 (3): 796-800.
- Meyling, N. V., and J. Eilenberg. 2007.** Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control* 43(2): 145-155
- Milner, R. J. 1982.** On the occurrence of pea aphids *Acyrtosiphon pisum*, resistant to isolates of the fungal pathogens *Erynia neoaphidis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 37: 235-240.
- Morgan, L. W., L. Boddy, S. J Clark, and N. Wilding. 1995.** Influence of temperature on germination of primary and secondary conidia of *Erynia neoaphidis* (Zygomycetes: Entomophthorales). *J. Invertebr. Pathol.* 65:132-138.

- Nielsen, C. and A. E. Hajek. 2005.** Control of invasive soybean aphid, *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae), populations by existing natural enemies in New York State, with emphasis on Entomopathogenic Fungi. *Environmental Entomology* 34 (5): 1036-1047.
- Nielsen, C, J. Eilenberg and K. Dromph. 2001.** Entomophthorales on cereal aphids. The Royal Veterinary and Agricultural University. Department of Ecology. Denmark. 70 p.
- Nielsen, C., A. E. Hajek, R. A. Humber and J. Eilenberg. 1998.** Soil a natural source of entomophthoralean fungi infecting aphids. *Insect pathogens and insect parasitic nematodes. IOBC Bulletin* 21 (4): 45-48.
- Papierok, B. and A. E. Hajek. 1997.** Fungi: Entomophthorales. pp. 87-212. *In: Lacey Lawrence A. (eds.). Manual of Techniques in Insect Pathology.* Academic Press. New York.
- Pell, J. K., J. Eilenberg, A. E. Hajek and D.C. Steinkraus. 2001.** Biology, ecology and pest management potential of entomophthorales. 71- 153 pp. *In: T.M. Butt, C.W. Jackson and N. Magan (eds). Fungi as Biocontrol agents, progress, problems and potencial.* CABI Publishing.
- Remaudiere, G. y Latge, J. P. 1985.** Importancia de los hongos patógenos de insectos especialmente Aphididae y Cercopidae en Méjico y perspectivas de uso. *Bol. Ser, Plagas* 11. 217-225
- Roermund van, H. J. W., D. F. Perry and D. Tyrrell. 1984.** Influence of temperature, light, nutrients and PH in determination of the mode of conidial germination in *Zoophtora radicans*. *Transactions of the British Mycological Society* 82: 31-38.
- Roberts, D. W., and A. E. Hajek. 1992.** Entomopathogenic fungi as bioinsecticides. pp. 144-159. *In: G. F. Leatham (ed.), Frontiers in industrial mycology.* Chapman and Hall, New York, N.Y.
- Roy, H. E., D. C. Steinkraus., J. Eilenberg., A. E. Hajek and J. K Pell. 2006.** Bizarre interactions end endgames: entomopathogenic Fungi and Their Arthropod Hosts. *Ann. Rev. Entomol.* 51: 331-357.

- Roy, H. E., P. G. Alderson and J. K. Pell. 2003.** Effect of spatial heterogeneity on the roll of *Coccinella septempunctata* as an intra-guild predator of the aphid pathogen *Pandora neoaphidis*. *J. Invertebr. Pathol.* 82: 85-89.
- Roy, H. E., J. K. Pell and P. G. Alderson. 2001.** Targeted Dispersal of the Aphid Pathogenic Fungus *Erynia neoaphidis* by the Aphid Predator *Coccinella septempunctata*. *Biocontrol Science and Technology.* 11: 99-11
- Sánchez-Peña, S. 2000.** Entomopathogens from two chihuahuan desert localities in México. *Bio Control* 45:63-78.
- Shah, P. A. and J. K. Pell. 2003.** Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61: 413-423.
- Shah, P. A., S. J. Clarck and J. K. Pell. 2004.** Assessment of aphid host range and isolate variability in *Pandora neoaphidis* (Zygomycetes: Entomophthorales). *Biological Control* 29: 90-99.
- Vestergaard, S. A. C. Siegfred and M. Goettel. 2003.** Safety of Hyphomycete fungi as microbial control agents *In:* Hokkanen, H.M.T. and Hajek A.E. (eds.), *Environmental impacts of Microbial insecticides.* Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp.35-62
- Thomas, M. B. and S. N. Wood. 1997.** Fungal Ecology and its applications to the practical use of mycoinsecticides. *BCPC Symposium Proceedings N° 68: Microbial Insecticides; Novelty or Necessity.* 63-72 pp.
- Wilding, N. 1970.** *Entomophthora* conidia in the air-spora. *Journal of General Microbiology* 62:126-130.
- Wilding, N., Mardell, S. K., y Brobyn, P. J., 1986.** Introducing *Erynia neoaphidis* into a field population of *Aphis fabae*: form of the inoculum and effect of irrigation. *Annals of Applied Biology* 108:373-385.

## CAPITULO 2

### **Presencia de *Pandora neoaphidis* (Remaudière y Hennebert) Humber en áfidos (Homoptera: Aphididae) de cultivos agrícolas en el norte de Tamaulipas**

#### **2.1 Resumen**

En el norte de Tamaulipas, México, se detectaron epizootias en poblaciones de áfidos generadas por el hongo Entomophthoral *Pandora neoaphidis* (Remaudière & Hennebert) Humber. Este entomopatógeno fue detectado en tres especies importantes de áfidos plaga: pulgón del cogollo, *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) en sorgo; pulgón verde, *Myzus persicae* (Sulzer) en canola; y pulgón cenizo, *Brevicoryne brassicae* (L.) en col. Las epizootias fueron detectadas en cultivos establecidos en los municipios de Matamoros, Valle Hermoso, Río Bravo y Reynosa Tams, Méx. La incidencia del hongo se observó en marzo de 1999 en el municipio de Río Bravo, Tams, Méx. En años posteriores, este hongo se manifestó de manera cíclica durante los meses de marzo y abril. La ocurrencia del hongo se ha asociado a condiciones de temperatura 20° C,  $\pm$  5, humedad relativa superior al 90% y vientos fríos provenientes del norte, las cuales prevalecen durante esos meses; estos factores coinciden con la presencia de altas infestaciones de áfidos en los cultivos mencionados. Los porcentajes de mortalidad de áfidos debido al ataque de *P. neoaphidis* variaron de 1% a 52% en sorgo sobre *R. maidis*, hasta mas del 90% en *B. brassicae* en canola. El presente documento constituye el primer registro de *P. neoaphidis* en el estado de Tamaulipas, México

#### **2.2 Introducción**

En Tamaulipas, México, se destinan 650,000 hectáreas al cultivo de sorgo de grano *Sorghum bicolor* L., con una producción anual de 1, 614,438 toneladas, (Siap- SAGARPA, 2006).

Durante los meses de marzo y abril es común la incidencia del pulgón del cogollo *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) en el cultivo del sorgo, *Sorghum bicolor* (L.)

(Loera y Vargas 1982). Existen otros cultivos como el maíz, *Zea mais* L., la canola, *Brassica napus* y diversas hortalizas, principalmente col, *Brassica oleracea*, los cuales son atacadas por los áfidos *R. maidis*, *Myzus persicae* (Sulzer) y *Brevicoryne brassicae* (L.), respectivamente.

Los áfidos en el norte de Tamaulipas, se encuentran asociados a un gran número de enemigos naturales como depredadores y parasitoides, dentro de los que destacan especies de Coccinellidae: *Hippodamia convergens* (Guerin Meneville), *Cycloneda sanguinea* (L), *Coleomegilla maculata* (Degeer), *Harmonia axyridis* (Pallas) y *Scymnus* sp. Kugelann; el neuroptero *Chrysoperla carnea* (Stephens), algunos dípteros de la familia Syrphidae e himenópteros endoparasitoides como *Lisiphlebus testaceipes* (Cresson)

Los hongos entomopatógenos son endoparásitos de plagas de insectos que ocurren en forma natural. Pueden ocasionar epizootias que abaten las poblaciones de insectos chupadores. Los áfidos pueden ser infectados por hongos como *Conidiobulus obscurus*, (Hall y Dunn) Remaudière y Keller, *Pandora neoaphidis* (Remaudière y Hennebert) Humber, *Entomophthora chromaphidis* Burger y Swain, *Zoophthora occidentalis* (Thaxter) Batko, *Z. radicans* (Brefeld) Batko, *Neozygites fresenii* (Nowakowski) Remaud. y Keller, y *Lecanicillium lecanii*, (Zimm.) Gams y Zare (White *et al.*, 2000; Berlanga, 2001). La mayoría de los hongos entomopatógenos se caracterizan por la capacidad de dispersión de sus esporas a partir de insectos muertos (Shah y Pell, 2003), insectos migrantes (Feng *et al.*, 2004) o por dispersión aérea de las esporas infectivas (Hajek 1997). El impacto de las epizootias naturales sobre las poblaciones de insectos, así como su introducción como bioinsecticidas, ha demostrado su potencial dentro del control microbiano de plagas (Hajek y St. Leger, 1994; Butt *et al.*, 2001; Nielsen y Hajek, 2005). Esto ha favorecido que en los últimos años sean considerados como factores de regulación de plagas agrícolas (Butt *et al.*, 2001).

El objetivo de esta investigación fue identificar al principal agente biológico regulador de poblaciones de áfidos de las especies de sorgo, maíz y canola, así como conocer su distribución estacional, rango de hospederos, e incidencia en el norte del estado de Tamaulipas, bajo las siguientes hipótesis:

1) El hongo entomopatógeno causante de las epizootias en el norte de Tamaulipas sobre poblaciones de áfidos, esta ampliamente distribuido en la zona, 2) las epizootias están relacionadas con temperatura templada (15 a 20 °C) y alta humedad.

## 2.3 Materiales y métodos

### 2.3.1 Zona geográfica de investigación

El estudio fue realizado en el norte del estado de Tamaulipas, Méx., durante los meses de marzo y abril 2005 y 2006. Se realizaron recorridos por siete y nueve semanas y se revisaron los cultivos con mayor probabilidad de presencia de áfidos como: canola (2005) y sorgo (2005 y 2006) (Cuadro 2.1). El área muestreada considerando el perímetro de los ocho municipios, abarcó una superficie de 5,000 km<sup>2</sup> aproximadamente.

**Cuadro 2.1.** Municipios muestreados en el norte de Tamaulipas

Municipio	Latitud N	Longitud E	Cultivo	Áfido	Año
Río Bravo	25° 57`	098° 01`	Canola	<i>B. brassicae</i> <i>M. persicae</i> * y	2005
			Sorgo	<i>R. maidis</i>	2006
Miguel Alemán	26° 22` 25.3``	098° 57` 37.2``	Maíz	<i>R. maidis</i>	2006
Camargo	26° 20` 26.6``	098° 51` 05.7``	Maíz	<i>R. maidis</i>	2006
Díaz Ordaz	26° 12` 51.8``	098° 36` 10.5``	Maíz	<i>R. maidis</i>	2006
Reynosa	26° 09` 18.6``	098° 23` 37.0``	Maíz	<i>R. maidis</i>	2006
Valle Hermoso	25° 49` 16.3``	097° 47` 55.1``	Sorgo	<i>R. maidis</i>	2006
Matamoros	25° 51` 35.0``	097° 32` 55.0``	Sorgo	<i>R. maidis</i>	2006
San Fernando	25° 13` 8.6``	98° 10` 3.5``	Sorgo	<i>R. maidis</i>	2006

\* Solo se observaron algunos individuos aislados en canola

Los sitios de colecta fueron geoposicionados mediante GPS Garmin etrex ® y ubicados en un mapa de Tamaulipas, Méx., mediante el software Idrisi Kilimanjaro 14.02. En estas áreas predomina el clima semiseco B (*h*) muy cálido A (*h*) *h* y cálido A (*h*), con lluvias en verano y escasas el resto del año

(García, 1973) Los datos de temperatura, humedad relativa y precipitación imperantes durante 2005 y 2006 fueron obtenidos de la estación meteorológica automatizada del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ubicada en el Campo Experimental Río Bravo (CERIB), Río Bravo, Tams., Méx.

### **2.3.2 Colecta y obtención de muestras**

Para detectar la presencia de áfidos en sorgo, se muestrearon 10 cogollos de plantas distribuidas en cinco puntos de la parcela a fin de formar una figura geométrica en forma de rombo o comúnmente conocida como “cinco de oros”. Una vez localizadas las colonias de áfidos, se marcó el sitio para realizar muestreos semanales. Se tomaron muestras de áfidos micosados del tercio superior del orificio del cogollo de la planta, y se depositaron en forma individual en bolsas de plástico de 25x25 cm, en hieleras del mismo material a una temperatura de 22°C. En canola se realizó el mismo proceso y se contabilizó el total de áfidos. El cálculo del porcentaje de mortalidad de los individuos en la colonia y el manejo posterior del material se realizó en el laboratorio del CERIB donde fue mantenido a una temperatura de 8°C por un periodo de hasta 72 horas. Los áfidos micosados y con síntomas de enfermedad, fueron colocados en cajas Petri de 50 mm de diámetro, con sus datos de colecta. Se registraron características morfológicas de los áfidos infectados: coloración, apariencia, adhesión al substrato y alteraciones corporales. Los áfidos sanos se conservaron en alcohol 70% para su determinación taxonómica.

Las especies de áfidos colectados se determinaron mediante el uso de las claves taxonómicas de Holman *et al.*, (1991) para individuos alados.

### **2.3.3 Identificación del patógeno**

Los áfidos micosados fueron fijados en montajes semipermanentes en azul algodón lactofenol (1%). La preparación después de sellada con esmalte



para uñas se observó al microscopio compuesto para realizar la identificación preliminar del hongo. Para la obtención de esporas se utilizaron cajas Petri de 100 mm de diámetro, en las que se colocaron áfidos micosados en la parte interna de la tapa, sobre rodajas de 1.5 cm de diámetro de agar-agua 1%. Las esporas producidas fueron colectadas en un cubreobjetos localizado en la base de la misma y se les proporcionó la tinción y sellado que se mencionó anteriormente. Para determinar las dimensiones de las *conidia* se utilizó un Fotomicroscopio III Carl Zeis, una cámara digital Pixera Professional para la toma de fotografías de las estructuras del hongo, y el Software Image Tool, versión 1.27. Se midieron un total de 100 *conidia* para estimar longitud y ancho

Para la determinación taxonómica del patógeno a nivel género, se utilizaron las claves de Humber (1998). Imágenes digitales de las diferentes estructuras del hongo, así como algunos ejemplares muertos se enviaron a Richard A. Humber, (USDA-ARS, Ithaca, N.Y) para la determinación específica.

#### **2.3.4 Aislamiento del entomopatógeno.**

Los aislamientos fueron obtenidos mediante la técnica de Keller (1993). Para obtener esporas libres de contaminantes se introdujeron los áfidos micosados por 10 segundos en etanol 70%, dos minutos en hipoclorito de sodio y dos lavados en agua destilada estéril por dos minutos cada uno y posteriormente colocados en el medio SEMA, constituido por agar Sabouraud, yema de huevo y leche (Papierok y Hajek, 1997). Para el desarrollo del hongo, se utilizaron cajas Petri de 90 mm con 20 ml de SEMA. Las muestras se incubaron en cámaras bioclimática Lab Line® a 15° C± 0.5. Los aislamientos se mantienen en la colección de entomopatógenos del Laboratorio de Patología de Insectos del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Méx.

## **2.4 Resultados**

### **2.4.1 Identificación del patógeno y hospederos**

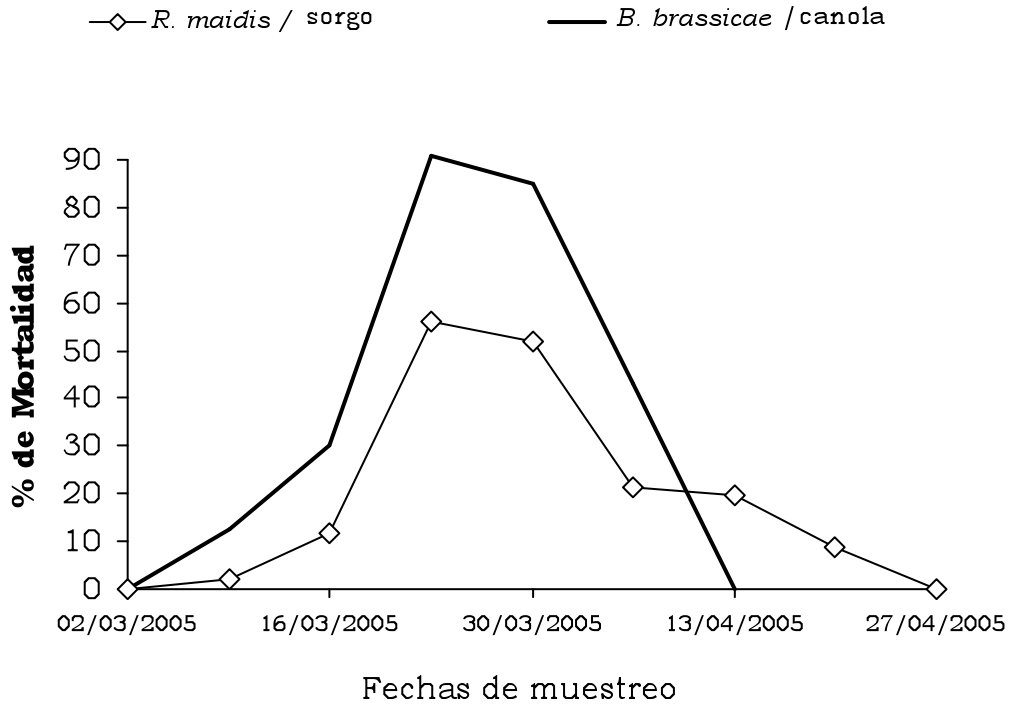
Se determinó al hongo asociado a áfidos como *Pandora* sp. El especialista Richard Humber lo clasificó como *Pandora neoaphidis* (Reamudière y Hennebert) Humber. Se determinaron tres especies de áfidos (Homoptera: Aphidae) atacados por *P. neoaphidis*: el pulgón cenizo de la col, *B. brassicae*, y el pulgón verde del durazno, *M. persicae* en canola, y el pulgón del cogollo, *R. maidis* en sorgo.

### **2.4.2 Ocurrencia de *P. neoaphidis* en el norte de Tamaulipas.**

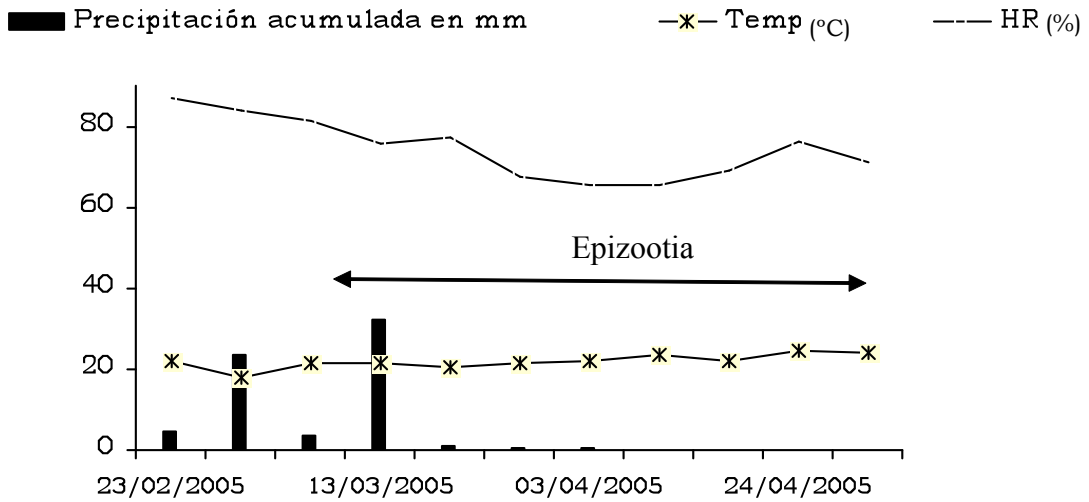
La detección de pulgones infectados por *P. neoaphidis* en sorgo y canola se presentó en marzo y abril, en 2005 y 2006. Las infecciones se presentaron después de la entrada de frentes fríos acompañados de alta humedad, conocidos en la región como “nortes”. En ambos períodos se observó una aparición progresiva del patógeno en pocas semanas (Figuras 3 y 5). Estos resultados son congruentes con la presencia de *P. neoaphidis* en la zona, donde se ha detectado desde 1999 en el municipio de Río Bravo constantemente en sorgo.

Las poblaciones de *M. persicae* en canola fueron escasas y su presencia se restringió a individuos que ocasionalmente compartieron el espacio con poblaciones de *B. brassicae*. El material parasitado, sirvió para la descripción de los síntomas y signos de la infección y no para estimar las mortalidades

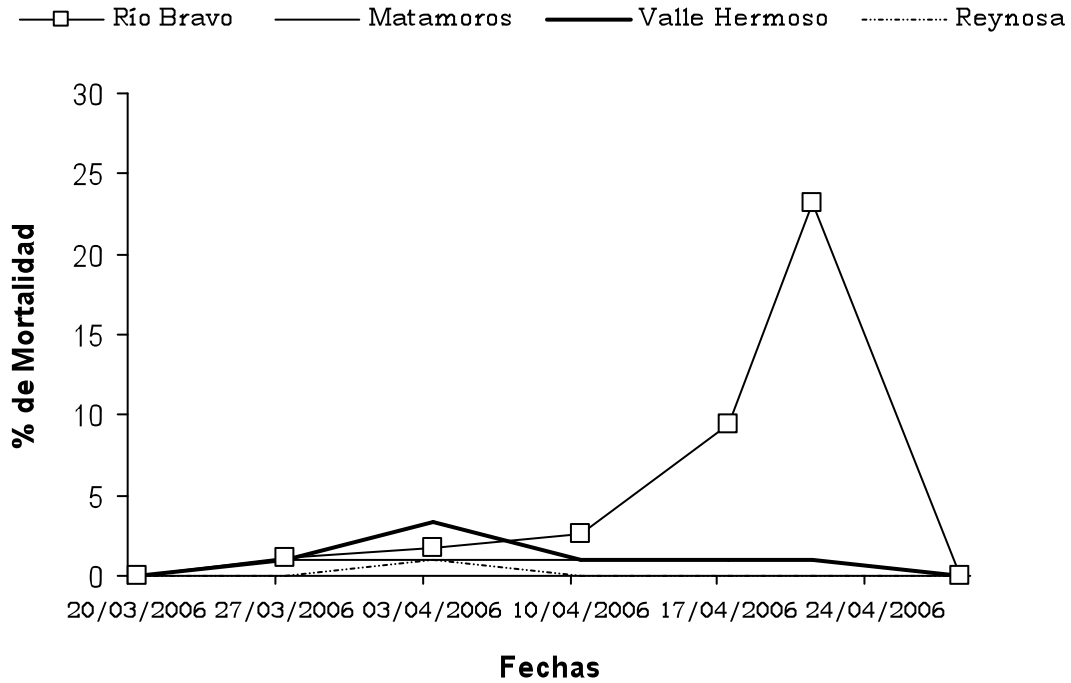
Se encontró al hongo entomopatógeno en: Río Bravo, en los cultivos de col, canola y sorgo; Reynosa, en maíz y en el área de Matamoros, y Valle Hermoso, Tams., en sorgo (Cuadro 2.1, Figura 7). No se detectaron áfidos infectados en maíz en los municipios de San Fernando, Díaz Ordaz, Camargo, y Miguel Alemán (Cuadro 2.1, Figura 7). La ausencia de *P. neoaphidis* se relacionó directamente con la ausencia de áfidos durante los muestreos realizados en maíz.



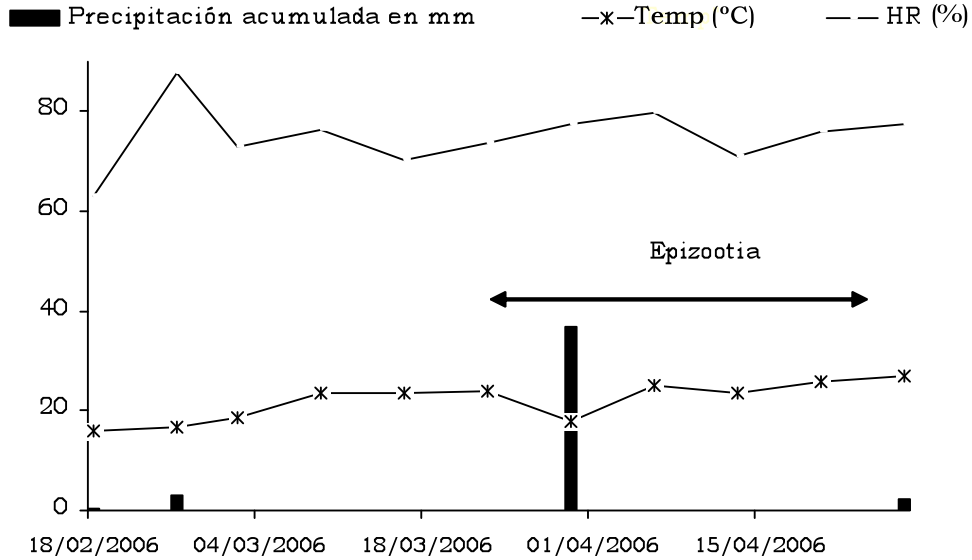
**Figura 3.** Mortalidad provocada por *P. neophidis* en áfidos sobre cultivos de canola y sorgo en el municipio de Río Bravo en el 2005.



**Figura 4.** Variación del clima en el Mpio. de Río Bravo en 2005.



**Figura 5.** Mortalidad de *P. neoaphidis* sobre *R. maidis* en sorgo, en cuatro municipios del norte de Tamaulipas en el 2006.



**Figura 6.** Variación del clima en el municipio de Río Bravo, Tamaulipas, en 2006.

### 2.4.3. Condiciones climáticas

Durante el periodo de muestreo en 2005 y 2006, las condiciones climáticas fueron muy similares con excepción de la precipitación acumulada, siendo mayor en 2005 (Cuadro 2.2). Durante 2005, la precipitación acumulada fue de 113.6 mm, distribuida en 18 eventos de lluvia ligera a moderada, mientras que en 2006, se registraron siete eventos con un total de 42.6 mm.

**Cuadro 2.2.** Condiciones climatológicas del primer cuatrimestre 2005 y 2006 en el norte de Tamaulipas

Mes	Año	T. máxima.	T. mínima	Media	Velocidad del Viento	Precipitación en mm	% Humedad Relativa
Enero	2005	22.12	12.59	17.35	11.77	24.40*, **	71.45
Enero	2006	24.48	11.81	18.14	26.00	0.00 <sup>1</sup>	68.48
Febrero	2005	25.06	15.65	20.35	22.08	51.47*	81.80
Febrero	2006	23.89	10.13	17.01	25.50	3.60*	67.68
Marzo	2005	27.78	15.67	21.73	23.35	37.80*	74.16
Marzo	2006	27.45	17.42	22.43	24.68	36.80*	74.90
Abril	2005	29.79	16.48	23.14	24.17	0.00*	69.77
Abril	2006	30.97	20.06	25.51	22.30	2.20*	75.48
<b>Promedio 2005</b>		<b>26.19</b>	<b>15.09</b>	<b>20.64</b>	<b>20.34</b>	<b>113.67</b>	<b>74.30</b>
<b>Promedio 2006</b>		<b>26.70</b>	<b>14.85</b>	<b>20.77</b>	<b>24.62</b>	<b>42.60</b>	<b>71.64</b>

\*Precipitación acumulada, \*\* Solo hasta el día 22

### 2.4.4 Características de áfidos infectados

Las momias presentaron variaciones según la especie, *R. maidis* y *B. brassicae* conservaron su estructura corporal piriforme, solo con ligeros cambios (Figura 8A, 8C y 8D), la infección en *M. persicae* provocó un aplanamiento dorsoventral con una ligera depresión en la región dorsal (Figura 8B). *P. neoaphidis* parasitó todos los instars ninfales de *R. maidis* y *B. brassicae* (Figura 8A y 8E). Las momias de *R. maidis* colectadas en el interior del cogollo de las plantas de sorgo presentaron características distintas a las encontradas fuera de éste, ya que mantuvieron una coloración blanco-cremoso, cuerpos uniformemente “aterciopelados” y de forma elíptica (Figura 8A),

mientras que las momias fuera de él mostraron coloración parda y superficie corporal irregular con presencia de tubérculos (Figura 8A y 8C).

Los pulgones momificados y con suficiente hidratación presentaron coloración beige y desarrollaron cistidios y conidióforos evidentes en toda la superficie del cuerpo (Figuras 8B y D). Estas últimas estructuras surgieron a través del integumento del insecto y son una vía de reproducción asexual del hongo. El ancho de los conidióforos osciló entre los 3.31 y 4.99  $\mu\text{m}$ , con una media de  $3.96 \pm 0.48 \mu\text{m}$  (n=100). Todas las momias encontradas estuvieron adheridas al sustrato por rizoides, presentes en la región ventral del meso y metatórax y de los primeros escleritos abdominales (Figura 8F). Esta característica permite al hongo fijar a su hospedero al sustrato y dispersar las esporas en el ambiente y continuar con el ciclo de infección. Las esporas presentaron características piriformes (Figuras 8G y H), con un rango de longitud entre los 13.43 y 21.07  $\mu\text{m}$ , y una media de  $16.22 \pm 1.91 \mu\text{m}$  (n=100) y un intervalo de ancho entre 6.76 a 12.72  $\mu\text{m}$ , con una media de  $9.37 \pm 1.17 \mu\text{m}$ . Debido a la similitud morfométrica entre esporas primarias (Figura 8HA), y secundarias (Figura 8HB), todas las esporas observadas en los cuerpos de los insectos fueron consideradas primarias.

#### **2.4.5 Aislamientos**

En poblaciones de *B. brassicae* y *R. maidis* se encontró la presencia de *P. neoaphidis*, sin embargo solo se obtuvieron cinco aislamientos de *P. neoaphidis* en la zona, todos obtenidos de *R. maidis* en el municipio de Río Bravo: RBA, RBB, RBF, RBG y RBH (RB= Río Bravo, Tam., la letra adicional corresponde al aislamiento). No se logró obtener aislamientos de *B. brassicae* debido a la dificultad del manejo de estos entomopatógenos y de la facilidad con la que los insectos micosados se contaminan con bacterias y otros hongos.

## 2.5 Discusión

### 2.5.1. Mortalidad causada por *P. neoaphidis*

Los porcentajes de mortalidad registrados en el norte de Tamaulipas variaron con el año y cultivo. La diferencia en mortalidad en ambos años parece estar más relacionada con la precipitación que con la temperatura y la HR, puesto que éstas últimas no mostraron diferencias importantes (Cuadro 2.2 y Figuras 4 y 6). El inicio de epizootia en ambos años fueron precedidas de una precipitación, sin embargo, se presentaron incrementos posteriores en la mortalidad en ausencia de éstas. Se conoce que *P. neoaphidis* requiere HR superior al 93% para su desarrollo y esporulación (Pell *et al.*, 1998). En la zona de estudio se presentaron temperaturas promedio bajas (14 y 15° C), durante la noche-madrugada generando la formación de rocío sobre las hojas de los cultivos. El punto de rocío o proceso de condensación ocurre cuando la saturación de humedad en el ambiente es enfriada sin ser alterada (Naya, 1984), esta condición generalmente proporciona la humedad en el ambiente necesaria para el desarrollo del hongo.

En maíz se presentó la menor mortalidad de áfidos (Figura 5). Colonias dispersas de pocos individuos fueron la constante en el cultivo. Fuxa y Tanada (1987) mencionan que el primer paso para el proceso de infección es una alta densidad del hospedero, la cual fue inexistente en el cultivo. Aplicaciones de insecticidas como decis, lanate y productos a base de cipermetrina y deltametrina, fueron realizados contra lepidópteros defoliadores en el cultivo durante la investigación. Al respecto Li y Holdom (1994) señalan que los insecticidas interfieren en el desarrollo de las epizootias.

En sorgo, durante el año de 2005 en el municipio de Río Bravo, se observó una infección por *P. neoaphidis* sobre *R. maidis* superior al 50%; mientras que en el 2006 el porcentaje máximo fue de 23.2 %, incluso el período de prevalencia de *P. neoaphidis* fue mayor en el 2005 (Figuras 4 y 6). También existieron diferencias importantes de mortalidad entre los distintos municipios donde se registró *P. neoaphidis*. En la localidad de Río Bravo, en los dos años de estudio, se presentaron los porcentajes de mortalidad más elevados de la zona

(Figuras 3 y 5). A diferencia de ésta, las áreas restantes son consideradas de temporal, y sin acceso a riegos, por lo que la humedad relativa fue desfavorable para el hongo.

La mortalidad más elevada se presentó en el pulgón cenizo de la col donde se detectaron colonias hasta con un 90% de mortalidad (Figura 3). Al parecer las poblaciones de *B. brassicae* fueron más susceptibles al entomopatógeno que las de *R. maidis* ya que existió una diferencia de mortalidad de un 40%. La canola en el norte de Tamaulipas se siembra en una zona aproximada de 2,500 ha; en comparación, el sorgo es cultivado en 800,000 ha, distribuidas en diferentes escenarios ecológicos desde hace más de 50 años. *R. maidis* ha permanecido en constante contacto con el patógeno y la posibilidad de mecanismos eficientes de defensa o la selección de biotipos resistentes al patógeno es factible, como lo reportado por Hughes y Bryce (1984) en *Acyrtosiphon pisum*, donde indican dos biotipos, uno susceptible y otro resistente al ataque de *P. neoaphidis*.

En el 2006 en canola, *B. brassicae* estuvo ausente, atribuido entre otras causas, al establecimiento en la región de fechas tempranas de siembra y al uso de variedades mas precoces que aparentemente escaparon a la infestación de *B. brassicae*.

### **2.5.2 Características de infección**

Los áfidos enfermos presentaron menor movilidad y coordinación durante su desplazamiento, en comparación con los sanos; con un cambio en la coloración, de verde a pardo-amarillo, etapa previa a la momificación y por último la emergencia de las estructuras reproductivas (conidióforos y cistidios). Áfidos atacados por *P. neoaphidis* presentaron tubérculos (Figura 8C) en la superficie corporal. Kalkar (2005) menciona que éstas estructuras se forman antes de la diferenciación de los cuerpos hifales a rizoides, cistidios y conidióforos. Tal condición sugiere que el entomopatógeno quedo inhibido en la fase previa a la esporulación, principalmente por déficit en la HR. Las esporas cuando fueron expulsadas por los cadáveres formaron un halo alrededor del



insecto infectado, dando la apariencia de una capa blanquecina, característica de los Entomophthorales (Papierok y Hajek, 1997), esta condición también fue observada por Hatting *et al.*, (1999) en áfidos atacados por *P. neoaphidis* en cereales de Sudáfrica.

### **2.5.3 Supervivencia del hongo**

Las condiciones de humedad y temperatura para el desarrollo de *P. neoaphidis* fueron muy semejantes en el 2005 y 2006 (Cuadro 2.2). Diferencias más importantes se registraron en la precipitación, que fue significativamente más alta en el primer trimestre del 2005. La información acerca de la influencia de la precipitación sobre la transmisión y prevalencia del patógeno es escasa; sin embargo, se ha documentado que la lluvia es un factor importante para la generación de humedad relativa alta que favorece el desarrollo del patógeno (Pell *et al.*, 1998).

### **2.5.4 Factores que favorecen la epizootia.**

Se desconocen los mecanismos por los cuales *P. neoaphidis* se manifiesta en el área del norte de Tamaulipas, así como la supervivencia durante la ausencia de hospederos y en los periodos de altas temperaturas (superiores a 30° C) que prevalecen en la zona durante verano y otoño. *P. neoaphidis* podría sobrevivir en áfidos anholocíclicos, como *R. maidis*, a través de una infección continua (Byford y Reeves, 1969); sin embargo, esta posibilidad de supervivencia en la zona norte de Tamaulipas puede ser limitada por dos factores: 1) las temperaturas superiores a los 30° C que se presentan continuamente entre los meses de mayo-octubre, que inhiben el desarrollo del hongo y 2) la ausencia de hospederos en ese tiempo.

En el norte de Tamaulipas, Méx., durante el periodo de la aparición de la epizootia, se presenta una alta incidencia de diversas especies de Coccinellidae por hectárea; en sorgo prevalece *H. convergens* (Reyes-Rosas y Loera-Gallardo, 2003); y en canola *H. convergens* y *C. maculata*. Es posible que éstos depredadores estén involucrados en la dispersión de las esporas dentro de los

cultivos al alimentarse de los insectos muertos (Roy *et al.* 2001). Quizá el factor que mas contribuye en la dispersión de las esporas es el viento (Wilding, 1970). Este factor se presentó constantemente con velocidades promedio de 20.34 y 24.36 km/h en 2005 y 2006 (Cuadro 2.2), respectivamente, con registros de velocidad mayor a 35 km/h en ambos años de ocurrencia de la epizootia, esto sugiere una rápida diseminación del inóculo en los cultivos de la zona, lo que permite a *P. neoaphidis* manifestarse simultáneamente en toda la zona norte de Tamaulipas, cuando las condiciones de humedad y temperatura se generan por los fenómenos climatológicos conocidos como “nortes”.

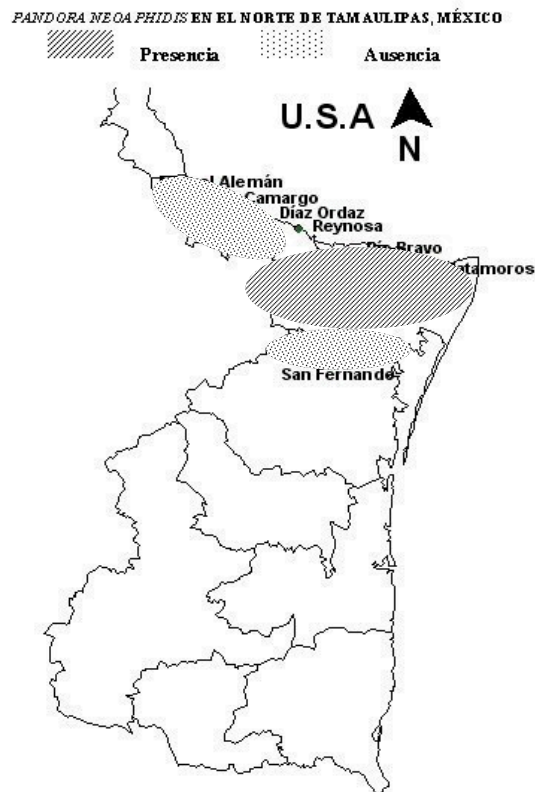
### **2.5.5 Implicaciones para el uso de *P. neoaphidis* en control de áfidos.**

En México, *P. neoaphidis* fue registrado con anterioridad por atacar *R. maidis* en el estado de Coahuila (Sánchez-Peña 2000). Para la zona agrícola de Tamaulipas, la información obtenida representa una base para la realización de estudios sobre control biológico de áfidos en diferentes cultivos, principalmente de alta rentabilidad como las hortalizas y cultivos en invernaderos. *P. neoaphidis* puede ser utilizado en el control biológico de áfidos, a través de favorecer el desarrollo de epizootias mediante la inoculación de *P. neoaphidis* como insecticida biológico (Shah *et al.*, 2000). Para el aprovechamiento de este entomopatógeno en el control de áfidos plaga de importancia agrícola en el país, se requiere de estudios de dispersión, persistencia, epizootiología, biología y hospederos en las diferentes zonas agroecológicas de México.

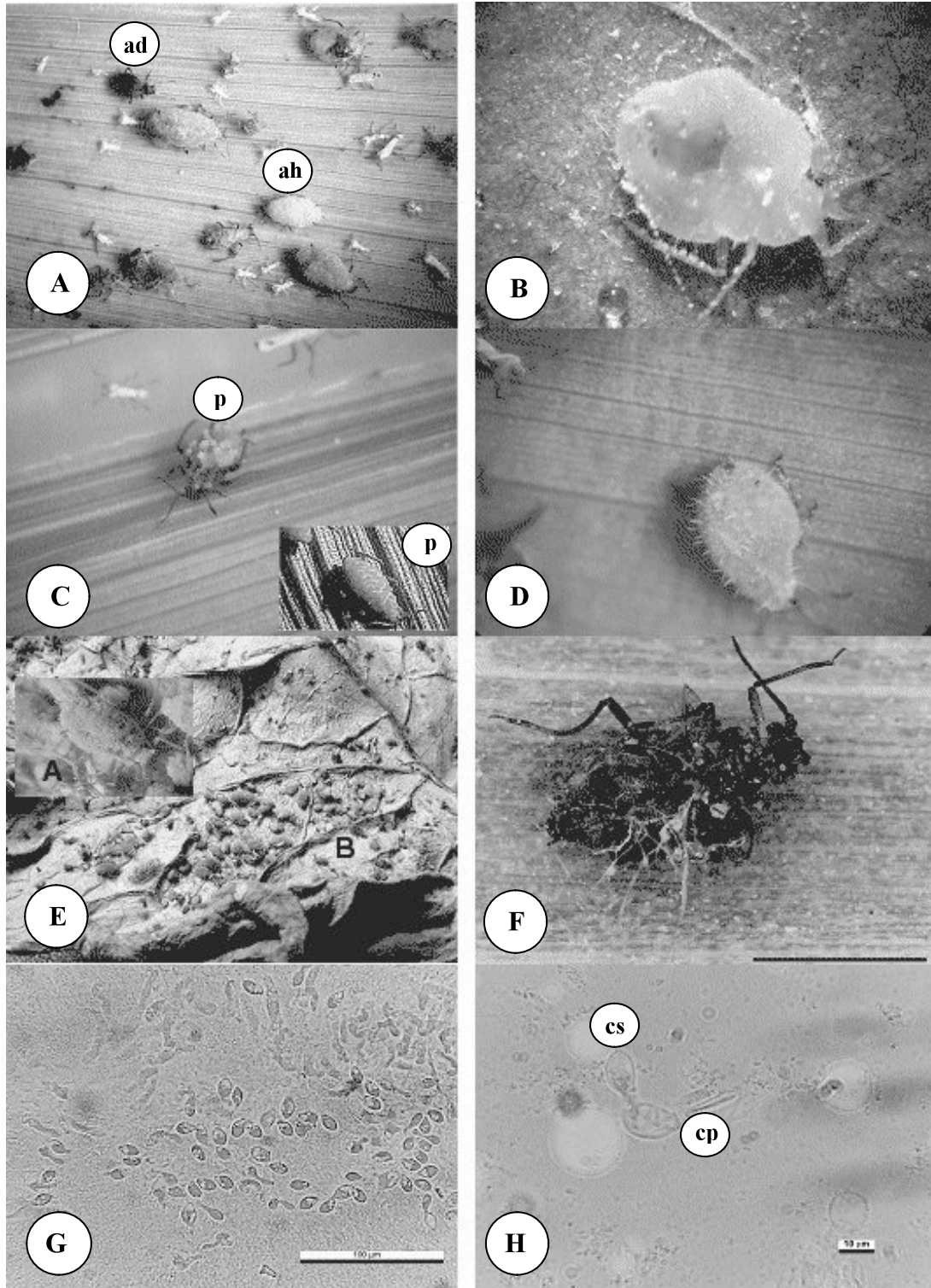
## **2.6 Conclusiones**

El agente causal responsable de las epizootias en los áfidos *B. brassicae*, *R. maidis* y *M. persicae*, de los cultivos de canola y sorgo del norte de Tamaulipas, México, fue el hongo entomopatógeno *P. neoaphidis*. Este hongo genera epizootias que pueden causar mortalidad superior al 50% en *R. maidis* y hasta un 90% en *B. brassicae*. Las condiciones propicias para el desarrollo de *P. neoaphidis* en la región se encuentran durante los meses de marzo y abril,

cuando se presentan períodos de temperatura entre 15 y 20° C, con HR superiores al 90% y existen infestaciones de áfidos en los cultivos.



**Figura 7.** Sitios de detección de *P. neoaphidis* parasitando los áfidos *B. brassicae* y *R. maidis*, en los cultivos de canola y sorgo en el norte de Tamaulipas.



**Figuras 8.** Áfidos atacados por *Pandora neoaphidis*. **A.** Hojas de *Sorghum bicolor* con *R. maidis* parasitados, áfido deshidratado (**ad**) y, áfido hidratado (**ah**). **B.** momia de *M. persicae*. **C.** Cutícula con tubérculos en *R. maidis*. **D.** Cistidios y conidioforos que atraviesan la cutícula en *R. maidis*. **E.** Hoja de *Brassica napus* con *B. brassicae* micosados. **F.** Rizoides en momia de *R. maidis*. **G.** *Conidia* de material *in vivo* de *P. neoaphidis*. **H.** Espora primaria (**cp**) y secundaria (**cs**) de *P. neoaphidis*.

## 2.7 Literatura citada

- Berlanga, P. A. M. 2001** Detección de hongos patógenos de áfidos en cítricos en Colima, México. pp: 168-173. *In:* Arredondo B. H. C, R. M. A Mellin, S. P. Pérez y S. J. P Martínez (eds.). Control biológico del pulgón café *Toxoptera citricida*, vector del virus de la tristeza de los cítricos. Dirección General de Sanidad Vegetal. SAGARPA. México, D.F.
- Butt, M. T., C. Jackson and N. Magan. 2001.** Introduction/ Fungal Biological Control Agents, Progress, Problems and Potential. 1-8 pp. *In:* T.M. Butt, C. Jackson and N. Magan (eds.). Fungi as Biocontrol Agents. CAB International.
- Byford, W. J. & G. J. Reeve. 1969.** *Entomophthora* species attacking aphids in England, 1962-1969. Transactions of the British Mycological Society 52: 342-346.
- Feng, M. G., C. Chen and B. Chen. 2004.** Wide dispersal of aphid- pathogenic Entomophthorales among aphids relies upon migratory alates. Environmental Microbiology 6: 510-516.
- Fuxa, J. R. and Y. Tanada. 1987.** Epidemiological Concepts applied to insect Epizootiology. pp. 3-21. *In:* Tanada, Y. and H. K. Kaya (eds.). Epizootiology of insect diseases. Wiley-Interscience Publications. N. Y.
- García, E. 1973.** Modificación al sistema de clasificación climática de Koppen. Para adaptarlo a las condiciones de la Republica Mexicana. 245 p.
- Hajek, A. E. 1997.** Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. Advances in Microbial Ecology 15: 193-249.
- Hajek, A. E. and J. St. Leger. 1994.** Interactions between fungal pathogens and insect host. Ann. Rev. Entomol. 39: 293-322.
- Hatting, L. H., R. A. Humber, T. J. Poprawski and R. M. Miller. 1999.** A survey fungal pathogens of aphids from South Africa, with special reference to cereal aphid. Biological Control. 16:1-12.
- Holman, J., R. Peña-Martínez y R. Bujanos-Muñoz. 1991.** Guía para la identificación y análisis de los pulgones alados (Homoptera: Aphididae) del Bajío México. Folia Entomológica Mexicana. 83:5-67.

- Hughes R., D. and M. A. Bryce. 1984.** Biological characterization of two biotypes of pea aphid, one susceptible and another resistant to fungal pathogens, coexisting on Lucerne Australia. *Entomol. Experimental. Applied.* 36 225-229.
- INEGI. 1982.** Carta estatal de climas del estado de Tamaulipas. Secretaría de Programación y Presupuesto. Dirección General de Geografía. México.
- Kalkar, Ö. 2005.** A SEM Study of The Sporulation Process of *Pandora neoaphidis* and *Neozygites fresenii*. *Turk J. Biol.* 29:137-147.
- Keller, S. 1993.** Working with arthropod-pathogenic Entomophthorales. Workshop held in Zurich. 9-10 september 1993. IOBC/WPRS. Bulletin 17: 287-299.
- Li, D.P. and D.G. Holdom . 1994.** Effects of pesticides on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *J. Invertebr. Pathol.* 63:209-211.
- Loera, G. J. y C. J. Vargas. 1982.** Principales plagas del sorgo en la región noreste de México. SARH-Centro de Investigaciones Agrícolas del Golfo Norte, Campo Experimental Río Bravo. Folleto Técnico. 17 p.
- Nielsen, C. J. and A. E. Hajek. 2005.** Control invasive Soybean, *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae), populations by Existing natural enemies in New York State, with emphasis on entomopathogenic fungi. *Environmental Entomology.* 34 (5): 1036-1047.
- Naya, A. 1984.** Meteorología superior. ESPASA-CALPE, S. A. Madrid. P152-154.
- Papierok, B. and A. E. Hajek. 1997.** Fungi: Entomophthorales. pp: 87-212. *In:* Lacey Lawrence A. (edit.). *Manual of Techniques in Insect Pathology.* Academic Press. New York.
- Pell, J. K., C. Tydeman and A. McCartney. 1998.** Impact of rainfall on the persistence and transmission of *Erynia neoaphidis*. *In;* *Insects Pathogens and insect parasitic nematodes.* IOBC Bulletin (21) 4:49-50.

- Reyes-Rosas, M. A. y J. Loera-Gallardo. 2003.** Colonización, establecimiento y migración de Coccinellidae en el cultivo de sorgo, en el norte de Tamaulipas. XXVI Congreso Nacional de Control Biológico. Memorias. Del 3-8 de noviembre, Guadalajara, Jal.
- Roy, H. E., J. K. Pell and P. G. Alderson. 2001.** Targeted dispersal of the aphid pathogenic fungus *Erynia neoaphidis* by the aphid predator *Coccinella septempunctata*. Biocontrol Science and Technology. 11 (1) 99-11
- Sánchez-Peña, S. 2000.** Entomopathogens from two Chihuahuan desert localities in México. Bio Control 45(1):63-78.
- Shah, P. A., M. Abei and U. Tuor. 2000.** Impact of *Macrosihum euphorbia* with micelial preparations of *Erynia neoaphidis* in greenhouse trial. Mycol. Res. 104 (6) 645-652).
- Shah, P. A. and J. K. Pell. 2003.** Entomopathogenic fungi as biological control agents. Applied Microbiology and Biotechnology 61: 413-423.
- Siap-SAGARPA. 2007.** <http://www.siap.gob.mx>) Información verificada 26 noviembre de 2007.
- Wilding, N. 1970.** *Entomophthora* conidia in the air-spora. Journal of General Microbiology. 62:126-130.
- White A, A. D. Watt, R. S. Hails and S. E Hartley. 2000.** Patterns of spread in insect-pathogen systems: the importance of pathogen dispersal. Oikos 89: 137-145.

## CAPITULO 3

### **Efecto de la temperatura en el crecimiento radial, esporulación y germinación *in vitro* de siete aislamientos nativos de *Pandora neoaphidis* (Remaudière y Hennebert) Humber.**

#### **3.1 Resumen**

Se evaluó el efecto de la temperatura en el crecimiento, esporulación, morfología y germinación de las esporas de aislamientos de *Pandora neoaphidis*, así como la producción de *conidia* de diferente generación a partir de una primaria. Los resultados indican que existe una influencia de la temperatura en estos procesos biológicos. La temperatura óptima para el desarrollo de *P. neoaphidis* se ubicó alrededor de los 20 °C, con un lento crecimiento a 10 °C e inhibición a 30 °C. La mejor producción de *conidia* y el mayor porcentaje de germinación ocurrió entre los 15 y 20 °C. La temperatura no alteró la morfología básica de las *conidia* primaria producidas *in vitro*, lo que les permite mantener su grado de dispersión a través de las corrientes de aire. Los patrones de comportamiento del crecimiento del micelio fueron uniformes y se explicaron mediante el modelo Logístico, en contraste con la producción de *conidia*, donde se requirió del complemento entre el modelo antes mencionado y el de Weibull. El presente estudio aporta nueva información sobre la biología básica de *P. neoaphidis* la cual incluye la producción de al menos cinco generaciones de *conidia* a partir de una primaria y que la germinación formada en los extremos de las *conidia* genera un tubo germinativo, constituido de células alargadas y septos, que incrementan su longitud hasta 280  $\mu$ m, este factor favorece la localización de sitios de penetración en el huésped. Adicionalmente, se establece que la germinación en las partes laterales de la *conidia*, da como resultado la formación de una *conidia* de posterior generación.

#### **3.2 Introducción**

Los Entomophthorales pueden ser un factor importante en la regulación de la población de insectos plaga al inducir epizootias (Wilding *et al.*, 1986;



Steinkraus y Hollingsworth, 1994). Los factores que más influyen en el desarrollo de los hongos sobre un insecto hospedero son la temperatura y humedad relativa. La temperatura influye en el desarrollo y la intensidad de la enfermedad (Fuxa y Tanada, 1987; Inglis *et al.*, 2001). Adicionalmente, la temperatura y la humedad micro-ambiental tienen efecto en la persistencia, dispersión, y sobrevivencia de los hongos. Así, la máxima esporulación se observa en condiciones de humedad relativa del 90% que favorecen la incidencia de epizootias (Romaña y Fargues, 1987).

La temperatura óptima para la sobrevivencia y desarrollo de los hongos entomopatógenos varía entre los diferentes taxa, por ejemplo las esporas de los entomoftorales parecen ser más sensibles que los conidios de los ascomicetos anamórficos. En *Metarhizium anisoplae* y *Beauveria bassiana* (Fungi: Clavicipitaceae), la temperatura óptima de esporulación se encuentra entre los 20 y 32 °C, reduciéndose substancialmente a 15 y 40 °C (James *et al.* 1998; Arthurs y Thomas, 2001). En Los Entomophthorales, como *Entomophaga maimaiga* Humber, *Zoophtora radicans* (Brefeld) y *P. neoaphidis*, los rangos están ubicados en temperaturas más bajas, 18 °C y 25 °C, y pueden desarrollarse desde 0 °C hasta 36 °C (Hajek *et al.*, 1990; Dara y Semnter, 1998; Pell, *et al.*, 2001). Steinkraus y Slaymaker (1994) en estudios con *Neozygites fresenii* encontró que la humedad afecta la rehidratación del hospedero y subsiguiente descarga de *conidia*. A 35 y 85% de humedad relativa, los áfidos infectados por el hongo no producen *conidia*.

*P. neoaphidis* (Zygomycetes: Entomophthorales), es un patógeno con distribución mundial asociado específicamente a áfidos (Homóptera: Aphididae), y puede ser un factor de regulación de poblaciones plaga de áfidos (Glare y Milner 1991; Shah, *et al.*, 2004). Existen en la literatura diversos estudios sobre la biología y producción masiva de este entomopatógeno como posible estrategia de control en programas de manejo integrado de áfidos (McLeod, *et al.*, 1998; Hatting *et al.*, 1999; Pell, *et al.*, 2001; Ekesi *et al.*, 2005; Kalkar, 2005).

En México, los reportes sobre la asociación natural con áfidos e información sobre biología y requerimientos ambientales de este hongo causante de epizootias son escasos.

En la presente investigación se estudiaron siete aislamientos nativos de México, estudios mediante los que se pretende determinar los requerimientos de temperatura para el desarrollo, esporulación y germinación de estos aislamientos en condiciones controladas, bajo las siguientes hipótesis:

La temperatura óptima para el desarrollo, esporulación y germinación de *P. neoaphidis* se ubica entre los 15 y 20°C.

La temperatura afecta la morfología de las esporas.

Existe variación en el crecimiento y esporulación entre aislamientos.

Las *conidia* primaria de *P. neoaphidis* pueden producir al menos dos generaciones mas de *conidia*

### **3.3 Materiales y métodos**

#### **3.3.1 Cultivo de *P. neoaphidis***

Se obtuvieron colonias *in vitro* de *P. neoaphidis*, cinco aisladas del pulgón del cogollo *Rhopalosiphum maidis* (RBA; RBB, RBF, RBG y RBH), colectados en Rio Bravo Tamaulipas, y dos más del Estado de México, aislados de *R. padii* en maíz *Zea mais* (TEXRP1) y *Myzus persicae* en brócoli *Brassica oleracea* (TEXMP1). El aislamiento se realizó siguiendo la técnica de Keller (1993), que consiste en pasar a los áfidos micosados por 10 segundos en etanol al 70%, posteriormente dos minutos en hipoclorito de sodio al 3%, seguidos por dos lavados en agua destilada estéril por un período de dos minutos cada uno. Los insectos fueron colocados en papel filtro estéril para quitar el exceso de humedad y posteriormente colocarlos en el medio de cultivo y obtener esporas libres de contaminantes. Para el crecimiento del hongo, se emplearon cajas Petri de 90 mm de diámetro con 20 ml de Sabouraud, suplementado con yema de huevo y leche (SEMA) (Papierok y Hajek, 1997). Los cultivos fueron incubados en una cámara bioclimática Lab-Line® a 20 °C± 1, en oscuridad. Después de tres semanas de inoculados fueron usados en los experimentos.

Los aislamientos se mantienen en la colección de entomopatógenos del Laboratorio de Patología de Insectos del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados.

### **3.3.2. Características culturales**

Las características de crecimiento *in vitro* de cada aislamiento se registró a 20 °C ±1, debido a que ésta temperatura permite la mejor expresión del desarrollo del micelio en medio de cultivo SEMA. Los parámetros fueron color, textura, forma de la colonia y apariencia de la misma.

### **3.3.3 Efecto de temperatura en crecimiento radial**

El experimento se llevó a cabo tomando como unidad experimental una caja Petri (90 mm diámetro) con 20 mL de medio de cultivo SEMA. De las colonias desarrollados por tres semanas se cortaron círculos (7 mm de diámetro) usando un sacabocado del borde de crecimiento de la colonia, y fueron transferidos individualmente al centro de una cada Petri (90 mm diámetro) con 20 mL del medio de cultivo SEMA. Cada disco fue colocado con el desarrollo del hongo hacia arriba para permitir la libre descarga de esporas. Las cajas Petri se colocaron en cajas de plástico con tapa, con capacidad de 8L. En cada caja se colocaron dos frascos de 100 mL con agua destilada para proveer humedad relativa adecuada (100%HR) y evitar la desecación del medio de cultivo. Se evaluaron cinco temperaturas: 10, 15, 20, 25 y 30 °C. Las temperaturas y humedades se monitorearon mediante un Datta Logger HOBO®. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento por temperatura. La temperatura se proporcionó mediante una cámara bioclimática Lab-Line®.

Tomando en consideración la peculiar manera de dispersión de los conidios de los hongos entomoftorales como criterio de estandarización y para evaluar el crecimiento radial, se tomo la línea final donde cayeron las esporas como el máximo crecimiento observado en cada fecha de evaluación. Una vez definida el área, ésta se delinee sobre la tapa de la caja Petri mediante un marcador indeleble de punto fino, colocando a un costado de la línea la fecha

de la toma del dato. El tamaño de la colonia fue medido en  $\text{cm}^2$  cada 72 horas.

La estimación del área de crecimiento, se realizó mediante la toma de fotografías digitales por unidad experimental, analizadas con el programa Image Tool, versión 1.27. La evaluación en todas las temperaturas, concluyó cuando el crecimiento del primer aislamiento en cualquiera de las temperaturas alcanzó el borde de la caja Petri. El incremento del crecimiento radial de los diferentes aislamientos en las temperaturas evaluadas, se comparó mediante la prueba de medias Tukey ( $P \leq 0.05$ ) con un arreglo dos factorial, temperatura-aislamiento ( $5 \times 7$ ), en un diseño completamente al azar

La proporción de crecimiento por muestreo fue calculada como  $X - 0.385$   $\text{cm}^2/\text{días}$ , donde  $X$  = área calculada por muestreo en  $\text{cm}^2$ , y  $0.385$  = diámetro del disco del hongo inoculado originalmente. Los experimentos se analizaron mediante el paquete estadístico SAS para Windows versión 6.12.

### **3.3.3.1 Temperatura óptima para el crecimiento radial de *P. neoaphidis***

Para el establecimiento de este punto (temperatura óptima de desarrollo) se utilizó el método de superficie de respuesta (MSR) (Montgomery, 2003), que consistió en el análisis del área de crecimiento en  $\text{cm}^2$  obtenida en todas las temperaturas de cada aislamiento.

### **3.3.4 Efecto de la temperatura en la esporulación**

Antes de empezar el experimento, discos (7 mm de diámetro) del hongo procedente de la periferia de cultivos en SEMA (Shah *et al.*, 2004) con tres semanas de incubación, fueron colocados en papel filtro húmedo y mantenidos por 18 horas a  $20^\circ\text{C}$  y 100% de humedad relativa en oscuridad total. Los discos en forma individual se colocaron en la parte central de la cara interna de la tapa de una caja Petri de 90 mm diámetro. En la base de la caja se colocó un portaobjeto sobre papel filtro humedecido con agua destilada estéril, para mantener una humedad relativa alta y favorecer la esporulación.

Las temperaturas evaluadas fueron las mismas utilizadas para el crecimiento radial. Los portaobjetos se cambiaron cada 24 horas, y las esporas

fueron teñidas con lactofenol azul de algodón (1%). El cambio de portaobjetos se siguió hasta que la última muestra dejó de esporular en cada temperatura. El número de *conidia* por portaobjeto fue determinada, se tomaron cinco puntos de muestreo equidistantes de un mm<sup>2</sup> del centro hacia la periferia, a partir del centro del círculo de esporulación. El promedio de las cinco muestras se multiplicó por el factor 484, equivalente al total de mm<sup>2</sup> en el área del cubreobjetos donde se realizó la descarga de esporas. Las observaciones se realizaron con un microscopio Karl Zeiss óptico, con el objetivo 10X. Se realizaron cuatro repeticiones por temperatura, por cada aislamiento. El total de esporas producidas por disco se registró diariamente.

Para determinar el aislamiento con mayor producción de *conidia* en función de la temperatura, se utilizó la prueba de medias Tukey ( $P \leq 0.05$ ) con un arreglo factorial 5 x 7 x 14 (temperatura-aislamiento-días de producción), bajo un diseño completamente al azar.

#### **3.3.4.1 Efecto de la temperatura en la morfología de esporas**

En la estimación de las medidas de las *conidia* de cada aislamiento, se tomaron imágenes de cada preparación con la metodología citada anteriormente. Se analizaron 30 *conidia* de cada aislamiento por cada temperatura y los parámetros a evaluar fueron: largo, ancho y Cociente largo-ancho (CLA) (Hemmati *et al.*, 2002), así como las posibles alteraciones morfológicas. Para determinar el efecto de la temperatura entre un aislamiento, los datos se analizaron mediante un arreglo factorial 4x3 (temperatura-talla), bajo un diseño completamente al azar. El análisis de datos se realizó mediante los programas descritos anteriormente.

#### **3.3.5 Ajuste del crecimiento radial y esporulación de *P. neoaphidis* a un modelo de crecimiento.**

Para el establecimiento de modelos de desarrollo, se utilizó el crecimiento y esporulación acumulada de los diferentes aislamientos a 10, 15, 20 y 25 °C y

se analizó mediante el programa CurveExpert 1.3. Se determinó el modelo al cual se ajustaron mejor los datos de desarrollo radial.

### **3.3.6 Germinación de esporas primarias**

Para la colecta de esporas primarias, se utilizaron rodajas de 0.7 cm de diámetro con micelio de *P. neoaphidis*, estos se mantuvieron en una cámara húmeda a  $20\pm 1$  °C y  $96\%\pm 1$  HR en oscuridad. Los discos hidratados se colocaron en la parte central de un portaobjetos, el cual se colocó invertido sobre otro portaobjetos que contenía una película de medio de cultivo SEMA. Los portaobjetos (cuatro por repetición) se colocaron en cajas Petri (10 cm diámetro) con un papel filtro humedecido en la base, y fueron separados por una distancia de cinco mm, mediante rollos de papel aluminio. Se indujo la esporulación por un período de una hora.

Al término del período de esporulación, se retiró la rodaja de inóculo de cada aislamiento y se evaluó el porcentaje de germinación en la película de esporas, a las cuatro, ocho y 24 horas. La germinación se evaluó con la ayuda de un microscopio óptico Carls Zeis con el objetivo de 10X. Se consideró como espora germinada, cuando el tubo germinativo sobrepasó los dos tercios de la longitud de la espora, o cuando existieron indicios de la formación de una *conidia* secundaria. El número total de *conidia* y la proporción de *conidia* germinadas en cada temperatura fue evaluada mediante un arreglo tres factorial ( $7\times 5\times 4$ ). (aislamiento-temperatura-tiempo), bajo un diseño completamente al azar

### **3.3.7. Formación de *conidia*, “n” generación a partir de *conidia* primarias**

Debido a que se carece de información sobre el número de generaciones que se pueden originar a partir de una *conidia* primaria, se llevó a cabo un experimento, para determinar el número de *conidia* generadas *in vitro*. Para la obtención de esporas primarias, se colocaron rodajas de SEMA de 0.7 cm de diámetro con micelio de *P. neoaphidis* de 21 días en la parte central de un portaobjetos. Este dispositivo se invirtió sobre un portaobjetos limpio, separado

a una distancia de 5 mm por medio de papel aluminio enrollado. La incubación se realizó por 24 horas a  $20 \pm 1$  °C en oscuridad total, en cajas Petri de 15 cm de diámetro, con papel filtro humedecido en la base (HR 96%  $\pm 1$ ). Para la obtención de las esporas secundarias se colocó el porta objetos con esporas primarias invertido sobre un porta objetos limpio y se realizó el mismo proceso que el utilizado para la obtención de *conidia* primaria. Este proceso se realizó hasta la obtención de la última generación de *conidia*.

Se realizaron siete juegos de portaobjetos con inóculo primario para la obtención de descargas de esporas. De los siete dispositivos iniciales con esporas primarias, uno se utilizó para la preparación de laminillas con la generación producida y los restantes para la obtención de la siguiente generación de esporas. Las preparaciones se tiñeron con azul algodón lactofenol (1%) y sellada en sus márgenes con esmalte de uñas.

La morfología y medición de *conidia* producidas en las diferentes generaciones se realizó con un sistema de imágenes digitales con apoyo del Software Image Tool, versión 1.27. La toma de imágenes se realizó con un Fotomicroscopio III Carls Zeis y una cámara digital Pixera Professional®. Se describieron características morfológicas predominantes de cada generación de *conidia*, se utilizaron (n=50) para estimar su longitud y ancho. Para definir las variaciones en morfología de las *conidia* de cada generación, se obtuvo el cociente entre largo y ancho (CLA). Las *conidia* se dividieron en cuatro categorías arbitrarias: I) Circular, de 0.95 a 1.1 CLA; II) semicircular, de 1.11 CLA a 1.3; III) Oval, de 1.31 a 1.75 CLA y IV) alargada, de 1.76 CLA en adelante. Valores próximos a uno indican una espora redonda, los cercanos a dos denotan una estructura alargada. El análisis de resultados, incluyó un análisis de varianza, con comparación de medias Tukey ( $P \leq 0.05$ ), en un diseño completamente al azar.

### 3.4 Resultados

#### 3.4.1 Características de la colonia.

En general la coloración de las colonias de los distintos aislamientos oscilo entre blanco y crema, con aspecto aterciopelado con reticulación de ligera a nula. Las diferencias más sobresalientes se observaron en el comportamiento del crecimiento de la periferia, donde los aislamientos del Estado de México desarrollaron colonias con crecimiento uniformemente circular y de características “polvosas”, a diferencia de las de Tamaulipas, que fueron irregulares en este aspecto y de estructura compacta (Figura 17).

Las características culturales sobresalientes de las colonias de cada uno de los aislamientos se resumen en el Cuadro 3.1 (Figura 17).

**Cuadro 3.1.** Características culturales de los diferentes aislamientos de *P. neoaphidis*

Aislamiento	Color de la colonia	Textura	Forma de crecimiento
RBA	Blanco a cremoso	Ligeramente reticulada	Ligeramente denso e irregular en la periferia.
RBB	Blanco a cremoso	Sin reticulación	Crecimiento denso e irregular en la periferia.
RBF	Cremosa	Ligeramente reticulada	Ligeramente denso e irregular en la periferia
RBG	Blanco a cremoso	Sin reticulación	Ligeramente denso e irregular en la periferia.
RBH	Blanco a cremosa	Reticulación ligera a muy marcada	Ligeramente denso y relativamente regular
TEXMP1	Blanca	Consistencia polvosa	Crecimiento uniforme en su periferia, con granulaciones aisladas en la periferia
TEXRP1	Blanca	Consistencia polvosa	Crecimiento uniforme en su periferia, con granulaciones aisladas en la periferia

#### 3.4.2 Desarrollo de *P. neoaphidis*

##### 3.4.2.1 Crecimiento radial a diferentes temperaturas.

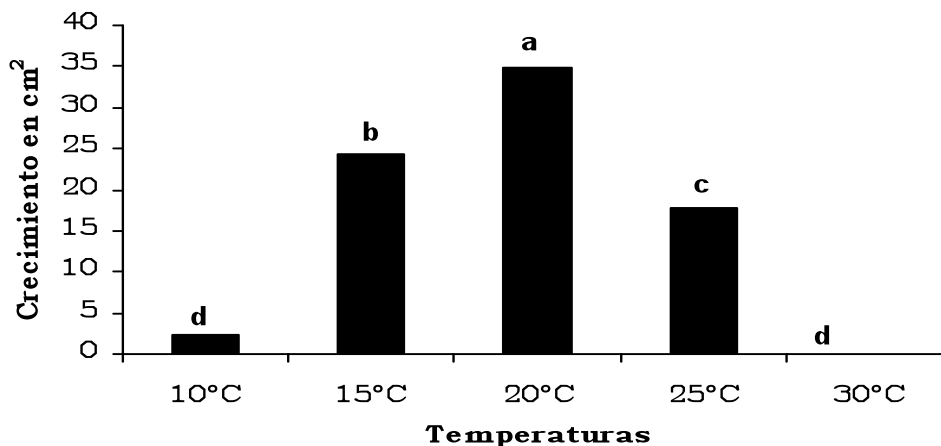
Se encontraron diferencias estadísticas entre temperaturas, aislamiento y combinación aislamiento-temperatura (Figura 9 y 10, Cuadros 3.2-3.3). En general el desarrollo de *P. neoaphidis* fue lento y presentó diferencias estadísticas al comparar el área de crecimiento a las distintas temperaturas



( $F=619.61$ ,  $gl_1=14$ ,  $gl_2=105$ ,  $P \geq 0.0001$ ). La temperatura donde se observó el mayor desarrollo fue a  $20\text{ }^\circ\text{C}$ , seguida por la de  $15\text{ }^\circ\text{C}$ . A  $30\text{ }^\circ\text{C}$  se inhibió el desarrollo micelial en todos los aislamientos (Figura 9, Cuadro 3.3). El aislamiento RBB fue el que presentó el crecimiento más abundante, mientras que el aislamiento RBH fue el menor en este aspecto ( $F=20.85$ ,  $gl_1=6$ ,  $gl_2=105$ ,  $P \geq 0.0001$ ) (Cuadro A-1, Figura 10)

**Desarrollo de *P. neoaphidis* a  $10\text{ }^\circ\text{C}$ :** Todos los aislamientos presentaron un pobre crecimiento a esta temperatura, limitado a  $\leq 4.5\text{ cm}^2$ . Los mejores aislamientos a esta temperatura fueron RBB y RBG, mientras que los más pobres fueron RBH Y TEXMP1 ( $P \leq 0.05$ ) (Figura 11A).

**Desarrollo de *P. neoaphidis* a  $15\text{ }^\circ\text{C}$ :** La mayoría de los aislamientos presentaron un crecimiento superior a los  $20\text{ cm}^2$ . El aislamiento RBB presentó el mejor desarrollo, mientras que el crecimiento más reducido fue para RBH ( $P \leq 0.05$ ), cuyo límite de crecimiento fue en promedio  $14\text{ cm}^2$  (Cuadro A-1, Figura 11B).

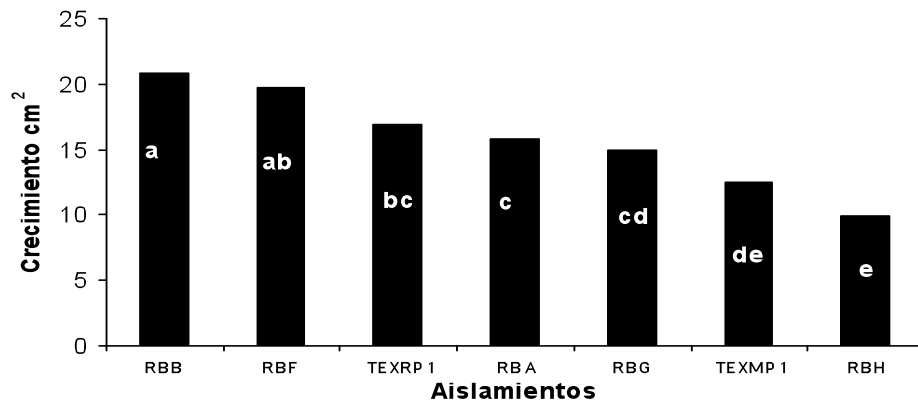


**Figura 9.** Crecimiento radial de micelio de todos los aislamientos de *P. neoaphidis* a diferentes temperaturas Tukey ( $P \leq 0.05$ ),  $DMS=2.37$ . Letras iguales no representan diferencias estadísticas

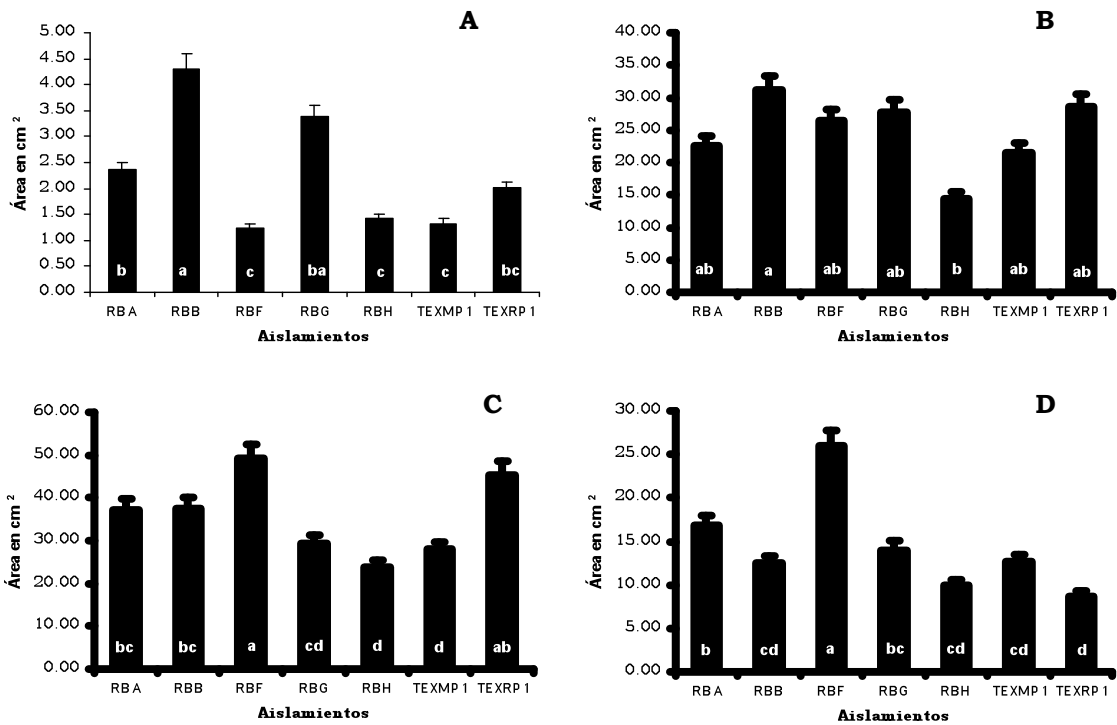
**Desarrollo de *P. neoaphidis* a  $20\text{ }^\circ\text{C}$ :** El desarrollo más sobresaliente de todos los aislamientos se registró a esta temperatura (Figura 3.3, Cuadro A-1 y A-2). Los aislamientos RBF ( $49.18\text{ cm}^2$ ), TEXRP1 ( $45.22\text{ cm}^2$ ) RBB ( $37.57$ ) y RBA ( $37.30$ ) alcanzaron el máximo desarrollo y fueron estadísticamente distintos a

los otros aislamientos (Cuadro A-2). Nuevamente el aislamiento RBH presentó el menor crecimiento ( $P \leq 0.05$ ) (Cuadro A-1 y A-2, Figura 11C).

**Desarrollo de *P. neoaphidis* a 25 °C:** El aislamiento RBF presentó el crecimiento más abundante, en contraste con TEXMP1 y RBH, que fueron los de menor desarrollo ( $P \leq 0.05$ ) (Cuadro A-1, Figura 11D).



**Figura 10.** Crecimiento radial promedio de 10 a 30°C de cada aislamiento de *P. neoaphidis* Tukey ( $P \leq 0.05$ ) DMS= 3.04. Letras iguales no representan diferencias estadísticas



**Figura 11.** Crecimiento radial de diferentes aislamientos de *P. neoaphidis* a diferentes temperaturas: A =10 °C, B.=15 °C, C= 20 °C, D.=25 °C. Barras con la misma letra en cada temperatura, no representan diferencias estadísticas.

Las mejores combinaciones entre temperatura y aislamiento que indujeron mayor crecimiento radial fueron RBF, TEXRP1 y RBB a 20 °C ( $F=83.29$ ,  $g_{1}=34$ ,  $g_{2}=105$ ,  $P>=0.0001$ ), y las menores para todos los aislamientos fueron 10 °C y 30 °C (Cuadro A-2).

### 3.4.3 Temperatura óptima de desarrollo

La temperatura en donde se logró el óptimo desarrollo micelial de los diferentes aislamientos de *P. neoaphidis* osciló entre los 19 y 20 °C (Cuadro 3.2).

**Cuadro 3.2.** Temperatura óptima (°C) de desarrollo radial de los diferentes aislamientos de *P. neoaphidis*

Aislamiento	RBA	RBB	RBF	RBG	RBH	TEXMP1	TEXRP1
Temperatura	19.66	19.13	19.97	19.13	19.67	19.48	19.32

### 3.4.4. Producción de esporas de *P. neoaphidis* a diferentes temperaturas

Todas las temperaturas influyeron en los tiempos y producción de *conidia* y fueron estadísticamente distintas entre si (Cuadro 3.3).

**Cuadro 3.3.** Producción de esporas de *P. neoaphidis* en diferente temperatura

Temperatura	Esporulación media ±DE	Tiempo de producción (días)
10 °C	248472 ±85995 <b>a</b>	12
15 °C	221520 ±87095 <b>b</b>	6.5
20 °C	171460 ±67246 <b>c</b>	5
25 °C	144204 ±45021 <b>d</b>	7.0
30 °C	0 ± 0 <b>e</b>	--

Medias con la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Tukey  $P\leq 0.05$ ).

La esporulación disminuyó a medida que la temperatura aumento (Cuadro 3.3) ( $F=269.52$ ,  $g_{1}=3$ ,  $g_{2}=686$ ,  $P>=0.0001$ ). A 10 °C se produjo la mayor producción de *conidia* y la menor a 25 °C ( $P\leq 0.05$ ). A 30°C el proceso de

producción de *conidia* se inhibió (Cuadro3.3). La temperatura influyó en el tiempo de esporulación, a 20 °C, el período de producción de *conidia* fue de cinco días, mientras que a 10 °C se extendió hasta 14 (F=369.24,  $gl_1=13$ ,  $gl_2=686$ ,  $P>=0.0001$ ). Entre aislamientos, TEXRP1 produjo la mayor cantidad de

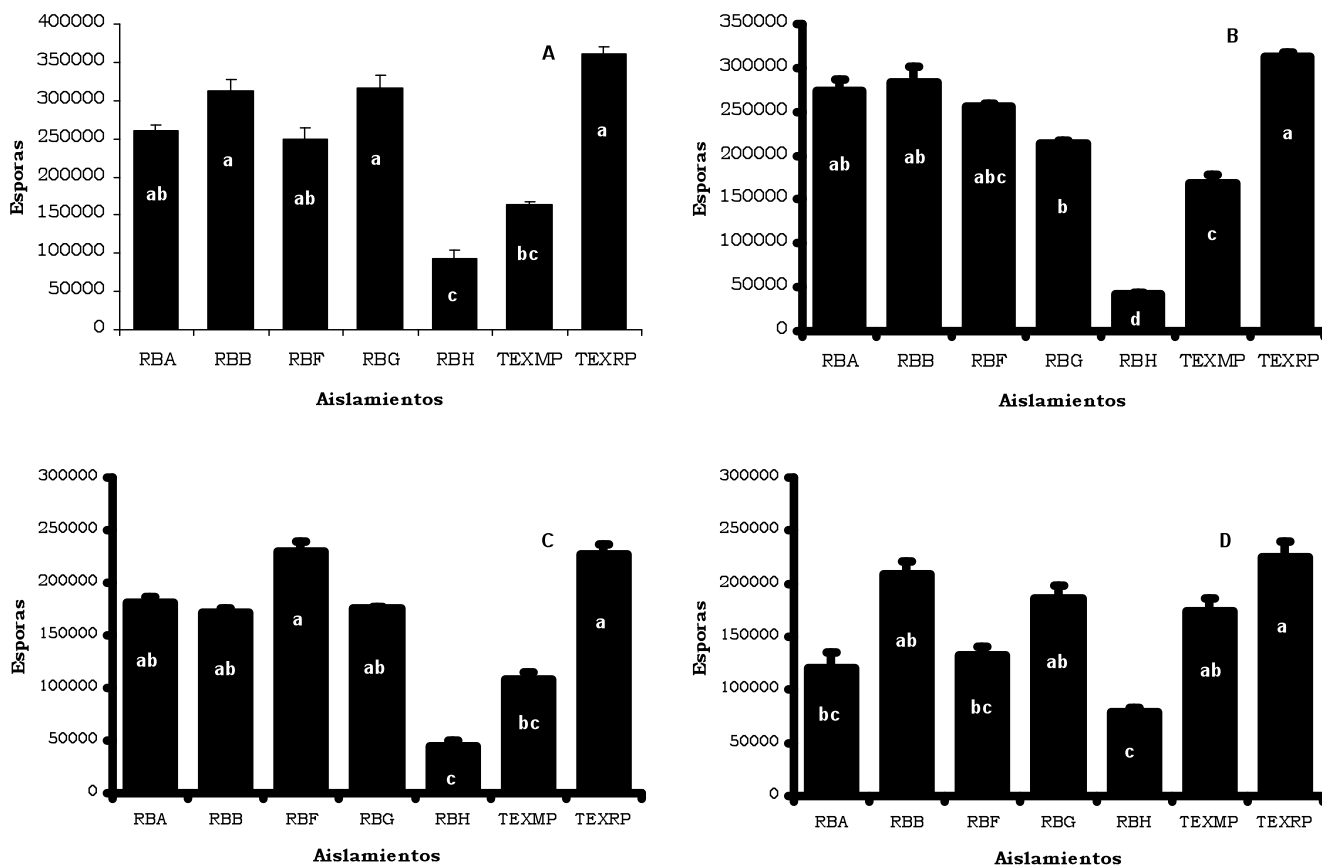


Figura 12. Producción de *conidia* de los diferentes aislamientos de *P. neoaphidis* a distintas temperaturas Tukey ( $P \leq 0.05$ ). A= 10°C, B=15 °C, C= 20°C y D= 25 °C. Barras con la misma letra no representan diferencias estadísticas

esporas en todas las temperaturas, mientras que RBH presentó la menor esporulación (F=205.66,  $gl_1=6$ ,  $gl_2=686$ ,  $P>=0.0001$ ) (Cuadro 3.4, Figura 12).

**Cuadro 3.4.** Producción de *conidia* de *P. neoaphidis* a diferentes temperaturas

Promedio de <i>conidia</i> ± DE							
Temp	RBA	RBB	RBF	RBG	RBH	TEXMP1	TEXRP1
10°	261360±68466	313148±79374	249066±42227	315955±68870	92928±11658	163011±46366	360870±58776
15°	273750±59136	284204±48488	255842±44670	213347±56810	42204±7531	168722±43853	312857±53823
20°	181596±60126	171142±34792	230384±50119	175788±47630	34140±5865	107641±22482	226899±51589
25°	121193±28462	209088±55235	133196±32150	185759±31860	78988±19754	174240±44507	224963±40760

El aislamiento que produjo la mayor esporulación fue TEXRP1 a 10 °C ( $P \leq 0.05$ ) y el que produjo la menor cantidad de esporas fue RBH en todas las temperaturas (Cuadro 3.4, Figura 12).

### 3.4.5 Efecto de la temperatura en el tamaño y morfología de las *conidia*.

El efecto de las temperaturas en el largo, ancho y el CLA de las *conidia*, influyó de distinta manera entre aislamientos (Cuadro A-3).

**Longitud de la *conidia*:** A 10 °C y 15 °C se produjeron las *conidia* más largas en la mayoría de los aislamientos y las más cortas a 20 y 25 °C. Los aislamientos RBA y RBH no presentaron diferencias estadísticas ( $P \leq 0.05$ ). El resto de los aislamientos, al menos, presentaron diferencias en la longitud en alguna de las temperaturas evaluadas (Cuadro A-3). En general la longitud decreció a medida que la temperatura se incremento.

**Ancho:** La medida de anchura fue más homogénea que la longitud, con la constante de presentar las medidas mayores a 10 °C y las menores a 20 °C. Cuatro de los aislamientos no presentaron diferencias estadísticas en la anchura a las diferentes temperaturas. En forma similar a longitud, el ancho decreció a medida que la temperatura se incremento (Cuadro A-3).

**CLA:** La temperatura no influyó en la forma de la *conidia* primaria. Las proporciones se mantuvieron constantes en todos los aislamientos a todas las temperaturas ( $P \leq 0.05$ ) (Cuadro A-3).

A pesar de que se presentaron diferencias estadísticas en las medidas de longitud y anchura, todos los aislamientos no presentaron diferencia estadísticas en su morfología (CLA) ( $P \leq 0.05$ ).

### 3.4.6 Modelos de desarrollo de crecimiento radial y esporulación

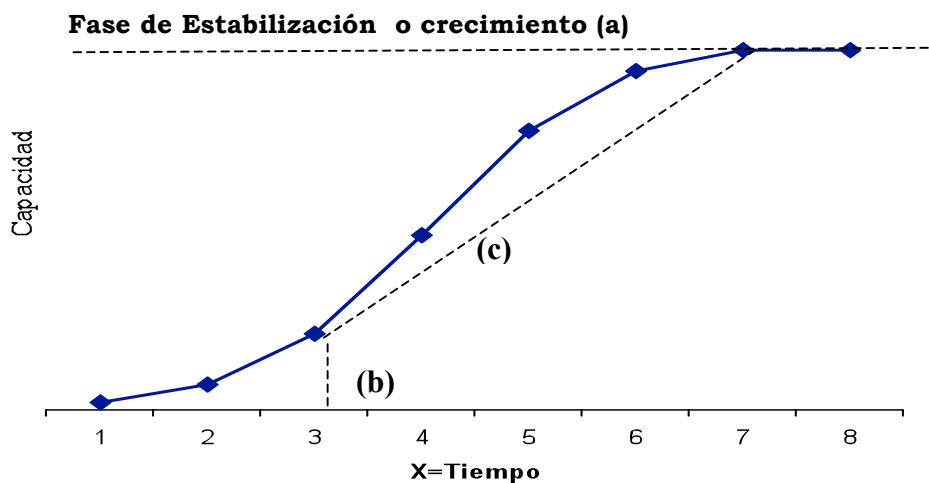
#### 3.4.6.1 Crecimiento radial

El modelo que mejor representó el desarrollo acumulado de *P. neoaphidis* en la mayoría de los aislamientos en todas las temperaturas fue el Modelo Logístico (Y), con una  $R^2$  entre 0.90 y 0.98 (Cuadro 3.5, Figura 13 y A-5).

$$Y = \frac{a}{1 + be^{-cx}}$$

Donde:

a= Valor asintótico de crecimiento máximo de micelio *in vitro*, b= Constante de ajuste de la forma de la curva, c= Tasa de cambio y x= tiempo



**Figura 13.** Modelo Logístico en el desarrollo de *P. neoaphidis*.

**Cuadro 3.5.** Estimadores de la curva del Modelo Logístico en el desarrollo micelial de *P. neoaphidis* a diferentes temperaturas

Aislamiento	Parámetros	10°C	R <sup>2</sup>	15°C	R <sup>2</sup>	20°C	R <sup>2</sup>	25°C	R <sup>2</sup>
RBA	a		0.94	22.80	0.98	46.88	0.98	18.77	0.98
	b			32.23		32.47		24.96	
	c			0.35		0.26		0.28	
RBB	a	4.69	0.94	42.08	0.98	41.69	0.94	13.07	0.96
	b	7.50		23.68		24.46		8.52	
	c	0.25		0.23		0.27		0.22	
RBF	a	1.18	0.86	22.88	0.96	65.04	0.98	27.63	0.98
	b	4.05		24.58		27.04		25.25	
	c	0.31		0.36		0.24		0.30	
RBG	a	27.63	0.92	29.80	0.98	36.60	0.98	14.73	0.98
	b	25.25		21.09		26.24		45.49	
	c	0.30		0.29		0.25		0.41	
RBH	a		0.78	14.25	0.94	24.83	0.98	14.11	0.96
	b			14.50		18.98		23.27	
	c			0.31		0.29		0.22	
TEXMP1	a	1.22	0.92	27.40	0.96	35.60	0.96	20.96	0.94
	b	266.84		18.58		16.82		16.26	
	c	2.45		0.22		0.22		0.17	
TEXRP1	a		0.87	30.21	0.98	77.32	0.98	12.70	0.98
	b			24.43		36.86		78.68	
	c			0.32		0.22		0.30	

### 3.4.6.2 Modelo de producción de *conidia* primaria

En la mayoría de los aislamientos la producción de *conidia* se ajustó al Modelo de Weibull y en menor proporción al Logístico, con un coeficiente de correlación de Pearson de 0.98 (Cuadro 3.6).

$$\text{Weibull} = a - b^{-cx^d}$$

Donde:

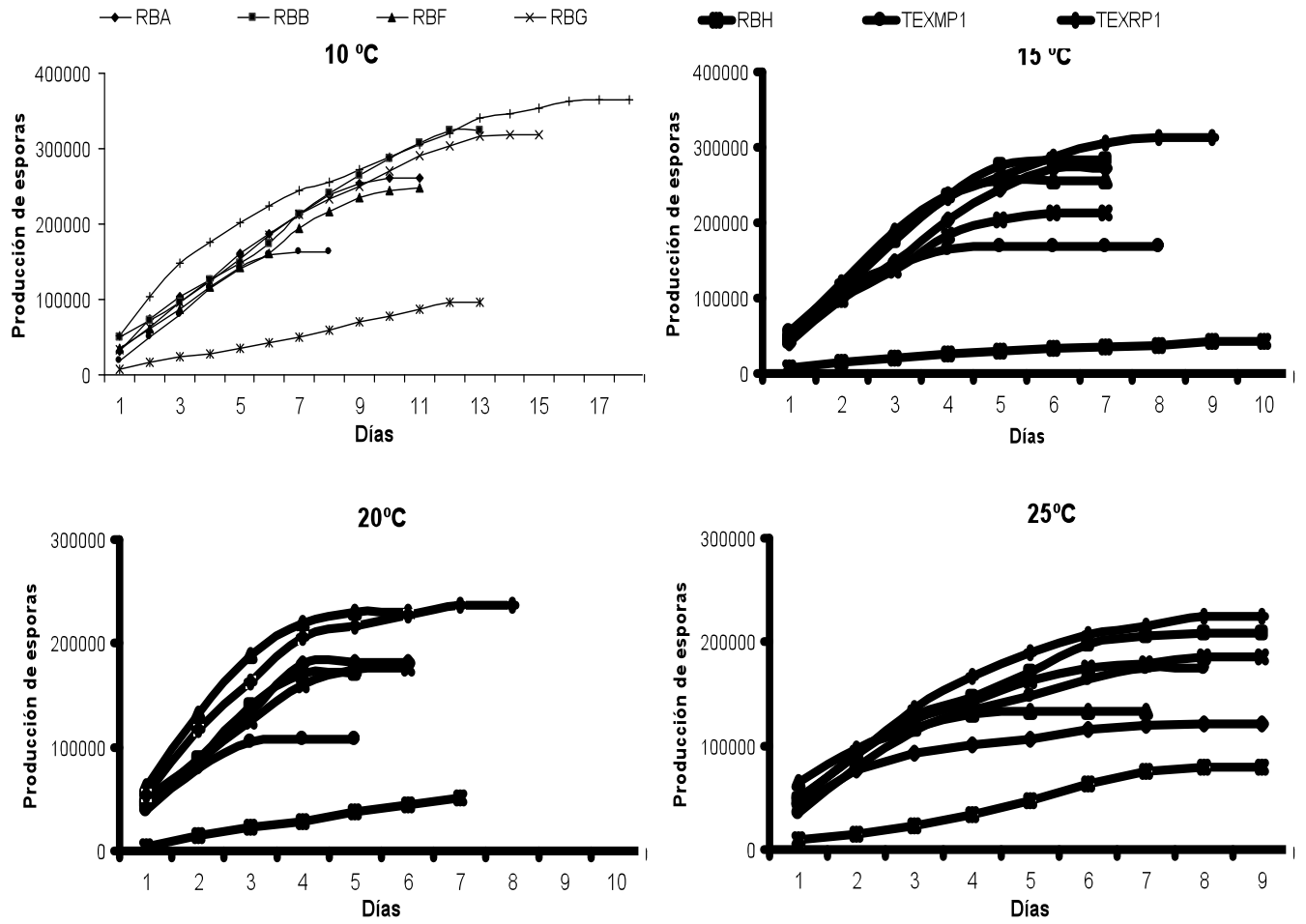
a= Valor asintótico de producción de *conidia* máximo *in vitro*

b= Constante de ajuste del modelo

c= Estimador de velocidad de producción de *conidia*

d= Forma de la curva

x= Tiempo



**Figura 14.** Producción diaria de *conidia* de *P. neoaphidis* a diferentes temperaturas, Modelos Logístico y Weibull.



**Cuadro 3.6.** Estimadores de la curva de los Modelos Logístico y Weibull a la producción de *conidia* de *P. neoaphidis* a diferentes temperaturas

	10°C	R <sup>2</sup>	15°C	R <sup>2</sup>	20°C	R <sup>2</sup>	25°C	R <sup>2</sup>
<b>RBA</b>								
a	290428.6	0.98	283302.85	0.98	188337.66	0.98	135145.21	0.98
b	271919.2		12.180307		11.514483		317214.99	
c	0.00056632		0.03629993		0.04839255		0.30964485	
d	1.5052505						0.43662107	
<b>RBB</b>								
a	369890.76	0.98	294984.03	0.98	189227.74	0.98	221618.07	0.98
b	324917.39		14.573671		159108.14		207757.06	
c	0.000087		0.04287922		0.000085		0.00295949	
d	1.7598987				2.2256064		1.3022259	
<b>RBF</b>								
a	267082.35	0.98			232310.52	0.99	134720.52	0.98
b	239095.11				205726.9		106641.09	
c	0.0001748				0.00043143		0.00518382	
d	1.721827				1.9168963		1.3744074	
<b>RBG</b>								
a	342102.81	0.98	224371.77	0.98	181313.23	0.98	192273.6	0.98
b	324562.26		204498.88		7.1697244		189326.29	
c	0.00052245		0.00059486		0.03977677		0.0067525	
d	1.4571198		1.7178593				1.1701103	
<b>RBH</b>								
a			57328.792	0.98	191923.48	0.98	87759.568	0.98
b			60962.17		165081.59		81714.429	
c			0.0122392		0.000097		0.000019	
d			0.8671671		2.1860184		2.2054165	
<b>TEXMP1</b>								
a	168761.68	0.98*	170735.84	0.98	108637.83	0.98	199548.46	0.98
b	15.802701		154966.29		95134.972		232327.32	
c	0.03691668		0.00162056		0.00056185		0.01758714	
d			1.6394745		1.9851517		0.93889708	
<b>TEXRP1</b>								
a	530001.01	0.98	321888.21	0.98	239236.62	0.98	230013.75	0.98
b	573990.63		327690.92		235246.03		212121.1	
c	0.02183385		0.00222999		0.00243444		0.00145241	
d	0.6757573		1.3935798		1.4450175		1.4734567	

Nota: Tres estimadores en el modelo corresponden al Modelo Logístico y cuatro a Weibull

### 3.4.7 Germinación de *conidia* primarias.

La temperatura influyó en la germinación de las *conidia*. La germinación más rápida se realizó a los 15 °C y 20 °C, entre las cuatro y las ocho horas. A 10 °C la mayor germinación se presentó a las 24 h. La germinación más lenta se presentó a los 25 °C, donde seis de los aislamientos no alcanzaron el 50% de la germinación a las 24 horas (Cuadro A-4).

### 3.4.8. *Conidia* de diferente generación

Se obtuvieron cinco generaciones de *conidia* de *P. neoaphidis*:

***Conidia* primaria:** (Figura 16A-16C). Esporas predominantemente alargadas (68 %) y ovaladas (30 %), ocasionalmente semicirculares (2%) y 0 % de estructuras redondas. Estas *conidia* fueron las que presentaron mayor longitud y amplitud y un CLA cercano a dos (alargadas) y fueron estadísticamente distintas al resto de posteriores generaciones (Cuadro 3.7).

***Conidia* secundaria.** (Figuras 16D-16F). Esporas predominantemente ovals (85%), con una cantidad reducida de alargadas (11 %) y semicirculares y circulares escasamente presentes (2 %). Este grupo no presentó diferencias estadísticas en cuanto a longitud y amplitud respecto a las *conidia* terciarias (Cuadro 3.7).

***Conidia* Terciaria:** (Figuras 16G-16I). Esporas predominantemente ovals (62 %) con aumento en las formas semicirculares (20 %) y circulares (12 %), tendiendo a la disminución de estructuras alargadas (6 %).

***Conidia* cuaternaria:** (Figuras 16J-15L). Esporas predominantemente ovals (54%) y semicirculares (38 %), con poca cantidad de esporas circulares (6 %) con estructuras alargadas casi ausentes (2%). Este grupo presentó diferencias estadísticas en talla respecto a las anteriores y no presentó diferencias estadísticas con las *conidia* pentarias (Cuadro 3.7).

***Conidia* pentaria o de quinta generación:** (Figuras 16M-O). Este grupo se caracterizo por esporas predominantemente ovals (57%) y semicirculares (35 %), ocasionalmente circulares (8 %), con ausencia de estructuras alargadas.

**Cuadro 3.7.** Relación de medidas de *conidia* de *P. neoaphidis* de distintas generaciones.

Promedio ±DE	Primaria	Secundaria	Terciaria	Cuaternaria	Pentaria
Largo ( m)	29.16 ±3.49 <sup>a</sup>	22.94 ±2.87 <sup>b</sup>	21.26 ±3.92 <sup>b</sup>	18.09 ±2.91 <sup>c</sup>	16.38 ±3.01 <sup>c</sup>
Ancho ( m)	16.30 ±1.65 <sup>a</sup>	14.67 ±1.81 <sup>b</sup>	15.08 ±1.92 <sup>b</sup>	13.45 ±2.25 <sup>c</sup>	12.38 ±2.03 <sup>c</sup>
CLA	1.80 ±0.19	1.58 ±0.23	1.42 ±0.25	1.36 ±0.16	1.33 ±0.14

Tratamientos con la misma letra en la misma hilera no presentan diferencias estadísticas.

**Cuadro 3.8.** Producción media de micelio de *P. neoaphidis* a diferentes temperaturas.

Temp	Días						
	0	3	6	9	12	15	18
10 °C	0	1.2525	1.2775	1.2775	1.5825	2.1350	2.3625
15 °C	0	1.3425	4.8975	9.3100	16.2775	17.4975	22.5450
20 °C	0	1.4600	5.5800	12.6500	21.1350	25.2800	37.3025
25 °C	0	1.4700	3.4400	6.2550	10.5525	12.6233	16.5733
30 °C	0	0	0	0	0	0	0

### 3.5 Discusión

#### 3.5.1. Morfología de las colonias de *P. neoaphidis*.

Las características de forma de crecimiento y coloración entre aislamientos de *P. neoaphidis* no fueron muy distintas entre si. Las características agroecológicas de donde fueron obtenidos los aislamientos, pudieran explicar el diferente comportamiento de crecimiento de éstos dos grupos de aislamientos, sin embargo, es necesaria la caracterización molecular para determinar las diferencias o similitudes entre los aislamientos.

#### 3.5.2. Crecimiento de *P. neoaphidis*

Los aislamientos de *P. neoaphidis* considerados en esta investigación, fueron afectados por la temperatura (Figura 9) y presentaron diferente desarrollo *in vitro* (Figura A-7).

El menor crecimiento se registro a los 10 °C y aumento paulatinamente hasta alcanzar su máximo potencial a los 20 °C donde se presentaron las tasas específicas de crecimiento mas altas (Cuadro 3.5), debido a la acelerada producción y pronta germinación de las *conidia* en un tiempo relativamente corto (Cuadro 3.6, A-4, Figura 14-20°C), para descender a los 25 °C e inhibir su desarrollo a 30 °C (Figura 9). El desarrollo *in vitro*, es similar al descrito para el patógeno en forma natural cuando infecta áfidos, el cual esta en el rango de 5 a 25 °C con un óptimo de 20°C y la enfermedad se inhibe a los 0 y 30 °C (Wilding, 1970b; Glare y Milner, 1991). El tiempo en el que el patógeno le causa la muerte al hospedante, está relacionado con el desarrollo del micelio, el cual

es dependiente de la temperatura (Cuadro 3.1). En *Acyrtosiphon pisum* a 20 °C los áfidos infectados murieron en cinco días, pero el tiempo se incrementó a 10 y 16 días cuando los hospedantes se incubaron a 15 °C y 10 °C respectivamente (Wilding, 1970b).

La temperatura óptima calculada para la producción de micelio de los aislamientos mexicanos de *P. neoaphidis*, se ubicó entre los 19.13 °C y 19.97 °C (Cuadro 3.2). No existió diferencia entre los aislamientos de Tamaulipas y los del Estado de México a pesar de las diferencias agroecológicas de donde fueron aislados. Estos resultados no fueron diferentes a los reportados en otros estudios de *P. neoaphidis* en otras latitudes (Glare y Milner 1991), lo que sugiere poca variabilidad de la especie en este aspecto.

El aislamiento RBB presentó el mejor desarrollo, ligeramente superior a RBF y TEXRP1 (Figura 3.2), y mostró mejor adaptabilidad a 10 °C y 15 °C y la tercer tasa de cambio a 20 °C (Cuadro 3.5). Los aislamientos TEXMP1 y RBH presentaron los niveles de crecimiento más reducidos, menor producción de esporas y la germinación mas lenta dentro de las primeras cuatro horas, bajo la mayoría de las temperaturas, lo que pudiera estar asociado a poca virulencia (Altre *et al.*,1999) (ver también Capítulo 4). A nivel individual, los aislamientos RBF y TEXRP1 (20 °C) fueron los que presentaron los mejores crecimientos (Cuadro A-2); sin embargo, fueron afectados en gran medida por las temperaturas de 10 y 25 °C; no obstante esto, la rapidez de su desarrollo a 15 y 20 °C, los coloca como agentes potenciales para futuros estudios de campo en el control biológico de áfidos plaga.

### **3.5.3. Producción de esporas.**

Las temperaturas afectaron significativamente la producción de esporas (Figura 12). El número de *conidia* disminuyó a medida que la temperatura se incrementó, hasta que se inhibió a 30 °C. Estos resultados (*in vivo*) difieren parcialmente a los encontrados por Glare y Milner (1991), quienes mencionan que entre 15 °C y 25 °C se produjo el mismo número de *conidia*, solo que en diferente número de día. El rango óptimo de temperatura para la esporulación

de *P. neoaphidis* se ubica entre los 10 y 20 °C, con una nula o muy débil esporulación a 30 °C (Glare y Milner, 1999; Shah *et al.*, 2002). Wilding (1970a) y Hemmati *et al.* (2001) encontraron que la mayoría de las *conidia* de *P. neoaphidis* fueron colectadas en la madrugada u horas tempranas, cuando las temperaturas se ubicaron entre los 10 y 16 °C y la humedad relativa fue superior al 90%. Esta característica le confiere a *P. neoaphidis* varias ventajas para infectar a sus hospederos: 1. Producir una cantidad importante de *conidia* con un alto porcentaje de germinación en poco tiempo (Cuadro A-2), y 2. Atacar al hospedero cuando la actividad fisiológica y la capacidad de respuesta de éste sean más lentas.

Los resultados obtenidos por Glare y Milner (1991) indican que la temperatura óptima para la esporulación de *P. neoaphidis* se ubica entre los 18 y 20 °C, lo que aparentemente contrasta con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde la producción máxima de *conidia* se observó a 10 °C (Cuadro 3.3). Sin embargo, para *P. neoaphidis* el factor tiempo es fundamental para el desarrollo de una epizootia, y al respecto, las temperaturas de 15 °C y 20 °C presentaron los mayores estimadores de la velocidad de producción de *conidia* diaria que las de 10 °C ( $P \leq 0.05$ ) (Figura 12 y 14, Cuadro 3.6). La esporulación total en ambas, se realizó 50% de tiempo más rápido que la de 10 °C (Cuadro 3.3).

Entre aislamientos, los que produjeron la mayor cantidad de esporas fueron TEXRP1, RBB y RBF. Estos aislamientos también fueron de los más sobresalientes en la producción de micelio ( $P \leq 0.05$ ), lo que explica la producción notable de *conidia* por parte de estos tres aislamientos. El aislamiento RBH, el cual produjo una menor cantidad de micelio, fue el que generó la menor proporción de *conidia*. El pobre crecimiento y esporulación de este último aislamiento puede estar asociado a dos posibles causas: 1. Incapacidad para desdoblar los nutrientes del medio de cultivo, y/o 2. La variabilidad genética del aislamiento. En general se observó una relación entre la producción de micelio y la producción de esporas, como lo observado por

Edelstein *et al.*, (2004) en *Nomuraea rileyi*, donde alto crecimiento radial provocó alta esporulación entre 20 y 26 °C.

Es difícil establecer si existen diferencias importantes en el comportamiento de esporulación de *P. neoaphidis* “*in vivo*” e “*in vitro*”. En el primero, la esporulación inicia dentro de las primeras dos horas después de la muerte del insecto y el 80% de la esporulación ocurre en un período de 24 horas (Glare y Milner, 1991), lo que supone que la esporulación se inicia cuando los nutrientes del hospedante han sido agotados. En el crecimiento en medios de cultivo, la esporulación se inicia mucho antes de que los nutrientes se agoten, por lo que los tiempo de la producción de *conidia* son más prolongados, como lo muestra el Cuadro 3.3.

### **3.5.5. Morfología de las *conidia***

La forma básica de las *conidia* de los diferentes aislamientos fueron constantes de una temperatura a otra. Las dimensiones de las *conidia* de *P. neoaphidis* obtenidas de los aislamientos, son muy semejantes a las indicadas en otros estudios *in vitro* (Hematti *et al.* 2001) (Cuadro A-3). Los aislamientos del estudio se pueden dividir en dos grupos morfológicos: Los de *conidia* alargadas (RBA, RBF, RBG, TEXMP1 y TEXRP1) y las ovaladas (RBB y RBH), éstas últimas pertenecientes a la región de exploración en el estado de Tamaulipas. El número reducido de aislamientos impide emitir un diagnóstico de la diversidad morfológica de las *conidia* de los aislamientos mexicanos; sin embargo, son indicio de una mayor diversidad en el grupo.

A excepción del aislamiento RBA donde la temperatura no influyó en las dimensiones de las esporas, las temperaturas entre 15 y 25°C presentaron las *conidia* de menores dimensiones, comparadas con las producidas a 10 °C (Cuadro A-3). Las dimensiones de las *conidia*, están relacionadas con la velocidad de caída y lo que influye su dispersión en el ambiente a través de las corrientes de aire. Las esporas grandes producidas *in vitro*, presentaron caídas más rápidas que las pequeñas producidas *in vivo* (Hematti *et al.*, 2002). Es posible deducir que la acelerada producción de *conidia* y micelio entre los 15 y

20 °C, es la combinación ideal para la producción de *conidia* con las características propias para su rápida dispersión en el ambiente.

### 3.5.6 Modelo de crecimiento y esporulación

Para el desarrollo de modelos que describen el crecimiento de microorganismos en medios de cultivo, es recomendable que los datos sean analizados mediante curvas de crecimiento con la utilización de parámetros importantes como la tasa de crecimiento (c), en lugar de realizar análisis para modelos lineales (Zwietering *et al.*, 1990). Los modelos también han sido utilizados para describir el comportamiento o simulación de la acción de entomopatógenos en sus hospederos (Weeseloii, 2002; Feng y Li, 2003). En general, el modelo logístico describe el comportamiento del crecimiento micelial de *P. neoaphidis* (Figura A-7). El desarrollo de los aislamientos RBA;RBH y TEXRP1 a 10 °C, no fue posible de explicar mediante este modelo, debido a la poca variación de los datos, atribuida al lento crecimiento del entomopatógeno a esa temperatura (Figura 9 y A-7).

En las temperaturas de 10 °C y 25 °C, la longitud de la fase Lag fue mas evidente que en las respectivas 15 °C y 20 °C (Figuras 3.6). Invariablemente, a 10 °C el desarrollo de *P. neoaphidis* se mantuvo en esta fase, mientras que a 25 °C esta fase permaneció de nueve a doce días aproximadamente (Figura A-7). Entre 15° C y 20° C, la fase Lag se presentó entre los seis y tres días respectivamente, que es el intervalo de temperatura óptimo para el desarrollo de *P. neoaphidis* (Cuadro 3.2, Figura 9). Griffin (1981) menciona que la fase Lag depende de la naturaleza del inóculo y de la clase de nutrientes del medio; sin embargo, en el presente estudio se observó que esta fase en *P. neoaphidis* también esta influenciada por factores como la temperatura y la humedad relativa, que favorecen o inhiben la capacidad del hongo para asimilar los nutrientes. La fase Log o exponencial se puede definir como la tasa de mayor crecimiento (Figura 13). Esta fase se ubicó entre los 15°C y 20°C, fue favorecida por la mayor proporción de *conidia* diaria producida y la mayor velocidad de germinación de las *conidia* en estas temperaturas (Cuadros 3.3 y A-4).

A diferencia del micelio, la producción de *conidia* de *P. neoaphidis* se explicó en su mayoría mediante el modelo de Weibull y en menor medida con Logístico (Cuadro 3.6). La determinación de la fase lag en la esporulación a todas las temperaturas fue difícil de establecer bajo las condiciones en que se desarrolló el experimento, debido a que el proceso de esporulación se inició con micelio maduro y no desde la formación del mismo, de tal manera que el experimento inició con una abundante producción de esporas.

La fase sobresaliente en la esporulación fue la exponencial y fue más evidente a las temperaturas de 15 y 20 °C (Figura 14). La producción abundante de esporas a éstas temperaturas en pocos días (Cuadro 3.3), provocó que la tasa de incremento (C) fuera menor o semejante a la de 10 y 25°C, pero con valores elevados de la forma de la curva (d), los cuales modifican el ángulo de fase exponencial haciéndola más vertical a medida que sus valores tienden a dos (Cuadro 3.6).

### **3.5.7. Germinación de *conidia*.**

La temperatura influyó en el tiempo de germinación de las *conidia* (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) (Cuadro A-4). Las temperaturas ideales para la germinación se ubicaron entre los 15 y 20° C y las menos propicias fueron a 10 y 25°C. En laminillas, la germinación de la *conidia* culminó en una mayor proporción de *conidia* secundaria; las de medio de cultivo tendieron a la producción de micelio, sin embargo los mecanismos del patógeno para producir micelio o esporas es incierto. Se cree que la germinación de *P. neoaphidis* es independiente del substrato y existen evidencias de que intenta penetrar casi cualquier tipo de substrato (Wilding y Brobyn, 1982; Glare y Milner, 1991), aunque se ha descubierto que la germinación en hojas puede activar el mecanismo de descarga de *conidia* secundaria (Glare y Milner, 1991).

Se observó que si el tubo germinativo se genera en los extremos, el resultado será la producción de micelio o el intento de penetración al hospedero, (Figura 15A, 15C y 15E), mientras que si se inicia por la parte media lateral, se producirá una espora secundaria o de posterior generación



(Figura 15B). Solo un tubo germinativo se produce, ocasionalmente se pueden presentar dos (Figura 15A), en tanto que una *conidia* solo genera una sola *conidia* de posterior generación, la cual deja una cicatriz en su sitio de origen en la antigua pared celular (Figura 15D).

Cada tubo germinativo, según el tamaño de la *conidia*, alcanza una longitud promedio de 105  $\mu$ m. Es importante resaltar que algunas *conidia* formaron en la base del tubo germinativo una celda hueca, la cual estaba separada del contenido citoplasmático mediante un septo (Figura 7.5), este proceso ha sido observado en otras especies de Entomophthorales (ej. *Zoophtora radicans*, Perry *et al.*, 1982; Butt *et al.*, 1990). Esta condición permite aumentar la distancia recorrida por el tubo germinativo y concentrar el protoplasma restante en la parte apical (Figura 15E). Al parecer este proceso continúa hasta que la espora penetra en un hospedero o el citoplasma desaparece, como ocurre en la producción de esporas de “n” generación.

El tamaño de las celdas formadas en el tubo germinativo variaron entre sí, en general son ligeramente más reducidas en longitud a la *conidia* que las generó (Figura 15C y 15E). En el presente estudio se lograron detectar hasta nueve celdas; según Perry *et al.* (1982), se pueden producir de 1 a 8 celdas en pocas horas. La suma del tubo germinativo, más las celdas y la antigua pared celular, llegaron a medir hasta 280  $\mu$ m, una longitud aparentemente apropiada para que el hongo ubique un sitio ideal de penetración en la cutícula de un áfido (Figuras 15C y 15E). Faltan estudios que lo confirmen, pero la función de las celdas indicadas, parece ser una medida de adaptación para que el hongo pueda extender el tubo germinativo. Adicionalmente, los septos impiden que el contenido citoplasmático se diluya en la cavidad de las celdas huecas, y que la presión necesaria para realizar la penetración se pierda y por consiguiente se inhiba la infección. Previo a la formación de septos en la germinación de las *conidia* primaria se observó una zona de transición (Figura 15E), que se caracterizó por la presencia de un protoplasma granular, el cual tiene la función de evacuar el contenido hacia la celda adyacente en otros Entomophthorales (Perry *et al.*, 1982).

### 3.5.8 *Conidia* de diferente generación

Se determinó la existencia de cinco generaciones de *conidia*. La forma de esporas predominantes fueron las ovals, las cuales constituyeron un número importante de la población en cada una de las generaciones. Las formas alargadas se confinaron a las tres primeras generaciones, en especial a la primera, mientras que las semicirculares iniciaron la aparición hasta la tercera generación. Las esporas de menor abundancia fueron las circulares cuyos porcentajes más altos se registraron en las *conidia* de quinta generación. La longitud de las esporas decreció conforme las generaciones avanzaron, siendo la más notoria entre la primera y segunda generación, ya que a partir de ahí las diferencias fueron menos marcadas (Cuadro 3.7). Aunque se presentaron diferencias estadísticas, el ancho de las *conidia* fue menos marcado de una generación a otra (Cuadro 3.7, Figura 15), en especial a partir de la segunda generación. Hemmati *et al.*, (2002) mencionan que el diámetro aerodinámico de *P. neoaphidis* está más relacionado con la longitud que con su ancho, de ahí la poca variación de una generación a otra.

El CLA decreció conforme las esporas pasaron a las siguientes generaciones (Cuadro 3.7), lo que significa que las estructuras tendieron a ser más esféricas. Los datos reflejan que las *conidia* de *P. neoaphidis* disminuyen más en longitud que amplitud, lo cual queda establecido con la disminución de las esporas alargadas a través de las generaciones (Cuadro 3.7, Figura 16), la estabilización de las ovaladas (Figura 16E) y el aumento de las estructuras semicirculares y circulares (Figuras 16G y 16O). El contenido citoplasmático consumido para la espora siguiente, provoca que las subsecuentes generaciones se produzcan esporas más pequeñas.

Los resultados de CLA son similares a los obtenidos por Hematti *et al.* (2002) para esporas primarias y secundarias de *P. neoaphidis*, quienes mencionan que esta relación está estrechamente vinculada a la capacidad del hongo para su dispersión y sus resultados indican que las esporas más grandes presentan una caída más rápida que las de menor tamaño. Bajo tales circunstancias, las esporas de generaciones posteriores a las secundarias,

podrían al igual que sus predecesoras, mantenerse más tiempo en las corrientes de aire que las de otros Entomophthorales (Wilding, 1970a) y favorecer su dispersión, evento del que depende el desarrollo de la epizootia (Hemmati *et al.*, 2001; Hemmati *et al.*, 2002). A juzgar por el tamaño de algunas esporas de quinta generación, es probable que el proceso de producción de *conidia* continúe y que las *conidia* de quinta generación como la de la Figura 16O, con una cantidad de citoplasma considerable, den origen a *conidia* de posterior generación, con dimensiones menores, como la de la Figura 16M.

Faltan estudios para determinar la patogenicidad y virulencia de las *conidia* posteriores a la segunda generación, para determinar el rol de estas esporas podrían tener en el desarrollo de epizootias

### **3.6 Conclusiones**

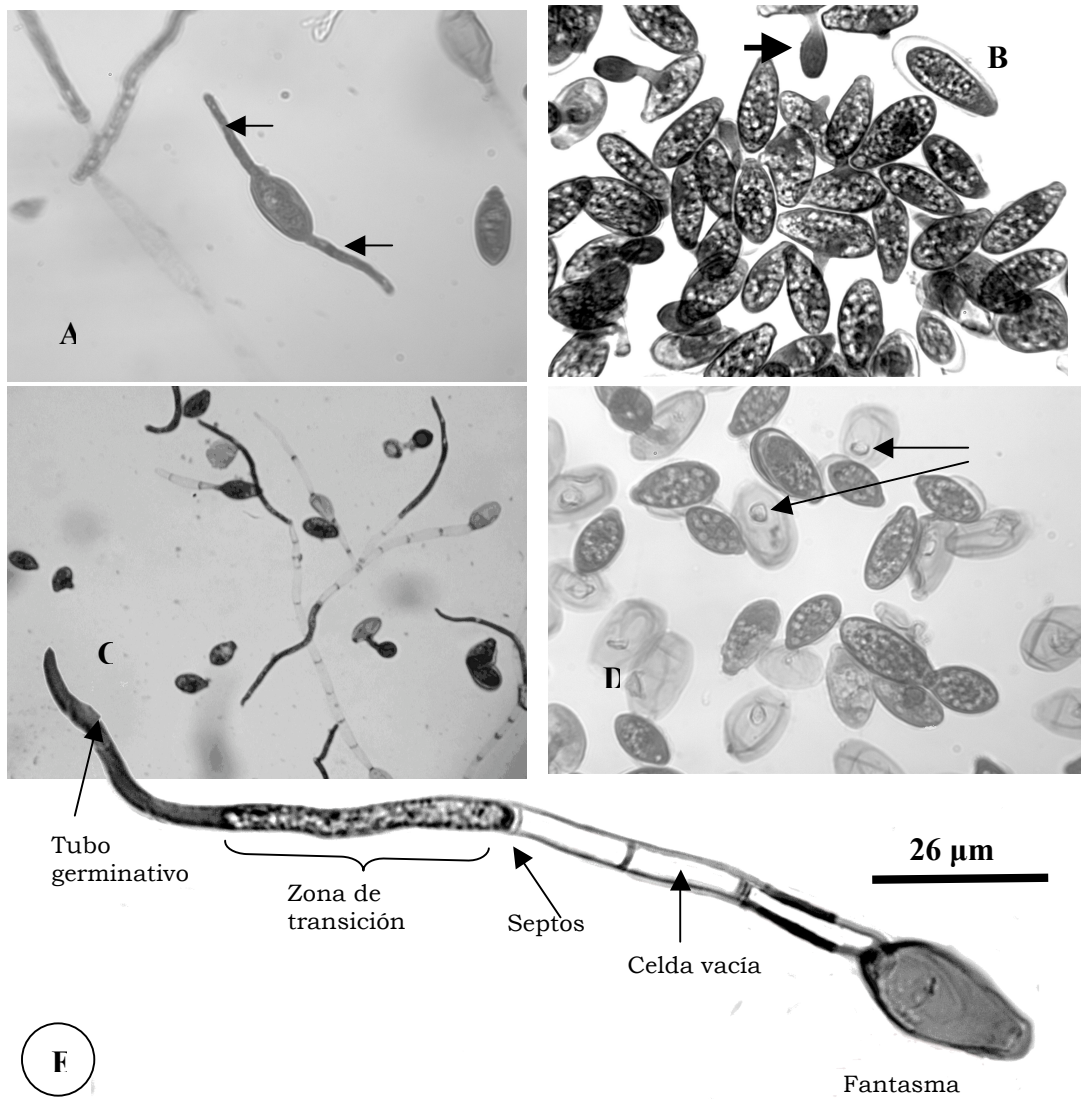
La germinación, desarrollo y esporulación de *P. neoaphidis* son afectados por la temperatura. Los umbrales para estas funciones se ubican entre los 15 y 25° C, con óptimo entre 19 y 20° C, con inhibición de todo desarrollo a 30° C. El mejor aislamiento de *P. neoaphidis* en producción de micelio y esporulación fue RBB obtenido en el estado de Tamaulipas.

El desarrollo radial y esporulación acumulado de *P. neoaphidis* en medio de cultivo SEMA presenta un comportamiento sigmoide que puede ser explicado mediante el Modelo Logístico, y mediante los Modelos de Weibull y Logístico, respectivamente.

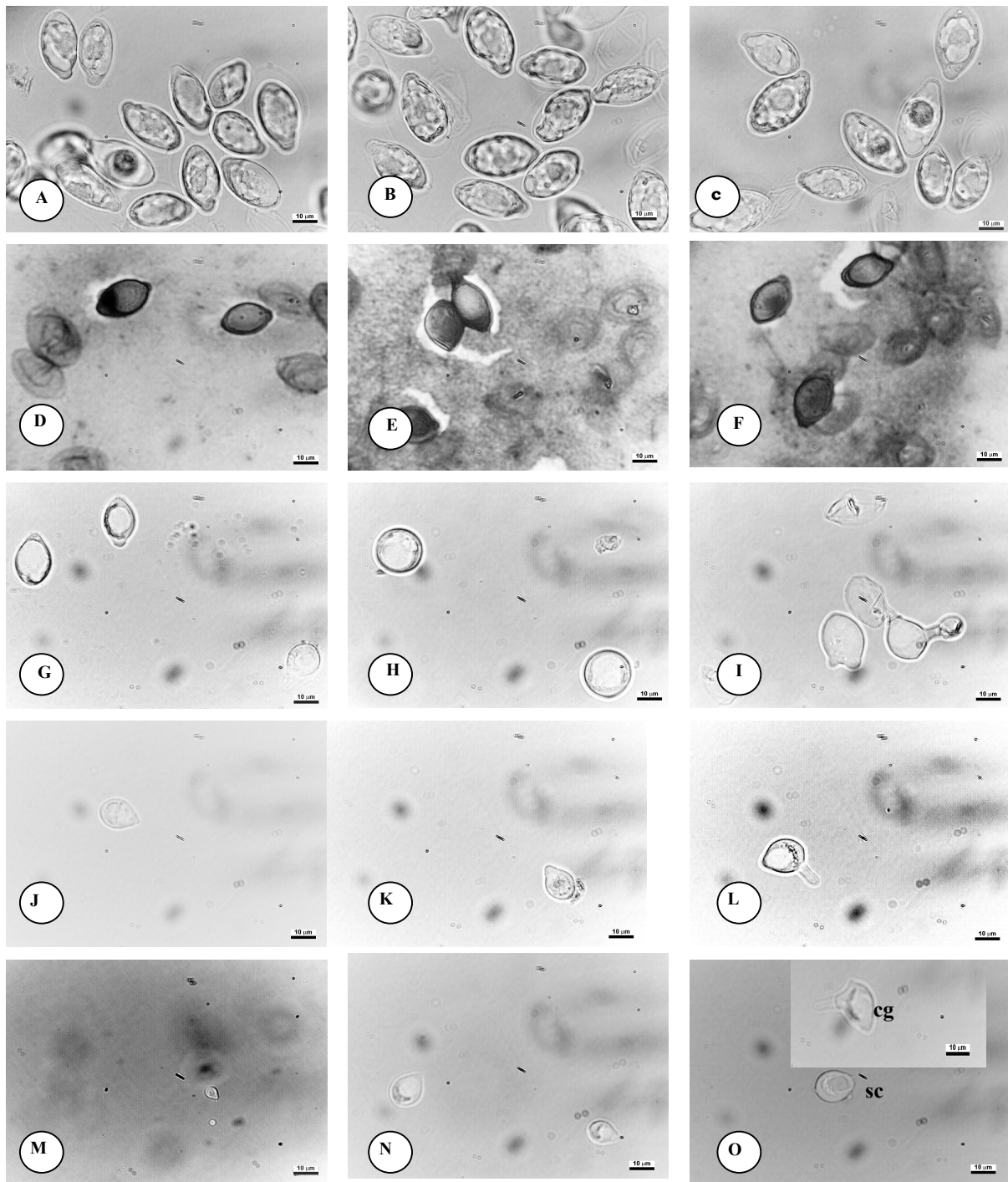
El 90 % de la germinación de las *conidia* primarias de *P. neoaphidis* se producen a las ocho horas de incubación a temperaturas de 15 y 20 °C.

La formación de un tubo germinativo por la parte lateral de la *conidia* de *P. neoaphidis* propiciará la formación de una espora, mientras que la realizada por los extremos producen tubos germinativos que conducirán al intento de penetración al hospedero. Los tubos germinativos de este patógeno pueden alcanzar 280 de longitud.

*P. neoaphidis* puede producir al menos cuatro generaciones de *conidia* a partir de una primaria. Las *conidia* de *P. neoaphidis* tienden a disminuir mas la longitud que la amplitud de una generación a otra.

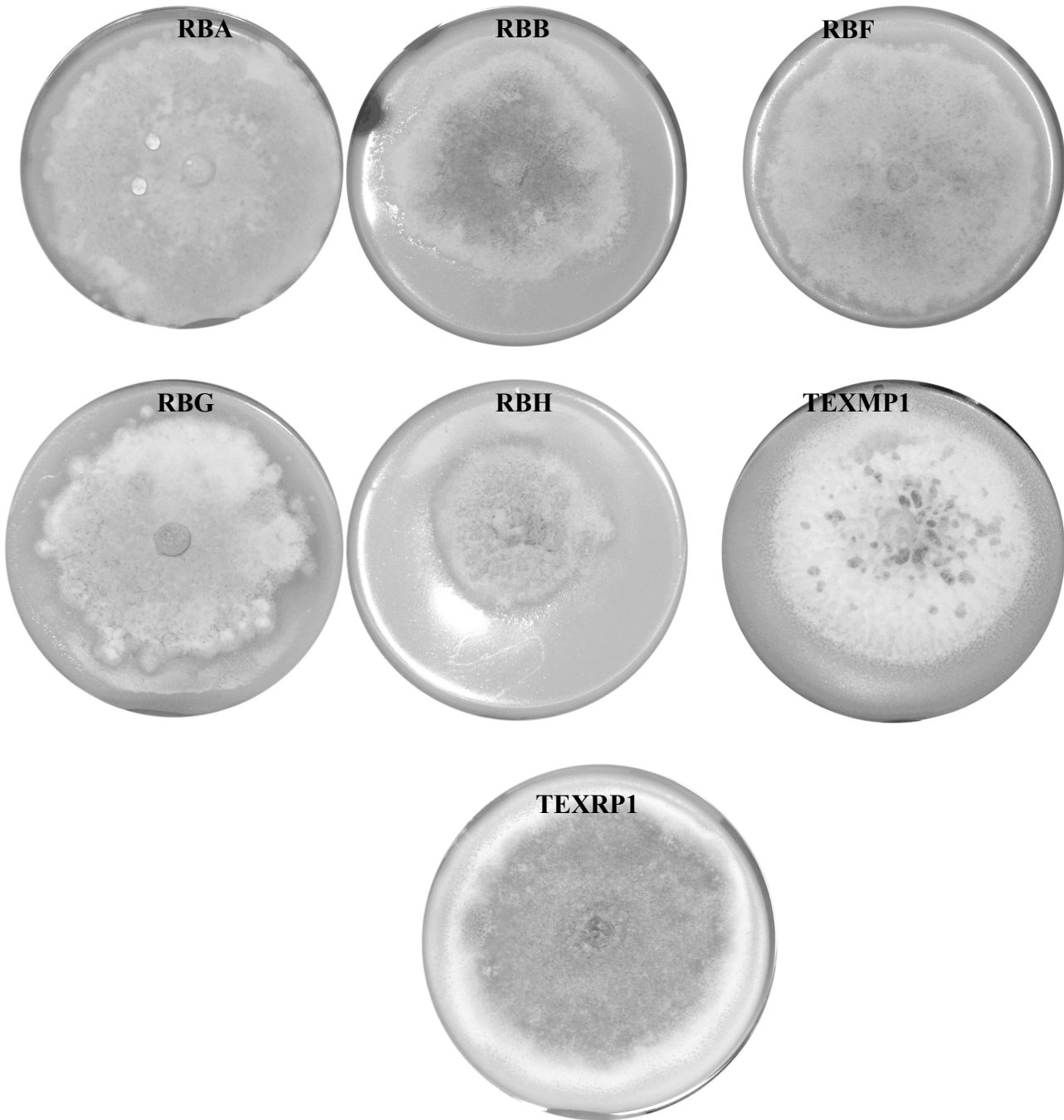


**Figura 15. Germinación de *Pandora neoaphidis*.** **Figura 15A**, Tubo germinativo; **Figura 15B**, Generación de *conidia* secundaria; **Figura 15C**, *Conidia* primaria germinada; **Figura 15D**, Fantasma con cicatriz por expulsión de espora; **15E**, *Conidia* primaria germinada con todas sus estructuras.



**Figura 16. Conidia de *Pandora neaphidis* de diferente generación (escala 10 µm). 16A-C, Conidia primaria (alargadas); 16D-F, Conidia secundaria (ovalada); 16G-I, Conidia terciaria, 16H Conidia circular, 16I Conidia terciaria con pared celular de su estado secundario y generando una espora cuaternaria; 16J-L, Conidia cuaternaria, 16L Conidia generando conidia pentaria; 16M-O Conidia pentaria, 16O espora germinando para producir posiblemente espora de sexta generación, 16O Conidia germinando (cg) y semicircular (sc).**





**Figura 17. Morfología de las colonias de diferentes aislamientos de *Pandora neoaphidis*.** Tamaulipas: RBA-RBH; Estado de México: TEXMP1 y TEXRP1.

### 3.7 Literatura citada

- Altre, J. A., J. D. Vandenberg and F. A. Cantone. 1999.** Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to Diamondback moth, *Plutella xylostella*: Correlation with spore size, germination speed and attachment to cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* 73: 332-338.
- Arthurs, S and M. B. Thomas. 2001.** Effects of temperature and relative humidity on Sporulation of *Metarhizium anisoplae var acridum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 78: 59-65.
- Dara S. K., and P. J. Semtner. 1998.** Influence of substrate and temperature on the developmental morphology of *Pandora neoaphidis* (Zygomycetes: Entomophthorales). *J. Invertebr. Pathol.* 72:112-118.
- Edelstein, J. D.; R. E Leucona and A. V. Trumper. 2004.** Selection of culture media and in vitro assessment of temperature dependent development of *Nomuraea rileyi*. *Neotropical Entomology* 33(6):737-742
- Ekesi, S., P. A. Shah, S. J. Clarck and J. K. Pell. 2005.** Conservation Biological control with the fungal pathogen *Pandora neoaphidis*: implications of aphid species, host plant and predator foraging. *Agricultural and Forest Entomology.* 7: 21-30.
- Feng, M. G. and H. P. Li. 2003.** Experimental epizootiology of *Zoophthora anhuiensis* (Entomophthorales) against *Myzux persicae* (Homoptera: aphididae) with a description a modified Gompertz model for aphid epizootics. *Environ. Microbiol.* 5: 1203-1211.
- Fuxa, J. R. and Y. Tanada. 1987.** Epidemiological Concepts applied to insect Epizootiology. pp 3-21. *In:* Tanada, Y. and H. K. Kaya (eds.). *Epizootiology of insect diseases.* Wiley-Interscience Publications. N. Y.
- Griffin, H. D. 1981.** *Fungal Physiology.* Second edition. Wiley Liss. New York. 102-214.
- Glare, T. R. and R. J. Milner. 1991.** Ecology of entomopathogenic fungi. *In:* Aurora, D.K., L. Ajello and K. G., Mukerji (eds). *Handbook of Applied Mycology. Human, Animals and Insects.* Marcel Dekker, New York. (2):547-612.



- Hajek, A. E., R. I. Carruthers and R. S. Soper. 1990.** Temperature and moisture relations of sporulation and germination by *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthoraceae) a fungal pathogen of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). *Environmental Entomology*. 19 (1): 85-90.
- Hatting, L., H., R. A. Humber, T. J. Poprawski and R. M. Miller. 1999.** A survey fungal pathogens of aphids from South Africa, with special reference to cereal aphid. *Biological Control* 16:1-12.
- Hemmati, F., J. K. Pell, H. A. McCartney and L. Deadman. 2002.** Aerodynamic diameter of conidia of *Erynia neoaphidis* and other entomophthoralean fungi. *Mycol. Res.* 106 (2): 233-238
- Hemmati, F., J. K. Pell, H. A. Mc Cartney and M. L. Deadman. 2001.** Airborne concentrations of conidia of *Erynia neoaphidis* above cereal fields. *Mycological Research*. 105 (4): 485-489
- Inglis, G. D., M. S. Goettel, T. M. Butt and H. Strasser. 2001.** Use of Hyphomycetous fungi for managing insects pests. pp. 23-69. *In: Butt, T. M. and N. Magan (eds). Fungi as biocontrol agents.* CABI Publishing. New York.
- James, R. R., B. A. Croft, B. T. Schaffer and B. Lighthart. 1998.** Impact of Temperature and humidity on host-pathogen interactions between *Beauveria bassiana* and coccinellid. *Environ. Entomol.* 27 (6): 1506-1513.
- Kalkar, Ö. 2005.** A SEM Study of The Sporulation Process of *Pandora neoaphidis* and *Neozygites fresenii*. *Turk J. Biol. Turkey.* 29(2005) 137-147.
- Mcleod P., J., D.C. Steinkraus, J.C. Correll and T.E. Morelock. 1998.** Prevalence of *Erynia neoaphidis* (Entomophthorales: Entomophthorace) Infections of green peach aphid (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology*. 27 (3): 796-800.
- Montgomery, D. C. 2003.** Diseños y análisis de experimentos. Segunda edición. Limusa Wiley. México. pp. 427-492.

- Papierok, B. and A. E. Hajek. 1997.** Fungi: Entomophthorales. pp.87-212. *In:* Lacey Lawrence A. (edit.). Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press. New York.
- Pell, J.K., J. Eilenberg, A. E. Hajek and D. C. Steinkraus. 2001.** Biology, Ecology and Pest Management potential of Entomophthorales. pp.71- 153. *In:* T.M. Butt, C.W. Jackson and N. Magan (eds). Fungi as Biocontrol Agents, Progress, Problems and Potential. CABI Publishing.
- Perry, D. F., D. Tyrrell and S. J. Delyzer. 1982.** The mode of germination of *Zoophthora radicans* zygospores. Mycologia 74: 549-554.
- Romaña, C. A. y Fargues, J. F. 1987.** Relative susceptibility of different stages of *Rhodnius prolixus* to the Entomopathogenic Hyphomycete *Beauveria bassiana*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 87(3):363-368.
- SAS Institute, Inc. 1988.** SAS Use's Guide: Statics. Release 6.03. ed. SAS Institute, Inc. Cary, NC. 1208 p.
- Sánchez-Peña, S. 2000.** Entomopathogens from two Chihuahuan desert localities in México. Bio Control 45:63-78.
- Shah, P. A., M. Abei and U. Tuor. 2002.** Effects of constant fluctuating temperatures on sporulation and infection by the aphid-pathogenic fungus *Pandora neoaphidis*. Entomología Experimentalis et Applicata. 103: 257-266.
- Shah, P. A., S. J. Clarck J. K. Pell. 2004.** Assessment of aphid host range and isolate variability in *Pandora neoaphidis* (Zygomycetes: Entomophthorales). Biological Control. 29: 90-99.
- Steinkraus D. C., Hollingsworth R. G. 1994.** Predicting fungal epizootics on cotton aphids. Arkansas Far. Research. 43:6
- Steinkraus, D. C., and P. H. Slaymaker. 1994.** Effect of temperature and humidity on formation, germination, and infectivity of conidia of *Neozygites fresenii* (Zygomycetes:Neozygitaceae) from *Aphis gossypii* (Homoptera:Aphididae). J. Invertebr. Pathol. 64: 130-137.

- Weeslooi, R. M. 2002.** Modeling the impact of the fungus *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales) on Gypsy Moth (Lepidoptera:Lymantridae): incorporating infection by conidia. Environmental Entomology 31(6):1071-1084.
- Wilding, N. 1970 (a).** *Entomophthora* conidia in the air-spora. Journal of General Microbiology. 62:126-130.
- Wilding, N. 1970 (b).** The effect of temperature on the infectivity and incubation periods of the fungi *Entomophthora aphidis* and *E. thaxteriana* for the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. Proc. Int. colloq. Invertebr. Pathol. College Park, M., pp. 84-88.
- Wilding, N. and P. J. Brobyn. 1982.** The host cuticle as a barrier to infection by Entomophthorales. Rep. Rotham. Exp. Sta. Pt. 1: 98-100.
- Wilding N., Mardell S.K., Brobyn P.J. 1986.** Introducing *Erynia neoaphidis* into the field population of *Aphis fabae*: form of the inoculum and effect of irrigation. Ann. Appl. Biol. 108:373-385.
- Zwietering, M. H., I. J. Burger, F. M. Rombouts and K van't Riet. 1990.** modeling of the bacterial growth curve. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1875-1881.

## CAPITULO 4

### **Virulencia de siete aislamientos de *Pandora neoaphidis* sobre el pulgón cenizo de la col *Brevicoryne brassicae* (Homoptera: Aphididae).**

#### **4.1 Resumen**

Se realizaron estudios de laboratorio para evaluar la patogenicidad de siete aislamientos nativos de *Pandora neoaphidis* sobre el pulgón cenizo de la col *Brevicoryne brassicae*, dos colectados en cultivo de brócoli en el Estado de México en el 2006 (TEXMP1 y TEXRP1) y cinco aislamientos colectados en sorgo en Tamaulipas (RBA, RBB, RBF, RBG y RBH). Los porcentajes de mortalidad más altos fueron provocados por los aislamientos RBF, TEXRP1 y RBB, con 87, 76 y 72 % respectivamente. Estos resultados confirman el potencial que presenta *P. neoaphidis* como agente de control biológico de *B. brassicae*.

#### **4.2 Introducción**

El pulgón cenizo de la col *Brevicoryne brassicae* (L.) (Homoptera: Aphididae) es una de las plagas más importantes asociadas a crucíferas (López, 1990). Debido a que los áfidos poseen un aparato bucal succionador, tienen reducida o nula susceptibilidad a bacterias y virus entomopatógenos, excepto a los hongos, los cuales tienen la habilidad para atravesar directamente la cutícula y provocar daños a diferentes estados de desarrollo y edades del hospedero (Ferron, 1978; Steinkraus, 2006).

Uno de los grupos más importantes de entomopatógenos que atacan áfidos y causan epizootias son los Entomophthorales (Tanada y Kaya, 1993), entre estos destaca el hongo entomopatógeno *Pandora neoaphidis*, con relevancia a nivel mundial y considerado como patógeno exclusivo de Aphididae (Glare y Milner; 1991; Shah *et al.*, 2004).

Se conoce en México la regulación natural de *P. neoaphidis* sobre poblaciones de *B. brassicae* y en otras especies áfidos, pero existen reportes de

más de un 90% de mortalidad provocada en *B. brassicae* en forma natural en plantaciones de canola *Brassica napus* y más de un 50% en *Rhopalosiphum maidis* en sorgo *Sorghum bicolor*, como se menciona en el Capítulo 2.

Con el propósito de estudiar la relación de *P. neoaphidis*-*B. brassicae* se evaluó en condiciones de laboratorio la patogenicidad de siete aislamientos nativos de *P. neoaphidis*; dos procedentes del Estado de México: TEXMP1 y TEXRP1 y cinco de Tamaulipas: RBA, RBB, RBF, RBG y RBH, con el fin de seleccionar aislamientos con potencial de uso en futuros trabajos de control biológico de *B. brassicae*.

### **4.3 Materiales y métodos**

#### **4.3.1 Cultivos de *P. neoaphidis***

Cinco aislamientos obtenidos de *R. maidis* en el municipio de Río Bravo, Tamaulipas, infestando cultivo de sorgo (RBA, RBB, RBF, RBG y RBH) (Capítulo 2) y dos aislamientos del Estado de México TEXRP1 de *Rhopalosiphum padi* y TEXMP1 aislado de *Myzus persicae* infestando cultivo de brócoli fueron obtenidos de campo. Los aislamientos fueron desarrollados en Sabouraud-dextrosa-agar (SDA) suplementados con leche y yema de huevo (Wilding y Brobyn 1980). Las cajas de cultivo fueron mantenidas en oscuridad a 20°C ±2 dentro de cajas de plástico (Ekesi *et al.*, 2005) con una HR de 95±2. En todos los estudios, se utilizaron cultivos de 1° a 3er transferencia, a partir del aislamiento original del insecto.

#### **4.3.2 Cría del pulgón cenizo de la col *B. brassicae*.**

*B. brassicae* fue obtenido y cultivado en brócoli *Brassica oleracea* var *italica* mantenidas en invernadero a 22°C±2. Para el bioensayo se emplearon hojas jóvenes de consistencia coriácea de 10 cm de longitud, que contaban con un pequeño tallo, estas se colocaban en forma individual en un tubo de ensayo de 15 cm de largo por dos de diámetro con una solución nutritiva a base de vermicomposta (Figura 19A). Posteriormente el tubo era sellado con Parafilm® para evitar la evaporación de la solución y dar soporte a la hoja.

En cada dispositivo, se colocó una colonia de 50 individuos de *B. brassicae*, la cual procedía de la cría de laboratorio. Pequeñas secciones de hojas plagadas eran recortadas y adheridas al nuevo substrato mediante un alfiler permitiendo el establecimiento de los pulgones. Las colonias utilizadas fueron de tres semanas de subcultivo.

#### **4.3.3 Preparación de la solución nutritiva para el mantenimiento de las hojas de brócoli y de la colonia de áfidos.**

La vermicomposta se obtuvo del área de Agroecología del Colegio de Postgraduados, esta se paso a través de un tamiz del número 100 (149 micras) para eliminar residuos vegetales y material grueso, se tomaron 100gr que se colocaron en un matraz con agua destilada, se aforó a un 1L y se agitó vigorosamente por tres minutos para permitir la suspensión del material.

La mezcla se dejó reposar por diez minutos para que sedimentara y se tamizó nuevamente con una malla de 250 micras, procurando evitar el paso del sedimento. La solución obtenida, se aforó a un litro (solución madre). La solución se esterilizó por 15 minutos a 120 libras de presión y se dejó reposar por 24 h. La proporción utilizada en los dispositivos de cría fue de 1:5 partes de solución concentrada: agua.

#### **4.3.4 Bioensayo**

La técnica de lluvia de *conidia* para inocular áfidos fue modificada con respecto a la mencionada por Papierok y Hajek (1997) y Shah *et al.* (2004). 12 h antes de inocular los áfidos, rodajas de *P. neoaphidis* fueron removidas asépticamente de los márgenes de cultivos en caja Petri usando un sacabocado de 7 mm de diámetro. Tres de estas rodajas con el área del micelio hacia arriba, se colocaron de manera equidistante sobre una capa de 5 mL de agar-agua al 2%, depositada en la base de un vaso de precipitado con capacidad de 50 mL (Figura 19B). Adicionalmente ésta técnica permite llevar a cabo los experimentos con las *conidia* producidas *in situ* (Glare y Milner, 1991; Burges, 1998).

Para uniformizar el tiempo de exposición y número de esporas liberadas por cada uno de los aislamientos, se realizó previamente una prueba de esporulación a  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  y  $95 \pm 2\%$  HR. La descarga consistió en invertir el vaso con las tres rodajas del hongo sobre una caja Petri con un acetato marcado en cuadrantes en la base (Figura 19B). Se dejó esporular al hongo en los dispositivos por un total de 12 h, tomando una muestra cada cuatro horas, con lo que se estimó las diferencias en el número de *conidia* producidas por cada aislamiento y ajustar el tiempo de exposición para uniformizar la cantidad de esporas asperjados en el área de tratamiento.

Para el bioensayo, 80 áfidos ápteros de *Brevicorine brassicae* fueron depositados sobre una caja Petri de 50 mm de diámetro provista de un acetato de iguales dimensiones, marcado y adherido a la caja por medio de una gota de agua. Después de colocar los áfidos en la cámara, un vaso con las rodajas de *P. neoaphidis* en fase de esporulación fue invertido sobre los áfidos (Figura 19B). Cada vaso se rotó  $60^{\circ}$  a diferente intervalo de tiempo, considerando las diferencias de esporulación entre aislamientos, para uniformar la aspersión de *conidia* en el área con los áfidos.

Los áfidos que sirvieron de testigo fueron mantenidos en un dispositivo limpio y sin el hongo, hasta el final del experimento. Después de la inoculación, los pulgones fueron transferidos a hojas de *B. oleracea* de cinco cm. de longitud. La base del pecíolo de las hojas se cubrió con algodón saturado de solución nutritiva y se protegió con papel aluminio para proporcionar la alimentación de la hoja y conservar la textura y turgencia normal (Figura 19C). Se realizaron cuatro repeticiones con 20 pulgones en cada uno de los aislamientos.

Las hojas con los pulgones tratados se colocaron en la parte interna de la tapa de un vaso invertido, de capacidad para 300 ml, en cuya base se colocó 15 mL de agar agua al 2% para proporcionar la humedad y favorecer el desarrollo de *P. neoaphidis* (Figura 19D). Adicionalmente se colocó algodón humedecido para incrementar la humedad relativa a  $95\% \pm 2$ , manteniéndolos a  $20^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  en oscuridad total.

#### **4.3.4.1 Conteo de esporas**

El acetato colocado debajo de los pulgones durante la inoculación fue fijado con azul de algodón (10%) en lactofenol. De cada dispositivo de esporulación, se tomaron cinco muestras con cinco repeticiones de 1mm<sup>2</sup>, iniciando en el centro del acetato y continuando hacia la periferia. Se estimó el número de *conidia* de *P. neoaphidis* en cada aislamiento con la ayuda de un microscopio de luz a 125 aumentos, las *conidia* fueron convertidos a *conidia* por mm<sup>-2</sup>. La concentración única de *conidia* empleada por mm<sup>2</sup> fue; RBA 56 ±4, RBB 69±8, RBF 57 ±3; RBG 61 ±7, RBH 68 ±5, TEXMP1 64 ±4 y TEXRP1 70±5.

Las hojas fueron examinadas a las 48, 120, y 240 h, evaluando el número de áfidos vivos, micosados o muertos por otras causas. La progenie de los áfidos que alcanzaron la madurez, fueron eliminadas para mantener las poblaciones iniciales de 20 individuos.

#### **4.3.4.2 Evaluación de la mortalidad**

La mortalidad atribuida a los aislamientos se verifico con los síntomas y signos reportados para áfidos atacados por *P. neoaphidis* (ver Capítulo 1). Adicionalmente se realizaron preparaciones en laminillas para detectar el desarrollo en el interior del insecto.

Los porcentajes de mortalidad fueron corregidos mediante la fórmula de Abbot (1925) y transformados por arcoseno para ser analizados mediante un diseño en parcelas divididas con comparación de medias Tukey ( $P \leq 0.05$ ), utilizando el paquete estadístico SAS 6.12.

### **4.4 Resultados**

Los datos de mortalidad registrados en tratamientos fueron corregidos mediante la fórmula de Abbot (1925), debido a la mortalidad promedio del testigo de 11%.

La mayor mortalidad se observó a las 240 h y se observaron diferencias estadísticas en los efectos de los aislamientos probados ( $F=151.93$   $gl_1=54$



$g_{12}=2P>0.0001$ ). No hubo diferencias estadísticas entre tratamientos aplicados a las 48 h comparados con el testigo. A las 120 h tampoco se encontraron diferencias entre aislamientos, sin embargo, la mortalidad de éstos fue diferente al testigo (Cuadro 4.1). A excepción del aislamiento RBA, los otros causaron mortalidades superiores al 40% (Figura 18).

A las 240 el aislamiento RBF provocó la mayor mortalidad, seguido de los aislamientos RBA, RBB, RBG y TEXRP1, ocasionando una mortalidad superior al 85% en *B. brassicae*. RBH causó la menor mortalidad de los aislamientos probados con 51.72% (Cuadro 4.1).

Debido a que no se detectaron esporas en el acetato, momificación o síntomas de la enfermedad en el testigo, la mortalidad se atribuyó al manejo del insecto, estimada en un 11%. Este dato fue utilizado como factor de corrección para estimar la mortalidad real de todos los tratamientos.

No hubo diferencias en la mortalidad de los tratamientos y el testigo durante las primeras 48 h, tiempo en el cual se registró la mayor mortalidad en el testigo. A las 120 y 240 h después de la inoculación si se observaron diferencias entre los tratamientos aplicados comparados con el testigo. (Cuadro 4.1, Figura 18).

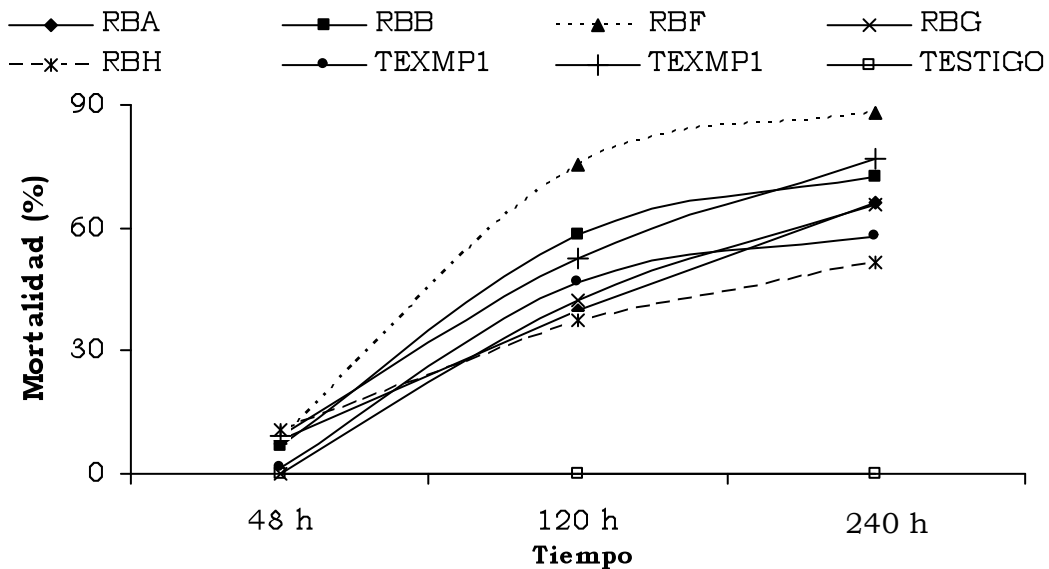
**Cuadro 4.1.** Mortalidad corregida (Abbot, 1925), provocada por los diferentes aislamientos de *P. neoaphidis* a *B. brassicae* a diferentes tiempos de evaluación.

Aislamiento	Tiempo en horas		
	48	120	240
RBA	8.11 ±7.14 <b>a</b>	39.72 ±16.81 <b>a</b>	66.01 ±8.26 <b>b</b>
RBB	6.65 ±5.02 <b>a</b>	58.33 ±16.67 <b>a</b>	72.67 ±10.38 <b>b</b>
RBF	8.51 ±10.31 <b>a</b>	75.56 ±3.95 <b>a</b>	87.86 ±4.49 <b>a</b>
RBG	0.00 ±0.00 <b>a</b>	42.50 ±16.93 <b>a</b>	65.62 ±14.72 <b>b</b>
RBH	10.75 ±9.78 <b>a</b>	37.50 ±31.87 <b>a</b>	51.72 ±15.26 <b>c</b>
TEXMP1	1.32 ±2.63 <b>a</b>	46.94 ±15.19 <b>a</b>	58.07 ±12.72 <b>b</b>
TEXMRP1	9.21 ±18.42 <b>a</b>	52.78 ±25.86 <b>a</b>	76.78 ±9.77 <b>b</b>
TESTIGO	0.00 <b>a</b>	0.00 <b>b</b>	0.00 <b>d</b>

Medias (±DE) dentro de cada columna seguida por una misma letra no representan diferencias estadísticas Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

#### 4.4.1 Insectos enfermos

La infección de *P. neoaphidis* provocó un cambio de coloración en ninfas de II instar de *B. brassicae*, pasando de verde intenso a amarillo-pardo a las 48 h en ninfas de II instar. En instars superiores, éste síntoma, se observó entre las 72 y 96 h. La aparición de cistidios y rizoides, propios de *P. neoaphidis*, se observó a partir de las 96 h (Figura 19E). Con excepción del testigo, todos los insectos muertos iniciaron su esporulación entre las 96 y 144 h (Figura 19F).



**Figura 18.** Porcentaje de mortalidad inducida por siete aislamientos de *P. neoaphidis* en ninfas ápteras de *B. brassicae* en condiciones de laboratorio

### 4.5 Discusiones

#### 4.5.1 Síntomas y signos de la enfermedad

En algunas ninfas de II instar, la esporulación no se presentó, por lo que la presencia del hongo se determinó mediante la detección de micelio en preparaciones en laminillas. Es probable que por las dimensiones del áfido y por la cantidad de inóculo aplicado, ocurrió una competencia por nutrientes, y el patógeno no desarrolló adecuadamente, alterando la producción de *conidia*.

Los insectos muertos en el testigo presentaron una coloración oscura, sin la presencia de estructuras de ningún tipo de hongo.

Los insectos sanos permanecieron junto con los enfermos, al parecer *P. neoaphidis* no induce la liberación de feromonas de alarma, manteniendo unida la colonia, lo que favorece la transmisión horizontal del patógeno. Roy *et al.* (2006), mencionan que los áfidos atacados por *P. neoaphidis*, son incapaces de responder a feromonas de alarma y son presas fáciles a depredadores.

Insectos con síntomas de enfermedad presentaron movimientos descoordinados, con algunos lapsos de temblor en los apéndices locomotores y ocasionalmente en antenas. Los síntomas fueron acompañados por un cambio de coloración, siempre hacia tonalidades amarillentas. A las 96h aparecieron los rizoides como lo menciona Pell *et al.* (2001), los cuales fijaron firmemente el insecto muerto al substrato (Figura 19E), y posteriormente aparecieron los cistidios y conidióforos (Hatting *et al.*, 1999, Kalkar, 2005), dando al insecto una apariencia “cristalizada”, evento previo a la esporulación (96-144 h).

#### **4.5.2 Mortalidad provocada por *P. neoaphidis***

La susceptibilidad de ninfas y adultos de *B. brassicae* a *P. neoaphidis* fue demostrada. Los primeros individuos en morir fueron los de ninfa II y posteriormente los instar superiores. Se conoce que en otras especies de áfidos *P. neoaphidis* provoca mayor mortalidad en los primeros estadios ninfales , y más en adultos alados que en los ápteros (Milner, 1982; Glare y Milner, 1991; Nielsen y Hajek, 2005; Steinkraus, 2006). Esta característica de invasión puede estar relacionada con algunos aspectos morfológicos y biológicos del insecto, como son la presencia de una capa cerosa, el grosor de la cutícula de *B. brassicae*, que aumentan con la edad, además de las defensas internas del organismo.

Sin embargo se considera que el aspecto mas relevante lo constituye la relación inóculo-biomasa, esta relación es mayor en las ninfas más pequeñas de *B. brassicae*.

La mortalidad observada a las 48 h en algunas ninfas II de *B. brassicae*, se presenta por debajo del tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>), estimado en 3.4 días a 20°C (Si ev, 1994), pero el mayor número de insectos muertos en todos los aislamientos se registro entre las 120 y 144 h, concordando con los reportes de Nielsen *et al.* (2001), Roy *et al.* (2006) (Cuadro 4.1). En éste mismo período, los aislamientos RBF, RBB y TEXRP1 presentan las mortalidades más elevadas (todas superiores al 70%) y a pesar de ello, no existieron diferencias estadísticas respecto al resto de los aislamientos, como TEXRP1 y RBH que no alcanzaron el 60%. Aún así, la mortalidad provocada por los diferentes aislamientos de *P. neoaphidis* en *B. brassicae* se considera aceptable.

La mortalidad a las 240 h se favoreció con la transmisión horizontal provocada por la esporulación de los primeros áfidos muertos a las 120h (Figura 19F). Wilding (1970) menciona que *P. neoaphidis* tarda cinco días en provocar la muerte en áfidos a 20°C. Se calcula que por cada áfido en etapa de esporulación, dependiendo del tamaño, se producen de  $1.3 \times 10^4$  a  $2.14 \times 10^5$  esporas por insecto (Hemmati, 1999), lo que incrementa la cantidad de inóculo en los dispositivos de incubación (Figura 19D y F). Es probable que la infección de *P. neoaphidis* sobre *B. brassicae* culminara en la mortalidad total de los insectos en los dispositivos de hoja pequeña (Figura 19D), debido a la actividad de las *conidia* primaria, secundarias o de posterior generación de *P. neoaphidis*. Lo anterior considerando que los dispositivos en hojas pequeñas de brócoli (Figura 19C) soportaron perfectamente las poblaciones de pulgón por más de 20 días sin perder la turgencia y vigor, asegurando la infección de los insectos sin provocar mortalidad por inanición.

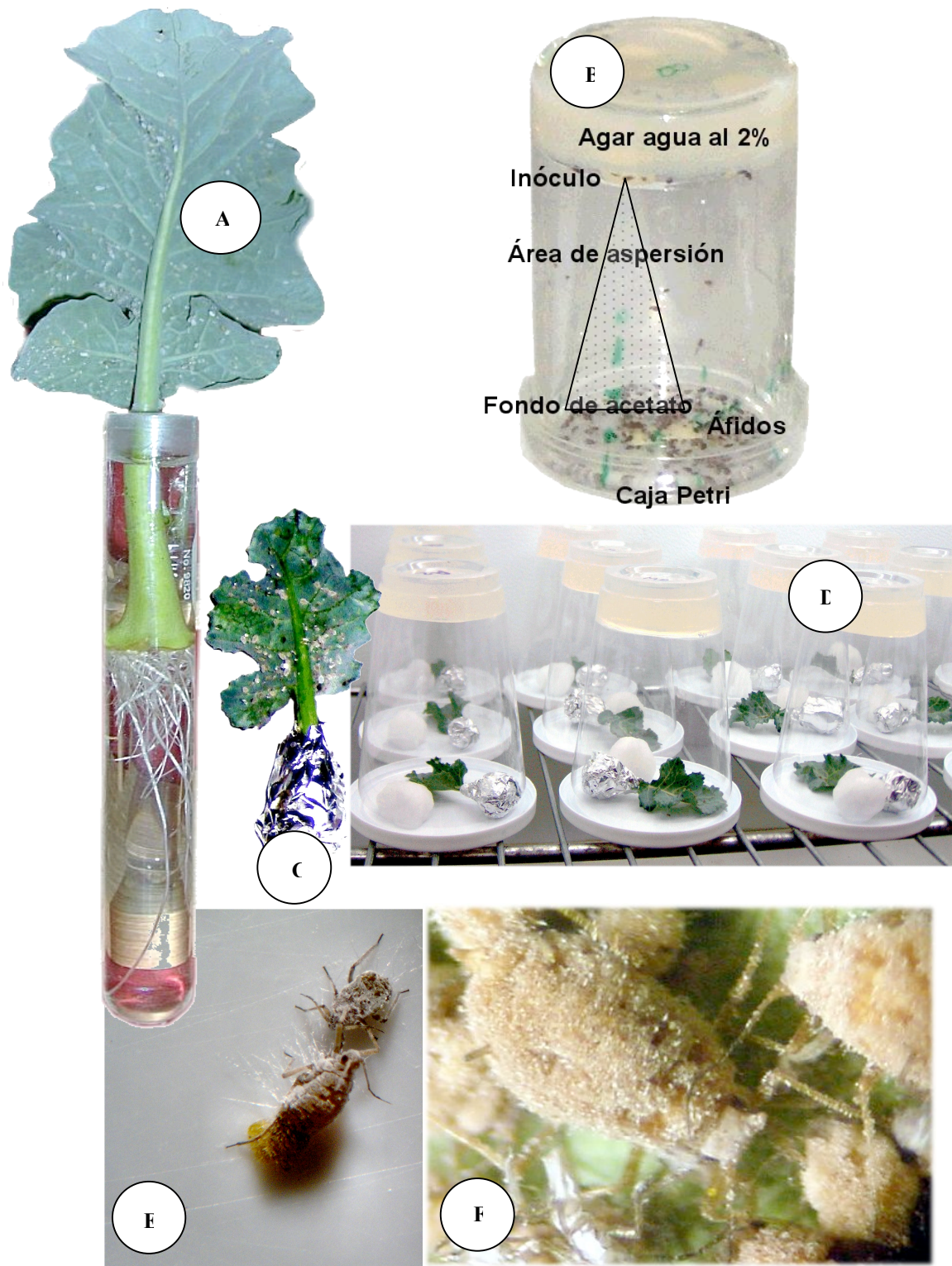
Aún no se logra desarrollar una formulación adecuada de cuerpos hifales y/o esporas, que permita un uso a nivel comercial de *P. neoaphidis*. En tales circunstancias, la conservación de reservorios de hospederos o las aplicaciones inoculativas, podrían fomentar el desarrollo y/o magnificación de epizootias en campo, debido a la alta capacidad de *P. neoaphidis* para provocar infecciones en áfidos, así como su eficiente dispersión en campo (Elliot *et al.*, 2000; Shah *et al.*, 2000; Pell *et al.*, 2001).

#### **4.6 Conclusiones**

Los aislamientos de *P. neoaphidis* producen alta mortalidad sobre *B. brassicae*.

El aislamiento que provocó la mayor mortalidad fue RBF y el de menor mortalidad RBH, ambos de Tamaulipas.

*P. neoaphidis* presenta alto potencial para el control biológico de *B. brassicae*



**Figura 19. Patogenicidad de *P. neoaphidis* sobre *B. brassicae*.** **19A.** Dispositivos para la cría de *Brevicoryne brassicae* en hoja de brócoli *Brassica oleracea* var *itálica*; **19B.** Dispositivo para la aspersión de conidia de *P. neoaphidis*; **19C.** Dispositivo en hoja de brócoli *B. oleracea* var *itálica* para el seguimiento de *B. brassicae* después de la esporulación; **19D.** Dispositivo de incubación de *P. neoaphidis* en *B. brassicae*; **19E.** Rizoides de *P. neoaphidis* surgiendo de la región ventral de *B. brassicae* y **19F.** Esporulación de *P. neoaphidis* sobre *B. brassicae*.

#### 4.7 Literatura citada.

- Abbot, W. S. 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Economic Entomology* 18: 265-267.
- Burges, H. D. 1998.** Formulation of Mycoinsecticides. pp.132-185. *In:* Burges, H. D. (ed.) *Formulation of Microbial Biopesticides*. Kluwer Academic Publisher.
- Ekese, S., P. A. Shah, S. J. Clark and J. K. Pell. 2005.** Conservation Biological control with the fungal pathogen *Pandora neoaphidis*: implications of aphid species, host plant and predator foraging. *Agricultural and Forest Entomology*. 7: 21-30.
- Elliot, S. M., M. W. Sabelis, A. Janssen, L. P. S. van der Geest, E. A. M. Beerling and J. Franssen. 2000.** Can plants use entomopathogens as bodyguards. *Ecology letters* 3: 228-235.
- Ferron, P. 1978.** Biological control of insects pests by entomogenous fungi. *Ann. Rev. Entomol.* 23: 409-442
- Glare, T. R. and R. J. Milner. 1991.** Ecology of entomopathogenic fungi. *In:* Aurora, D.K., L. Ajello & K. G., Mukerji (eds). *Handbook of Applied Mycology. Human, Animals and Insects*. Marcel Dekker, New York. (2):547-612.
- Hatting L., H., R. A. Humber, T. J. Poprawski and R. M. Miller. 1999.** A survey fungal pathogens of aphids from South Africa, with special reference to cereal aphid. *Biological Control* 16:1-12
- Hemmati, F. 1999.** Aerial dispersal of entomopathogenic fungus *Erynia neoaphidis*. PhD thesis, University of Reading, UK, 186 p.
- Kalkar, Ö. 2005.** A SEM Study of The Sporulation Process of *Pandora neoaphidis* and *Neozygites fresenii*. *Turk J. Biol. Turkey*. 29:137-147.
- López H., A. 1990.** Dinámica poblacional de *Brevicoryne brassicae* (L.) (Homoptera: Aphididae) en brócoli en Chapingo, México. Tesis de licenciatura. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Texcoco. Méx. 82 p.

- Milner, R. J. 1982.** On the occurrence of pea aphids *Acyrtosiphon pisum*, resistant to isolates of the fungal pathogens *Erynia neoaphidis*. *Entomologia experimentalis et applicata* 37: 235-240.
- Nielsen, C, J. Eilenberg and K. Dromph. 2001.** Entomophthorales on Cereal Aphids. The Royal Veterinary and Agricultural University. Department of Ecology. Denmark. 70 pp.
- Nielsen, C. and A. E. Hajek. 2005.** Control of invasive soybean aphid, *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae), populations by existing natural enemies in New York State, with emphasis on Entomopathogenic Fungi. *Environmental Entomology*. 34 (5): 1036-1047.
- Papierok B. and A. E. Hajek. 1997.** Fungi: Entomophthorales. pp 187-212. *In*: Lacey Lawrence A. (eds.). *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press. New York.
- Pell, J. K., J. Eilenberg, A. E. Hajek and D. C. Steinkraus. 2001.** Biology, Ecology and Pest Management Potencial of Entomophthorales. pp. 71- 153. *In*: T.M. Butt, C.W. Jackson and N. Magan (eds). *Fungi as Biocontrol Agents, Progress, Problems and Potencial*. CABI Publishing.
- Roy, H. E., D. C. Steinkraus, J. Eilenberg, A. E. Hajek and J. K. Pell. 2006.** Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic fungi and their Athropod hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 331-357.
- Shah, P. A., S. J. Clarck J. K. Pell. 2004.** Assessment of aphid host range and isolate variability in *Pandora neoaphidis* (Zygomycetes: Entomophthorales). *Biological Control*. 29: 90-99.
- Shah, P. A., M. Abei and U. Tuor. 2000.** Impact of *Macrosihum euphorbia* eith micelial preparations of *Erynia neoaphidis* in greenhouse trial. *Mycol. Res.* 104 (6) 645-652).
- Si ev, I. 1994.** The Chararacteristics of the entomopathogenus fungus *Pandora neoaphidis* (in Serbo-croatian) *Zastita Bilija*. 45: 195-202.
- Steinkraus, D. C. 2006.** Factors affecting transmission of fungal pathogens of aphids. *J. Invertebr. Pathol.* 92:127-131.



**Tanada, Y. and H. K. Kaya. 1993.** Insect Pathology. Academic Press Inc. p 595-622.

**Wilding, N. 1970.** The effect of temperatura on the infectivity and incubation periods of the fungi *Entomophtora aphidis* and. *E. thaxteriana* for the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. Proc. Int. Colloq. Invertebr. Pathol. College Park, M. pp. 84-88.

**Wilding, N. and P. J. Brobyn. 1980.** Effects of fungicides on development of *Entomophthora aphidis*. Trans. Br. Mycol. Soc. 75:297-302.

## CONCLUSIÓN GENERAL

El agente causal responsable de epizootias sobre los áfidos *B. brassicae*, *R. maidis* y *M. persicae*, de los cultivos de canola y sorgo del norte de Tamaulipas, México, fue el hongo entomopatógeno *P. neoaphidis*. Este hongo causó mortalidad superior al 50% en *R. maidis* y hasta un 90% en *B. brassicae*.

Las condiciones propicias para el desarrollo de *P. neoaphidis* en la región se encuentran durante los meses de marzo y abril, cuando se presentan períodos de temperatura entre 15 y 20° C, con HR superiores al 90% y existen infestaciones de áfidos en los cultivos.

La germinación, desarrollo y esporulación de *P. neoaphidis* son afectados por la temperatura. Los umbrales para estas funciones se ubican entre los 15 °C y 25 °C, con óptimo entre 19 °C y 20 °C, con inhibición de todo desarrollo a 30 °C. El mejor aislamiento en crecimiento radial y esporulación fue RBB de Tamaulipas. El crecimiento radial en medio de cultivo SEMA, puede ser explicado mediante el Modelo Logístico, y el de esporulación mediante los Modelos de Weibull y Logístico.

El 90 % de la germinación de las *conidia* primarias de *P. neoaphidis* se produce a las ocho horas de incubación entre 15 y 20 °C. La formación de un tubo germinativo por la parte lateral de la *conidia* conducirá a la formación de una espora, mientras que la realizada por los extremos producen tubos germinativos. Los tubos germinativos de éste patógeno pueden alcanzar 280 de longitud, observando la formación de celdas que empujan el contenido citoplasmático hacia delante y lo separan mediante septos que impiden que el material regrese.

*P. neoaphidis* puede producir al menos cuatro generaciones de *conidia* a partir de una primaria. Las *conidia* de *P. neoaphidis* tienden a disminuir mas su longitud que su ancho de una generación a otra.

Los aislamientos de *P. neoaphidis* presentaron alta virulencia contra *B. brassicae*, siendo el aislamiento RBF el más virulento estadísticamente.

El presente estudio constituye el primer reporte en México sobre las condiciones para el desarrollo de *P. neoaphidis* en campo y laboratorio.

# **APÉNDICE**

## APÉNDICE

**Cuadro A-1.** Crecimiento radial acumulado de micelio de diferentes aislamientos de *P. neoaphidis* a diferentes temperaturas Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Aislamiento	Temperatura ( $\pm$ DE)									
	10° C		15° C		20° C		25° C		30° C	
RB <b>ac</b>	2.36	$\pm 0.61$	22.54	$\pm 2.90$	37.30	$\pm 3.99$	6.16	$\pm 1.78$	0	
RBB <b>a</b>	4.30	$\pm 1.07$	31.25	$\pm 6.45$	37.57	$\pm 2.42$	4.02	$\pm 1.57$	0	
RBF <b>ab</b>	1.24	$\pm 0.57$	23.50	$\pm 6.66$	50.25	$\pm 3.35$	9.78	$\pm 1.99$	0	
RBG <b>cd</b>	3.37	$\pm 0.71$	27.72	$\pm 5.16$	28.64	$\pm 3.65$	5.87	$\pm 2.81$	0	
RBH <b>e</b>	1.41	$\pm 0.54$	14.49	$\pm 2.62$	23.7	$\pm 4.49$	3.61	$\pm 0.66$	0	
TEXMP1 <b>de</b>	1.33	$\pm 0.32$	21.48	$\pm 3.91$	27.89	$\pm 0.82$	4.29	$\pm 0.61$	0	
TEXRP1 <b>bc</b>	2.01	$\pm 0.34$	28.53	$\pm 10.13$	46.89	$\pm 3.93$	3.48	$\pm 2.22$	0	

**Cuadro A-2** Combinación temperatura-aislamiento de crecimiento radial de los diferentes aislamientos de *P. neoaphidis* Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Aislamiento	Media	$P \leq 0.05$
RBF 20° C	49.18	a
TEXRP1 20° C	45.223	b
RBB 20° C	37.57	c
RBA 20° C	37.303	d
RBB 15° C	31.258	e
RBG 20° C	29.443	f
TEXRP1 15° C	28.53	f
TEXMP1 20° C	27.78	f
RBG 15° C	27.725	f
RBF 25° C	25.035	g
RBH 20° C	23.7	g
RBF 15° C	23.508	g
RBA 15° C	22.545	h
TEXMP1 15° C	21.485	h
RBA 25° C	16.813	h
RBH 15° C	14.493	i
RBG 25° C	14.003	i
RBB 25° C	12.528	j
TEXMP1 25° C	11.595	k
RBH 25° C	9.933	l
TEXRP1 25° C	8.72	m
RBB 10° C	4.308	m
RBG 10° C	3.375	m
RBA 10° C	2.363	m
TEXRP1 10° C	2.013	m
RBH 10° C	1.413	m
TEXMP1 10° C	1.333	m
RBF 10° C	1.243	m
RBA 30° C	0	m
TEXMP1 30° C	0	m
TEXRP1 30° C	0	m
RBB 30° C	0	m
RBA 30° C	0	m
RBG 30° C	0	m
RBH 30° C	0	m
RBF 30° C	0	m

Letras iguales no representan diferencias estadísticas.

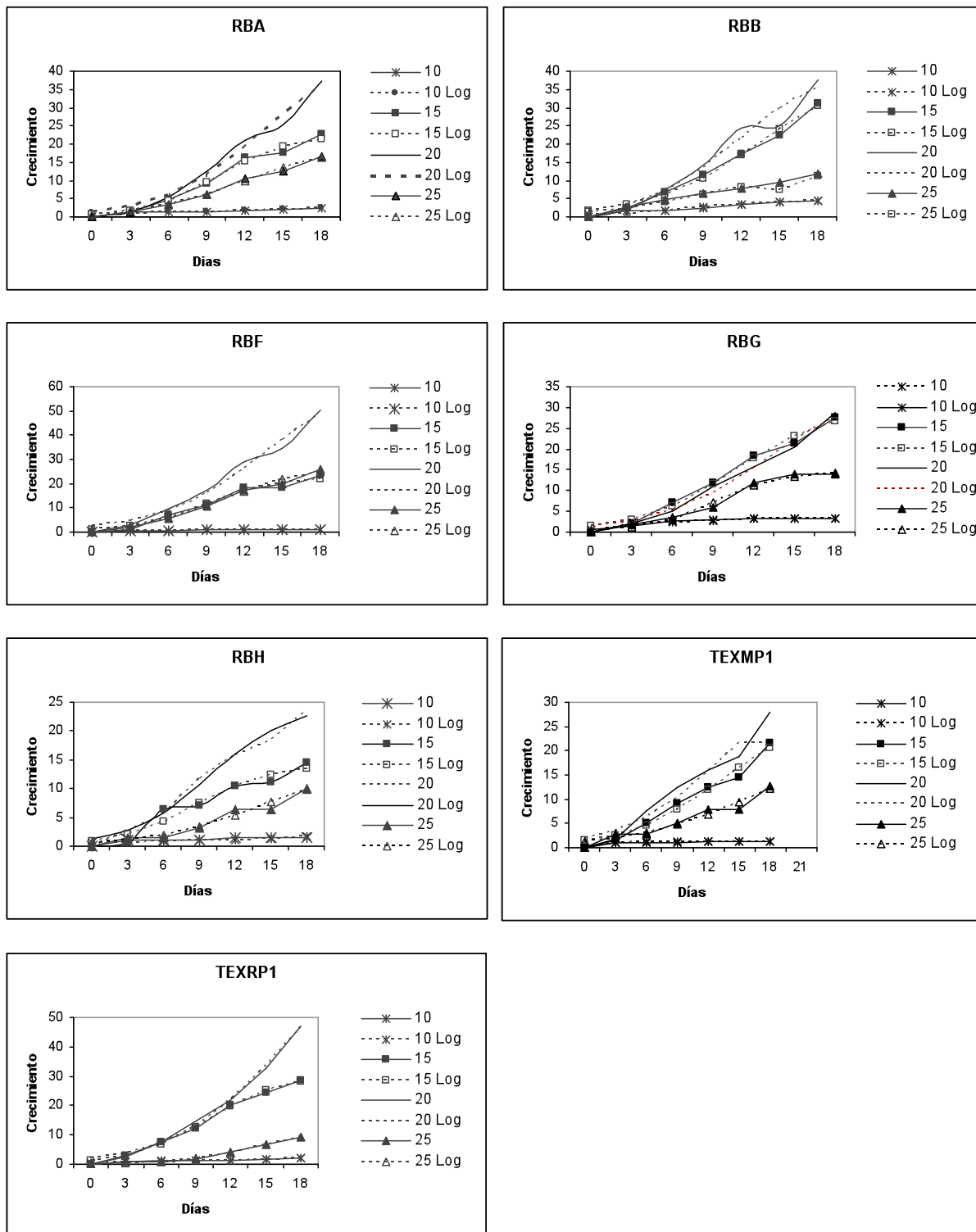
**Cuadro A-3.** Medias de la relación longitud y grosor de *conidia* primaria de *Pandora neoaphidis* a diferentes temperaturas Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Aislamiento		Largo $\pm$ DE		Ancho $\pm$ DE		Relación L/A $\pm$ DE	
RBA 10°	<b>a</b>	26.87 $\pm$ 2.27	<b>a</b>	12.83 $\pm$ 0.89	<b>a</b>	2.10 $\pm$ 0.22	<b>a</b>
RBA 15°	<b>a</b>	25.65 $\pm$ 2.16	<b>a</b>	13.04 $\pm$ 1.32	<b>a</b>	1.98 $\pm$ 0.22	<b>a</b>
RBA 20°	<b>a</b>	26.75 $\pm$ 2.94	<b>a</b>	13.03 $\pm$ 1.53	<b>a</b>	2.07 $\pm$ 0.22	<b>a</b>
RBA 25°	<b>a</b>	25.71 $\pm$ 3.50	<b>a</b>	12.23 $\pm$ 1.28	<b>a</b>	2.11 $\pm$ 0.27	<b>a</b>
RBB 10°	<b>a</b>	21.97 $\pm$ 2.45	<b>a</b>	15.09 $\pm$ 1.15	<b>a</b>	1.46 $\pm$ 0.16	<b>a</b>
RBB 15°	<b>a</b>	23.52 $\pm$ 2.89	<b>a</b>	16.06 $\pm$ 1.93	<b>a</b>	1.47 $\pm$ 0.15	<b>a</b>
RBB 20°	<b>b</b>	20.21 $\pm$ 3.22	<b>b</b>	15.15 $\pm$ 1.50	<b>a</b>	1.33 $\pm$ 0.15	<b>a</b>
RBB 25°	<b>b</b>	19.40 $\pm$ 3.22	<b>b</b>	14.79 $\pm$ 1.83	<b>a</b>	1.33 $\pm$ 0.26	<b>a</b>
RBF 10°	<b>a</b>	27.07 $\pm$ 2.53	<b>a</b>	13.22 $\pm$ 1.46	<b>a</b>	2.06 $\pm$ 0.17	<b>a</b>
RBF 15°	<b>a</b>	27.00 $\pm$ 1.88	<b>a</b>	13.15 $\pm$ 1.34	<b>b</b>	2.07 $\pm$ 0.20	<b>a</b>
RBF 20°	<b>b</b>	24.28 $\pm$ 3.32	<b>b</b>	11.73 $\pm$ 0.74	<b>b</b>	2.07 $\pm$ 0.29	<b>a</b>
RBF 25°	<b>a</b>	26.38 $\pm$ 3.37	<b>a</b>	12.42 $\pm$ 1.37	<b>b</b>	2.14 $\pm$ 0.28	<b>a</b>
RBG 10°	<b>a</b>	29.86 $\pm$ 1.85	<b>a</b>	12.48 $\pm$ 1.30	<b>a</b>	2.42 $\pm$ 0.26	<b>a</b>
RBG 15°	<b>b</b>	26.22 $\pm$ 1.96	<b>b</b>	13.71 $\pm$ 0.79	<b>a</b>	1.92 $\pm$ 0.18	<b>a</b>
RBG 20°	<b>b</b>	25.86 $\pm$ 3.64	<b>b</b>	13.43 $\pm$ 1.55	<b>a</b>	1.93 $\pm$ 0.23	<b>a</b>
RBG 25°	<b>b</b>	26.46 $\pm$ 2.82	<b>b</b>	11.02 $\pm$ 1.23	<b>b</b>	2.42 $\pm$ 0.33	<b>a</b>
RBH 10°	<b>a</b>	23.87 $\pm$ 2.18	<b>a</b>	14.96 $\pm$ 1.82	<b>a</b>	1.60 $\pm$ 0.13	<b>a</b>
RBH 15°	<b>a</b>	24.29 $\pm$ 2.89	<b>a</b>	14.84 $\pm$ 1.80	<b>a</b>	1.64 $\pm$ 0.16	<b>a</b>
RBH 20°	<b>a</b>	23.80 $\pm$ 1.96	<b>a</b>	15.88 $\pm$ 1.73	<b>a</b>	1.51 $\pm$ 0.15	<b>a</b>
RBH 25°	<b>a</b>	24.73 $\pm$ 2.91	<b>a</b>	14.40 $\pm$ 1.33	<b>a</b>	1.72 $\pm$ 0.18	<b>a</b>
TEXMP1 10°	<b>b</b>	27.11 $\pm$ 2.20	<b>b</b>	13.37 $\pm$ 1.39	<b>a</b>	2.04 $\pm$ 0.23	<b>a</b>
TEXMP1 15°	<b>a</b>	27.90 $\pm$ 2.40	<b>a</b>	13.89 $\pm$ 1.56	<b>a</b>	2.02 $\pm$ 0.18	<b>a</b>
TEXMP1 20°	<b>c</b>	25.11 $\pm$ 2.58	<b>c</b>	13.20 $\pm$ 1.46	<b>a</b>	1.32 $\pm$ 0.20	<b>a</b>
TEXMP1 25°	<b>c</b>	25.84 $\pm$ 3.10	<b>c</b>	13.36 $\pm$ 1.25	<b>a</b>	1.94 $\pm$ 0.21	<b>a</b>
TEXRP1 10°	<b>a</b>	28.09 $\pm$ 2.18	<b>a</b>	14.27 $\pm$ 1.24	<b>a</b>	1.98 $\pm$ 0.23	<b>a</b>
TEXRP1 15°	<b>a</b>	27.75 $\pm$ 2.97	<b>a</b>	13.41 $\pm$ 1.14	<b>a</b>	2.08 $\pm$ 0.23	<b>a</b>
TEXRP1 20°	<b>b</b>	25.25 $\pm$ 2.04	<b>b</b>	12.10 $\pm$ 0.78	<b>b</b>	2.09 $\pm$ 0.21	<b>a</b>
TEXRP1 25°	<b>b</b>	25.87 $\pm$ 2.35	<b>b</b>	13.56 $\pm$ 1.17	<b>a</b>	1.92 $\pm$ 0.22	<b>a</b>

Letras iguales en cada aislamiento dentro de las columnas, no representan diferencias estadísticas

**Cuadro A-4** Porcentaje de germinación de *conidia* primarias de *P. neoaphidis* a las 24 horas a diferentes temperaturas.

Aislamiento-temperatura		Tiempo ( $\pm$ DE)		
<b>10° C</b>	<b>2h</b>	<b>4h</b>	<b>8h</b>	<b>24h</b>
RBA	0.00 $\pm$ 0	0.00 $\pm$ 0	18.75 $\pm$ 5.38	92.00 $\pm$ 9.80
RBB	1.00 $\pm$ 1.41	9.50 $\pm$ 3.42	42.00 $\pm$ 7.07	95.75 $\pm$ 3.50
RBF	0.00 $\pm$ 0	2.50 $\pm$ 3.32	31.75 $\pm$ 12.26	93.75 $\pm$ 4.86
RBG	0.00 $\pm$ 0	0.00 $\pm$ 0	5.50 $\pm$ 3.79	78.00 $\pm$ 10.61
RBH	0.00 $\pm$ 0	0.00 $\pm$ 0	8.75 $\pm$ 4.99	77.25 $\pm$ 7.76
TEXMP1	0.00 $\pm$ 0	1.00 $\pm$ 0.19	1.89 $\pm$ 0.36	6.78 $\pm$ 1.28
TEXRP1	0.00 $\pm$ 0	0.00 $\pm$ 0	1.25 $\pm$ 1.89	69.75 $\pm$ 13.72
<b>15° C</b>				
RBA	1.25 $\pm$ 1.89	65.00 $\pm$ 8.83	83.75 $\pm$ 14.10	97.75 $\pm$ 2.22
RBB	0.50 $\pm$ 1.00	42.25 $\pm$ 11.50	93.00 $\pm$ 4.97	99.25 $\pm$ 1.50
RBF	5.00 $\pm$ 2.16	83.00 $\pm$ 9.90	95.25 $\pm$ 3.77	99.25 $\pm$ 0.96
RBG	6.00 $\pm$ 4.08	38.25 $\pm$ 14.17	86.75 $\pm$ 6.50	100.00 $\pm$ 0.00
RBH	0.25 $\pm$ 0.50	49.50 $\pm$ 7.94	94.50 $\pm$ 3.87	100.00 $\pm$ 0.00
TEXMP1	0.75 $\pm$ 1.50	70.75 $\pm$ 11.53	93.25 $\pm$ 3.10	99.50 $\pm$ 1.00
TEXRP1	1.75 $\pm$ 0.96	79.75 $\pm$ 11.53	92.25 $\pm$ 5.44	100.00 $\pm$ 0.00
<b>20° C</b>				
RBA	10.50 $\pm$ 4.80	44.75 $\pm$ 10.34	82.50 $\pm$ 9.81	98.00 $\pm$ 2.45
RBB	12.00 $\pm$ 4.97	48.75 $\pm$ 8.73	94.25 $\pm$ 5.44	100.00 $\pm$ 0
RBF	3.00 $\pm$ 2.58	30.00 $\pm$ 4.32	91.50 $\pm$ 6.19	98.75 $\pm$ 1.50
RBG	7.50 $\pm$ 2.38	87.75 $\pm$ 8.62	95.50 $\pm$ 4.80	99.50 $\pm$ 1.00
RBH	1.50 $\pm$ 1.29	24.50 $\pm$ 5.45	98.75 $\pm$ 1.50	100.00 $\pm$ 0
TEXMP1	1.25 $\pm$ 0.96	31.75 $\pm$ 9.91	71.25 $\pm$ 8.06	100.00 $\pm$ 0
TEXRP1	2.50 $\pm$ 3.79	65.75 $\pm$ 12.95	93.75 $\pm$ 8.10	100.00 $\pm$ 0
<b>25° C</b>				
RBA	0.75 $\pm$ 1.00	12.25 $\pm$ 9.07	24.75 $\pm$ 10.24	39.75 $\pm$ 10.05
RBB	0.00 $\pm$ 0	17.50 $\pm$ 9.76	31.25 $\pm$ 12.44	40.25 $\pm$ 9.47
RBF	0.00 $\pm$ 0	11.00 $\pm$ 4.97	27.75 $\pm$ 6.60	49.50 $\pm$ 5.20
RBG	0.50 $\pm$ 0.58	7.50 $\pm$ 4.65	26.75 $\pm$ 6.70	45.50 $\pm$ 6.45
RBH	0.00 $\pm$ 0	5.00 $\pm$ 2.94	16.75 $\pm$ 3.50	25.25 $\pm$ 2.22
TEXMP1	0.00 $\pm$ 0	25.75 $\pm$ 8.77	34.75 $\pm$ 9.29	76.25 $\pm$ 6.29
TEXRP1	0.00 $\pm$ 0	10.50 $\pm$ 4.80	35.00 $\pm$ 7.16	47.00 $\pm$ 7.07



**Figura A-5.** Comparación del crecimiento radial de micelio de diferentes aislamientos de *P. neoaphidis* con el Modelo Logístico a distintas temperaturas.