

**Efecto de la presencia del hongo  
entomopatógeno *Isaria fumosorosea* en el  
consumo de la batata aérea por *Lilioceris  
cheni* (Coleoptera: Chrysomelidae)**

**Erika Esmeralda Lovo Zelaya**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2018

ZAMORANO  
CARRERA DE AMBIENTE Y DESARROLLO

**Efecto de la presencia del hongo  
entomopatógeno *Isaria fumosorosea* en el  
consumo de la batata aérea por *Lilioceris  
cheni* (Coleoptera: Chrysomelidae)**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniera en Ambiente y Desarrollo en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Erika Esmeralda Lovo Zelaya**

**Zamorano, Honduras**

Noviembre, 2018

## **Efecto de la presencia del hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* en el consumo de la batata aérea por *Lilioceris cheni* (Coleoptera: Chrysomelidae)**

**Erika Esmeralda Lovo Zelaya**

**Resumen.** La batata aérea, *Dioscorea bulbifera* L. (Dioscoreales: Dioscoreaceae), originaria de Asia y África, es una planta invasora en el Estado de Florida, Estados Unidos, donde está siendo controlada por su enemigo natural específico *Lilioceris cheni* Gressitt y Kimoto (Coleoptera: Chrysomelidae). Se evaluó el efecto en *L. cheni* de un factor biótico, el hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* Wize, que es comúnmente aplicado en áreas agrícolas de Florida y podría ser llevado por acción del viento y la lluvia hasta zonas donde se encuentra *L. cheni* como controlador biológico. Se prepararon cinco tratamientos con diferentes concentraciones de esporas de *I. fumosorosea* (0, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> y 10<sup>6</sup> esporas/mL). Se realizó el experimento con un diseño completamente al azar durante 22 días en dos ensayos, alimentando a los escarabajos adultos del biotipo nepalés con hojas de *D. bulbifera* asperjadas con una suspensión de cada tratamiento. Se colectaron las hojas cada tres días y se calculó el área foliar consumida por medio del software ImageJ, a la vez que se notó la mortalidad y micosis de *L. cheni*. Aunque se observó una tendencia a la reducción del consumo a medida que aumentaba la concentración de esporas, la presencia de *I. fumosorosea* no afectó significativamente el consumo por parte de *L. cheni*. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para las variables longevidad, tasa de mortalidad y tasa de micosis, por lo que se infiere que el hongo *I. fumosorosea* no tiene ningún efecto adverso sobre los adultos de *L. cheni*.

**Palabras clave:** Control biológico, ImageJ, planta invasiva, tasa de consumo, tasa de mortalidad.

**Abstract.** The air potato, *Dioscorea bulbifera* L. (Dioscoreales: Dioscoreaceae), originally from Asia and Africa, is an invasive plant in Florida, USA, where it is controlled by its specific natural enemy *Lilioceris cheni* Gressitt and Kimoto (Coleoptera: Chrysomelidae). The effect on *L. cheni* by a biotic factor, the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* Wize that is commonly applied in agricultural areas of Florida and could be transported by wind and rain to areas where *L. cheni* is found as biological control, was evaluated. Five treatments with different concentrations of *I. fumosorosea* spores (0, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, and 10<sup>6</sup> spores/mL). Two experimental trials were conducted with a randomized block design during 22 days in which Nepalese biotype adult beetles were fed leaves of *D. bulbifera* sprayed with a suspension of one of the treatments. The leaves were collected every three days, the consumed leaf area was measured by ImageJ software, and mortality and mycosis were noted. Although there was a tendency to reduce consumption as the concentration of spores increased, the presence of *I. fumosorosea* did not significantly affect consumption by *L. cheni*. Significant differences among treatments were not detected for longevity, mortality rate, or rate of mycosis. Thus, the fungus *I. fumosorosea* appears to have no adverse effect on adult *L. cheni*.

**Key words:** Biological control, consumption rate, ImageJ, invasive plant, mortality rate.

## CONTENIDO

Portadilla .....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos .....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. METODOLOGÍA.....</b>	<b>4</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>16</b>
<b>5. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>17</b>
<b>6. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>18</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>21</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Análisis de varianza de los datos de consumo de los ensayos 1 y 2.....	9
2. Porcentajes de mortalidad corregida de <i>Lilioceris cheni</i> por tratamiento según la fórmula de Abbott bajo condiciones de laboratorio.....	13
Figuras	Página
1. <i>Lilioceris cheni</i> biotipo nepalés (A) y <i>Lilioceris cheni</i> biotipo chino (B).....	2
2. Plantas de <i>Dioscorea bulbifera</i> en invernadero de la Universidad de Florida.	4
3. Suspensiones de <i>Isaria fumosorosea</i> (A); hojas de <i>D. bulbifera</i> rociadas con <i>Isaria fumosorosea</i> (B).....	5
4. Arreglo de las unidades experimentales y tratamientos al azar en cámara de crecimiento.....	6
5. Proceso de medición del área de las hojas en “ImageJ”.....	7
6. Esterilización superficial (A); <i>Lilioceris cheni</i> muerto en cámara de crecimiento (B).....	8
7. Comparación del consumo total promedio (con error estándar) de hojas de <i>Dioscorea bulbifera</i> por adultos de <i>Lilioceris cheni</i> en dos ensayos con 5 tratamientos de <i>Isaria fumosorosea</i> .....	10
8. Consumo de hojas de <i>Dioscorea bulbifera</i> por <i>Lilioceris cheni</i> con cinco diferentes tratamientos de <i>Isaria fumosorosea</i> durante 22 días.....	11
9. Consumo total promedio (con error estándar) por adultos de <i>Lilioceris cheni</i> de los ensayos 1 y 2 por cada tratamiento.....	12
10. <i>Lilioceris cheni</i> infectado por <i>Isaria fumosorosea</i> (A); esporas en los élitros de <i>Lilioceris cheni</i> (B).....	13
11. Comportamiento de consumo de <i>L. cheni</i> que presentó micosis por <i>I. fumosorosea</i> .....	14
12. Comparación de la longevidad promedio (con error estándar) por adultos de <i>Lilioceris cheni</i> expuestos a las esporas de <i>Isaria fumosorosea</i> de los dos ensayos.....	15
13. Longevidad de <i>Lilioceris cheni</i> (con error estándar) durante el experimento según tres edades iniciales.....	15

Anexos	Página
1. Etiqueta de PFR-97 <sup>TM</sup> 20% WDG.....	21
2. Cálculos de volumen de suspensiones para el ensayo 1.....	22
3. Cálculos de volumen de suspensiones para el ensayo 2.....	22
4. Resultados de ANDEVA para el consumo total entre tratamientos.....	23
5. Resultados de ANDEVA para los datos de consumo total del ensayo 2 por las edades al inicio del ensayo.....	23
6. Resultados de Chi cuadrado para micosis entre tratamientos. ....	23
7. Resultados de ANDEVA para la longevidad entre tratamientos.....	24

## 1. INTRODUCCIÓN

La batata aérea, *Dioscorea bulbifera* L. (Dioscoreales: Dioscoreaceae), es una especie invasiva en el Estado de Florida, Estados Unidos. Es una planta herbácea perenne que llega a medir cerca de 20 metros de altura o más, permitiéndole escalar sobre otros árboles e impidiendo que a estos les lleguen los rayos solares, por lo que se sofocan y mueren. *D. bulbifera* tiene orígenes tanto africanos como asiáticos, y recientemente se descubrió evidencia molecular que la planta presente en Florida es originaria de China (Croxtton, Andreu, Williams, Overholt y Smith, 2011).

La propagación vegetativa de *D. bulbifera* se da principalmente por medio de tubérculos aéreos, conocidos como “batatas”. Dichos tubérculos o bulbos aéreos se forman en las axilas de las hojas al finalizar el verano. Estos bulbos pueden llegar a pesar más de un kilogramo, y caen al suelo cuando las vides de la planta mueren en los meses más fríos. Las vides vuelven a brotar en el otoño desde los tubérculos subterráneos o desde los bulbos que se encuentran en el suelo (Center, Overholt, Rohrig y Rayamajhi, 2016).

La batata aérea fue introducida en Florida en 1905 cuando fue enviada a USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, por sus siglas en inglés), quienes posteriormente se percataron de su potencial invasivo (Morton, 1976). Durante la década de 1980, la batata aérea crecía en matorrales, áreas de desechos y setos o cercas en muchas partes del sur y centro de Florida (Bell y Taylor, 1982). En 1999, se reconoció a la batata aérea como una especie invasora que altera las estructuras de las comunidades de plantas por el desplazamiento de las especies nativas, además de interrumpir las funciones ecológicas (Florida Exotic Pest Plant Council, 2003).

La USDA buscó organismos biológicos para controlar la batata aérea, hasta que encontró en 2002 el escarabajo *Lilioceris cheni* Gressitt y Kimoto (Coleoptera: Chrysomelidae: Criocerinae). Este escarabajo se desarrolla y alimenta exclusivamente de las hojas de la batata aérea, por lo que, se considera un hospedero específico de *D. bulbifera* (Pemberton y Witkus, 2010). *L. cheni* fue descubierto por primera vez en Nepal y más tarde fue encontrado en China (Rayamajhi et al., 2014).

*Lilioceris cheni* es un escarabajo de aproximadamente 9 mm de largo (Tishechkin, Konstantinov, Bista, Pemberton y Center, 2011). Existen dos biotipos de *L. cheni*, los cuales se identifican según los siguientes morfotipos: el chino que tiene élitros de color rojo brillante y el nepalés con élitros de color café. El desarrollo del embrión de *L. cheni* requiere aproximadamente 4 días, durante los cuales el huevo se vuelve amarillento. La larva tiene cuatro estadios con una duración de 2 días cada uno; al finalizar los 8 días pasa al estado de pupa, el cual dura aproximadamente 16 días. Los adultos comienzan su apareamiento 10 días después de emergidos, e inician la oviposición 5 días después (Center et al., 2016). Los adultos pueden llegar a vivir 6 meses, durante los cuales producen hasta 4,000 huevos (Rayamajhi et al., 2014).



Figura 1. *Lilioceris cheni* biotipo nepalés (A) y *Lilioceris cheni* biotipo chino (B). Fotos por: UF/IFAS.

Después de múltiples investigaciones sobre el comportamiento de *L. cheni* bajo condiciones de laboratorio, se llevaron a cabo las primeras liberaciones en 2011. Los estudios de impacto realizados en 5 localidades de Florida durante 2012-2015, demostraron que ocurrió una reducción en la densidad de las vides y en la producción de bulbos de entre el 25% y el 70% durante 3 años. A partir de esto se espera reducir el rendimiento de la batata aérea en todo el estado y, al mismo tiempo, el incremento en la densidad y la proliferación de los escarabajos (Center et al., 2016).

La contaminación de las aguas subterráneas por productos y residuos de agroquímicos es uno de los problemas más preocupantes tanto para países en vías de desarrollo como para países desarrollados (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2002). El control biológico es un método de regulación de plagas y malezas amigable con el medio ambiente, ya que reduce y/o sustituye el uso de dichos agroquímicos. La introducción del escarabajo *L. cheni* a Florida para suprimir las poblaciones de *D. bulbifera* es un ejemplo claro del método clásico de control biológico. Este método se basa en la introducción de enemigos exóticos naturales en áreas donde no estaban presentes, para controlar una maleza específica (Labrada, Caseley y Parker, 1996). Según Overholt et al. (2016), las futuras investigaciones deben enfocarse en determinar los factores bióticos y abióticos que podrían limitar el establecimiento de *L. cheni* en algunas áreas de Florida.

En Florida, la preocupación ambiental, la reducción de costos en insumos agrícolas y el auge de la agricultura orgánica, han impulsado la aplicación de biopesticidas en los campos agrícolas. Entre ellos se utilizan los hongos entomopatógenos, debido a que son altamente especializados y están asociados específicamente con sus huéspedes (Evans, 1993). Entre los más utilizados se encuentran *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* Metsch. Sorok e *Isaria fumosorosea* Wize.

*Isaria fumosorosea* es uno de los hongos entomopatógenos más estudiados, debido a que ha demostrado un alto potencial en el control de plagas de insectos de diversos órdenes. Se usa principalmente en el control de la mosquita blanca *Bemisia tabaci* Gennadius. Asimismo, ha resultado ser inofensivo contra organismos benéficos (Flores et al., 2015). Actualmente, es aplicado como un insecticida fúngico vendido comercialmente como PFR-97™ 20% WDG, el cual es utilizado no solamente por agricultores en los cultivos, sino por la población en general en patios, jardines y bosques. Las aplicaciones frecuentes de *I. fumosorosea* pueden favorecer la cantidad de propágulos fúngicos en el ambiente, mientras que la persistencia y la viabilidad de dichos propágulos pueden ser influenciadas directa o indirectamente por muchos factores abióticos (Ayala, 2012). Según Hayek y St. Leger (1994), los propágulos de los hongos entomopatógenos son dispersados de forma pasiva y, en la mayoría de los casos, esto ocurre por la acción de los componentes meteorológicos como viento y lluvia. En un estudio realizado por Ayala (2012), quien evaluó la persistencia y dispersión de *I. fumosorosea* en el ambiente tras la aspersión, observaron la presencia del hongo a 100 y 150 metros del borde de la parcela donde el hongo fue asperjado. Asimismo, detectaron el hongo en muestras de suelo cinco meses posteriores a las aspersiones.

La importancia de la presente investigación radica en evaluar los efectos que podrían generarse en *L. cheni* si las esporas del hongo *I. fumosorosea* aplicado en zonas agrícolas para combatir insectos plaga, son llevadas por acción del viento hasta zonas donde está presente *L. cheni* como controlador biológico. Para ello se planteó:

- Evaluar las tasas de consumo por adultos de *L. cheni* expuestos a diferentes concentraciones de *I. fumosorosea* aplicadas a las hojas.
- Determinar la tasa de mortalidad y la tasa de micosis de adultos de *L. cheni* tras su exposición a las esporas de *I. fumosorosea* en la superficie de las hojas.
- Comparar la longevidad de adultos de *L. cheni* tras la exposición y alimentación de las hojas rociadas con *I. fumosorosea* con adultos de *L. cheni* sin el hongo.

## 2. METODOLOGÍA

### Sitio y materiales biológicos.

**Descripción del sitio de estudio.** El estudio fue conducido en el Laboratorio de Investigación de Hongos Entomopatógenos que forma parte del Laboratorio de Contención e Investigación de Control Biológico Norman C. Hayslip (BCRCL por sus siglas en inglés) del Centro de Investigación y Educación Indian River (IRREC por sus siglas en inglés) de la Universidad de Florida, en Fort Pierce, Florida, EEUU., durante los meses de enero a abril de 2018. En el BCRCL se evalúan los enemigos naturales de insectos y plantas invasoras en condiciones altamente seguras, para contribuir con información a la toma de decisiones en cuanto a la liberación y manejo de estas especies en la Florida (University of Florida, 2011).

**Crianza de insectos.** Las colonias de *L. cheni* fueron mantenidas dentro de cámaras de ambiente controlado, donde crecen y se reproducen en plantas de la batata aérea a una temperatura diaria promedio de 25 °C y una fotofase de 14 horas. Para el experimento se utilizaron 60 escarabajos entre una semana y un mes de haber pasado a la etapa adulta.

**Plantas.** Las hojas de la batata aérea utilizadas en el experimento pertenecieron a plantas cultivadas en invernadero bajo luz artificial a 26 °C y humedad relativa de 80% (Figura 2). Fueron escogidas por el tamaño medio y cortadas el día requerido. Se colocaron en un balde con agua y posteriormente se envolvieron en papel toalla dentro de una bolsa plástica para mantener la humedad. Se mantuvieron las hojas en refrigeración hasta ser utilizadas.



Figura 2. Plantas de *Dioscorea bulbifera* en invernadero de la Universidad de Florida.

## Establecimiento del experimento.

**Diluciones.** Se tomó un gramo de PFR-97™ 20% WDG y se diluyó en 100 mL de agua destilada. De esta suspensión, se tomaron 10 µL y se colocaron en un hemocitómetro de Neubauer para realizar el conteo de esporas. A esta concentración de esporas se le llamó suspensión inicial. A partir de esta suspensión se realizaron las diluciones para cada tratamiento, realizando los cálculos para obtener el volumen diluído, que es la cantidad de mililitros que se necesitará agregar en agua para alcanzar la nueva suspensión de 50 mL para utilizarla como tratamiento. Se calculó utilizando la ecuación 1.

$$V_i = \frac{C_d \times V_d}{C_i} \quad [1]$$

Donde:

$V_i$ = volumen inicial (mL)

$C_i$ = concentración inicial (esporas/mL)

$V_d$ = volumen diluído (mL)

$C_d$ = concentración diluída (esporas/mL)

Las suspensiones iniciales para los ensayos 1 y 2 fueron  $4.32 \times 10^7$  esporas/mL y  $3.72 \times 10^7$  esporas/mL, respectivamente. Las suspensiones finales fueron  $4.32 \times 10^6$  esporas/mL,  $4.32 \times 10^4$  esporas/mL,  $4.32 \times 10^3$  esporas/mL y  $4.32 \times 10^2$  esporas/mL en ambos ensayos.

El volumen obtenido para cada concentración se agregó a cuatro diferentes tubos de ensayo, completando los 50 mL con agua destilada (Figura 3-A).



Figura 3. Suspensiones de *Isaria fumosorosea* (A); hojas de *D. bulbifera* rociadas con *Isaria fumosorosea* (B).

**Diseño experimental.** Dentro del experimento se realizaron dos ensayos, donde se tomaron 30 adultos (19 machos, 11 hembras) de *L. cheni* del biotipo nepalés. Todos los adultos del primer ensayo tenían una semana de haber emergido. En el segundo ensayo se utilizaron adultos de diferentes edades: 10 de una semana, 10 de dos semanas y 10 de un mes de haber emergido. Se dejaron los adultos por 24 horas en un recipiente plástico con agujeros y papel toalla húmedo sin ser alimentados. Los platos Petri se etiquetaron por colores con cuatro tratamientos fúngicos de *I. fumosorosea* ( $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  blastosporas/mL y el control que fue únicamente agua destilada). Las hojas de *D. bulbifera* de tamaño medio se rociaron con las diluciones de PFR-97™ 20% WDG con un atomizador, en orden de menor a mayor concentración, y las hojas del control se rociaron con agua (para evitar la contaminación cruzada, las hojas de control se rociaron y secaron en un área diferente). Se trató cada hoja hasta el punto de escurrimiento, por el lado del haz, y posteriormente se dejaron secar sobre papel toalla. Una vez seca, se colocó cada hoja dentro de un plato Petri sobre papel filtro humedecido con 3 mL de agua. Se colocó un escarabajo en cada plato. Se sellaron los platos Petri con Parafilm® y se colocaron en una cámara de crecimiento a 25 °C durante 24 horas, siguiendo un diseño completamente al azar con seis repeticiones por tratamiento (Figura 4). Después de 24 horas se retiró el Parafilm y se realizó un cambio de hoja y papel filtro. Las hojas retiradas se guardaron para la evaluación de la tasa de consumo. Los escarabajos se alimentaron con hojas frescas cada tres días, que también corresponde a la frecuencia de muestreo del área de superficie de las hojas antes y después del consumo. Además, se anotaron las muertes y posteriormente las infecciones observadas por medio de micosis. Esto se realizó durante 22 días mediante dos ensayos, teniendo un total de 60 unidades experimentales (escarabajos).



Figura 4. Arreglo de las unidades experimentales y tratamientos al azar en cámara de crecimiento.

## Medición de variables.

**Consumo.** A las hojas recolectadas 24 horas después de establecer el experimento y posteriormente cada 3 días, se les midió con una regla el nervio central de la hoja desde la base hasta el ápice. Se fotografió cada hoja y con el software “ImageJ” se calculó el área de las hojas antes y después del consumo, por medio de máscaras de selección, utilizando las medidas del largo de las hojas tomadas previamente (Figura 5).



Figura 5. Proceso de medición del área de las hojas en “ImageJ”.

**Longevidad y mortalidad.** Para este análisis, los insectos que fueron expuestos a los tratamientos fueron observados diariamente. La fecha de muerte se registró durante los 22 días siguientes a la aplicación de los tratamientos. Se cuantificó el número de insectos muertos por cada tratamiento. La muerte se determinaba al observar al insecto sin movilidad y en posición boca arriba. Al morir los escarabajos se les realizaba el análisis de micosis, y el consumo se interpretaba como cero.

**Tasa de micosis.** Al detectarse la muerte de un adulto, se evaluó si esta tuvo relación con la exposición o el consumo de las hojas rociadas con hongo. Se sumergió el insecto muerto en alcohol al 70% por 10 segundos. Luego se enjuagó rápidamente con agua destilada, se pasó por una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto y se enjuagó con agua destilada tres veces (Figura 6-A). Posteriormente, se dejó secar por 5 minutos y se colocó en un plato Petri con papel filtro humedecido. El plato Petri fue sellado con Parafilm® y se colocó en el incubador por 15 días (Figura 6-B). De esta forma se esperó el crecimiento del hongo desde el interior del insecto.

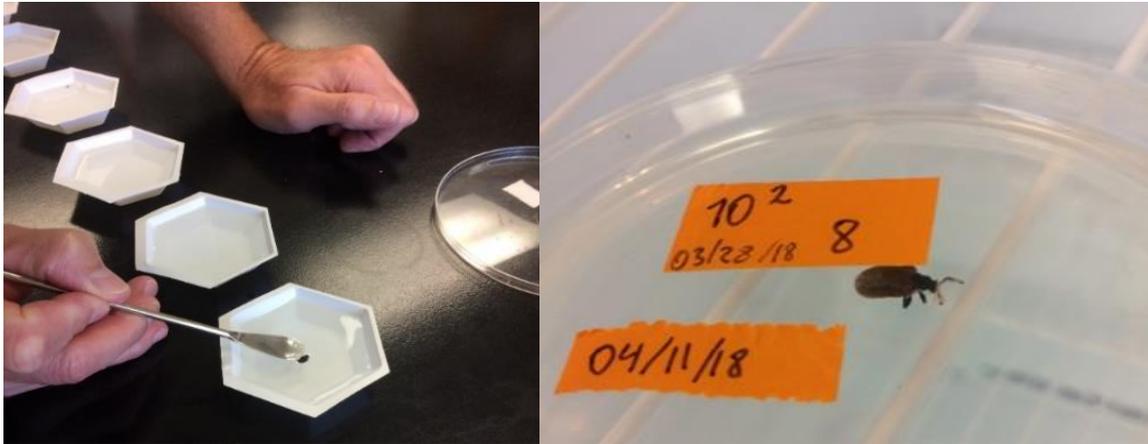


Figura 6. Esterilización superficial (A); *Lilioceris cheni* muerto en cámara de crecimiento (B).

**Análisis estadísticos.** Los datos de consumo se analizaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk, para conocer su normalidad. Se realizaron ANDEVAS de una vía para evaluar diferencias entre ensayos y entre tratamientos. Se aplicó la prueba de  $\chi^2$  a la variable tasa de micosis para detectar diferencias entre ensayos y tratamientos. Se realizó una prueba exacta de Fisher para determinar si hay diferencias en la longevidad según las edades de los escarabajos al inicio del experimento. Se utilizó la fórmula de Abbott (1925) para calcular la mortalidad corregida por tratamiento por cada 3 días, y a estos datos se les aplicó una prueba de Kruskal-Wallis para encontrar diferencias en tasas de mortalidad entre tratamientos. Finalmente, para analizar la longevidad se realizaron ANDEVAS. Para esto se utilizó el Software “IBM SPSS” versión 19, con un nivel de significancia del 5%.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Consumo.

Se encontraron hojas que no fueron consumidas pasado el día 1 del experimento, distribuidas de la siguiente manera: 3 en el control, 4 en la concentración de  $10^2$  esporas/mL y 4 en la concentración  $10^3$  esporas/mL. Para las otras concentraciones solo quedó una hoja entera por cada tratamiento, tomando los datos de ambos ensayos. Según Finch y Collier (2000), antes de hacer algún contacto con la planta, los insectos detectan partículas volátiles de éstas y señales visuales, y algunos deciden rechazar o continuar examinando la planta según las señales físicas y químicas de la superficie de la hoja (Bernays y Chapman, 1994). Esta revisión es seguida por una mordida de prueba para revelar los químicos contenidos en el interior de las plantas (Schoonhoven, van Loon y Dicke, 2005), lo que podría explicar el bajo consumo en las primeras 24 horas del experimento, donde los escarabajos estuvieron en presencia de las esporas de *I. fumosorosea*.

Cuadro 1. Análisis de varianza de los datos de consumo de los ensayos 1 y 2.

Variable de respuesta		gl	F	Probabilidad
Consumo inicial	Inter-grupos	2	0.305	0.738
	Intra-grupos	57		
	Total	59		
Consumo final	Inter-grupos	2	0.000	1.000
	Intra-grupos	57		
	Total	59		
Consumo total	Inter-grupos	2	0.050	0.951
	Intra-grupos	57		
	Total	59		

Según los resultados de la prueba ANDEVA, no existieron diferencias significativas en el consumo entre los ensayos 1 y 2 (Cuadro 1). Sin embargo, a nivel descriptivo se observó que el consumo total fue mayor en el ensayo 1, con 123,142.7 mm<sup>2</sup> consumidos, mientras que en el ensayo 2 el consumo fue de 118,971.5 mm<sup>2</sup>, teniendo una diferencia de 4,171.16 mm<sup>2</sup> (Figura 7). Lo anterior puede ser debido a que en el ensayo 2 se presentó una mayor mortalidad en comparación al ensayo 1 (7 a 1), reduciendo de esta forma el consumo total del ensayo 2. Gámez et al. (2014) evaluaron el efecto de *I. fumosorosea* contra el escarabajo *Microtheca ochroloma* y también obtuvieron un menor consumo por parte de *M. ochroloma* en el segundo ensayo, por lo que atribuyeron la diferencia a una mayor germinación del hongo y/o a la deposición de esporas.

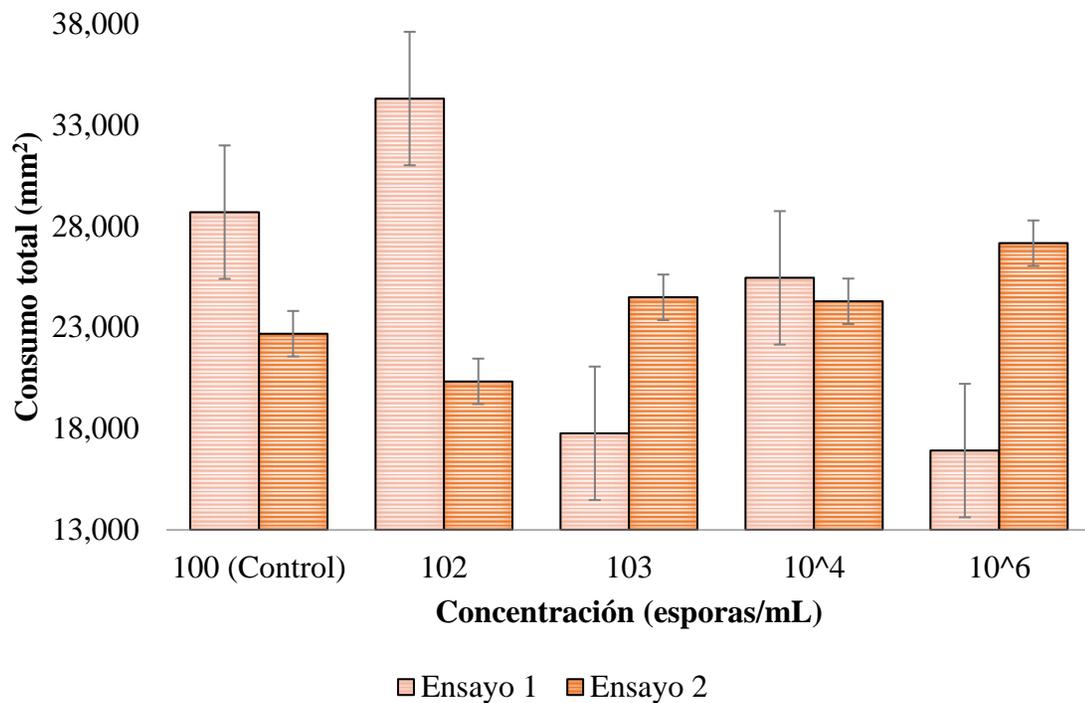


Figura 7. Comparación del consumo total promedio (con error estándar) de hojas de *Dioscorea bulbifera* por adultos de *Lilioceris cheni* en dos ensayos con 5 tratamientos de *Isaria fumosorosea*.

Al inicio del experimento se observó que a mayor concentración de esporas hubo mayor consumo, encontrando el primer día el mínimo consumo registrado para todos los tratamientos, incluyendo el control (Figura 8). Esta observación es contraria a lo que reportaron Gámez et al. (2014), quienes encontraron que las hojas del control fueron un 3.7% más consumidas que los tratamientos con 1 g/100 mL y 2 g/100 mL de la formulación PFR-97 20% WDG.

Por otro lado, el día de máximo consumo difirió para cada tratamiento (Figura 8). De acuerdo a Schoonhoven et al. (2005), las primeras mordidas por los insectos son normalmente pequeñas. Si el insecto acepta el alimento, generalmente la mordida de prueba es seguida por alimentación extensiva. Esto podría explicar el bajo consumo en el día 1, a pesar que los escarabajos no habían sido alimentados por 24 horas.

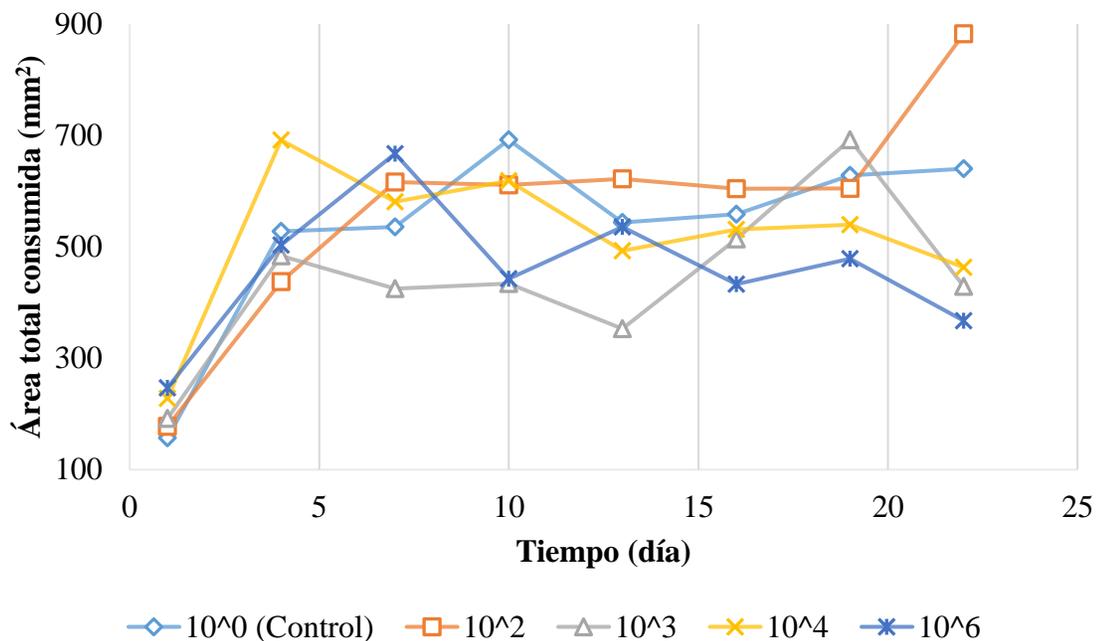


Figura 8. Consumo de hojas de *Dioscorea bulbifera* por *Lilioceris cheni* con cinco diferentes tratamientos de *Isaria fumosorosea* durante 22 días.

No se encontraron diferencias significativas de consumo total entre tratamientos ( $F=0.343$ ;  $gl=4$ ;  $P=0.847$ ). Sin embargo, a nivel descriptivo, el mayor consumo total se observó en el tratamiento con  $10^2$  esporas/mL, mientras que el menor consumo total se observó en el tratamiento con  $10^3$  esporas/mL (Figura 9). Se observó una tendencia similar a la encontrada por Gámez et al. (2014), quienes observaron que a medida que aumentaba el número de esporas/mm<sup>2</sup>, disminuyó el porcentaje de consumo por parte de *M. ochroloma*.

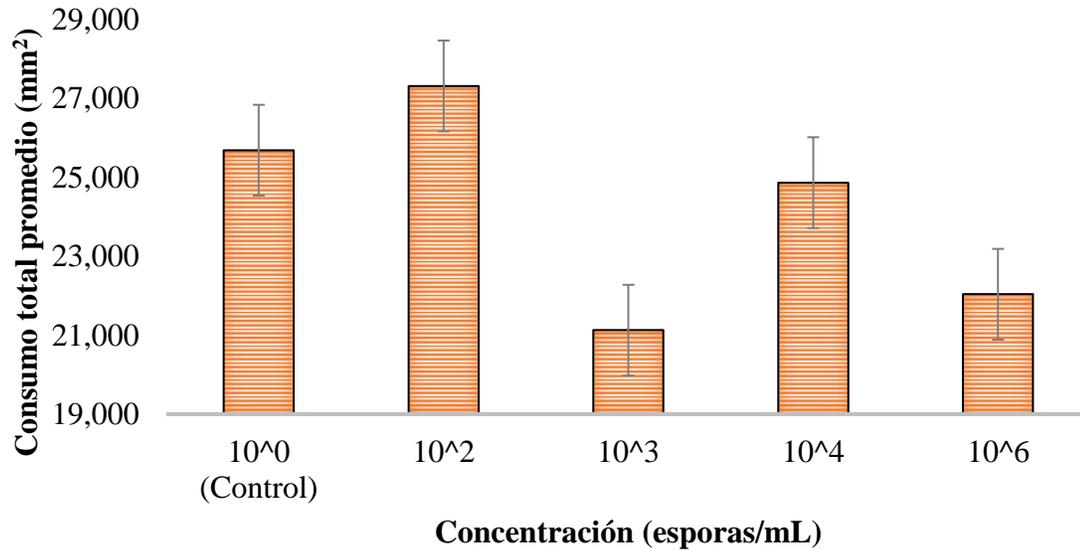


Figura 9. Consumo total promedio (con error estándar) por adultos de *Lilioceris cheni* de los ensayos 1 y 2 por cada tratamiento.

#### Tasa de mortalidad.

La tasa de mortalidad en los dos ensayos combinados fue de 13.3%, pero la mayoría (7 de 8 adultos muertos) ocurrió en el ensayo 2. La menor mortalidad fue en el tratamiento de 10<sup>2</sup> esporas/mL y el control, similar a lo que reportaron Flores et al. (2015), quienes evaluaron el efecto de *I. fumosorosea* contra la mosquita blanca *B. tabaci*, donde la mortalidad en el control permaneció menor al 5%; mientras que en el resto de los tratamientos se observaron dos escarabajos muertos por cada uno. Por otro lado, Gámez et al. (2014) obtuvieron un mayor porcentaje de mortalidad de adultos de *M. ochloroma* (32.7% y 30% para cada ensayo respectivamente), sin embargo, no encontraron relación entre los tratamientos aplicados y la mortalidad de los escarabajos.

La mortalidad corregida utilizando la fórmula de Abbott modifica el porcentaje de mortalidad de cada tratamiento según la mortalidad en el control. En el momento en que muere el escarabajo del control (día 19), los porcentajes de mortalidad de los tratamientos pueden disminuir. Si el número de insectos muertos en el tratamiento es igual al número de insectos muertos en el control, entonces el porcentaje de mortalidad corregida es 0, tal es el caso del tratamiento 5 (10<sup>6</sup> esporas/mL) hasta el día 22, donde ya había dos insectos muertos, a diferencia del control que solo tuvo 1 (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentajes de mortalidad corregida de *Lilioceris cheni* por tratamiento según la fórmula de Abbott bajo condiciones de laboratorio.

Tratamientos (esporas/mL)	% de mortalidad corregida						
	Día 4	Día 7	Día 10	Día 13	Día 16	Día 19	Día 22
10 <sup>2</sup>	0	8.3	8.3	8.3	8.3	0	0
10 <sup>3</sup>	0	0	8.3	16.7	16.7	9.1	9.1
10 <sup>4</sup>	0	8.3	8.3	8.3	8.3	9.1	9.1
10 <sup>6</sup>	0	0	0	0	0	0	9.1

Con la prueba de Kruskal-Wallis se analizaron los resultados de la mortalidad corregida por tratamiento, encontrando que no hay diferencias significativas ( $K=7.4735$ ;  $G=3$ ;  $P=0.05824$ ) entre los tratamientos con un  $\alpha=0.05$ . Montemayor, Avery, y Cave (2016), evaluaron varias concentraciones de *I. fumosorosea* sobre las cuatro etapas de desarrollo de *Microtheca ochloroma*, y no reportaron una mortalidad significativa en adultos, posiblemente debido a la cutícula dura que poseen los escarabajos, que actúa como una barrera que evita la germinación de las blastosporas.

#### Tasa de micosis.

Un escarabajo del control, uno del tratamiento con 10<sup>2</sup> esporas/mL y uno del tratamiento con 10<sup>3</sup> esporas/mL expresaron micosis. Sin embargo, al hacer la observación microscópica se determinó que no se trataba de *I. fumosorosea*, sino de hongos saprófitos. Estos se desarrollan sobre materia orgánica, colonizando cualquier tipo de sustrato orgánico que pudo estar presente en la hoja desde antes de realizar el experimento (Cuesta, 2018). Los hongos saprófitos no causaron la muerte de los escarabajos.

En uno de los 8 adultos muertos se observó la micosis de *I. fumosorosea* por medio de un microscopio (Figuras 10), 10 días después de haber sido incubado. Así, la tasa de micosis fue 12.5% (1 de 8 adultos muertos). El escarabajo que presentó micosis pertenecía al tratamiento con 10<sup>6</sup> esporas/mL, y murió en el día 20 del experimento. Es posible que el hongo se haya quedado en el interior de otros escarabajos, sin exhibir la formación de esporas. Estas esporas tienden a emerger por la parte anterior del escarabajo, mientras que en el abdomen son poco visibles.



Figura 10. *Lilioceris cheni* infectado por *Isaria fumosorosea* (A); esporas en los élitros de *Lilioceris cheni* (B).

No existieron diferencias significativas entre tratamientos con respecto a la micosis ( $\chi^2=3.288$ ;  $gl=4$ ;  $P=0.511$ ), debido que en solo uno de ellos ( $10^6$  esporas/mL) se presentó micosis por *I. fumosorosea*.

Según Elósegui y Elizondo (2010), la germinación y penetración de la cutícula del insecto son momentos claves para alcanzar la patogenicidad, es decir, la capacidad patogénica se relaciona directamente con la germinación y crecimiento del hongo. Los insectos a medida que se van enfermando a causa de hongos entomopatógenos, disminuyen su actividad física y alimentación (France et al., 1999; Malpartida et al., 2013). En la Figura 11 se observa la trayectoria del consumo del escarabajo que presentó micosis por *I. fumosorosea*, la cual muestra una disminución en el consumo a partir del día 16, por lo que, según lo mencionado anteriormente, podría indicar el inicio de su enfermedad hasta morir en el día 20.

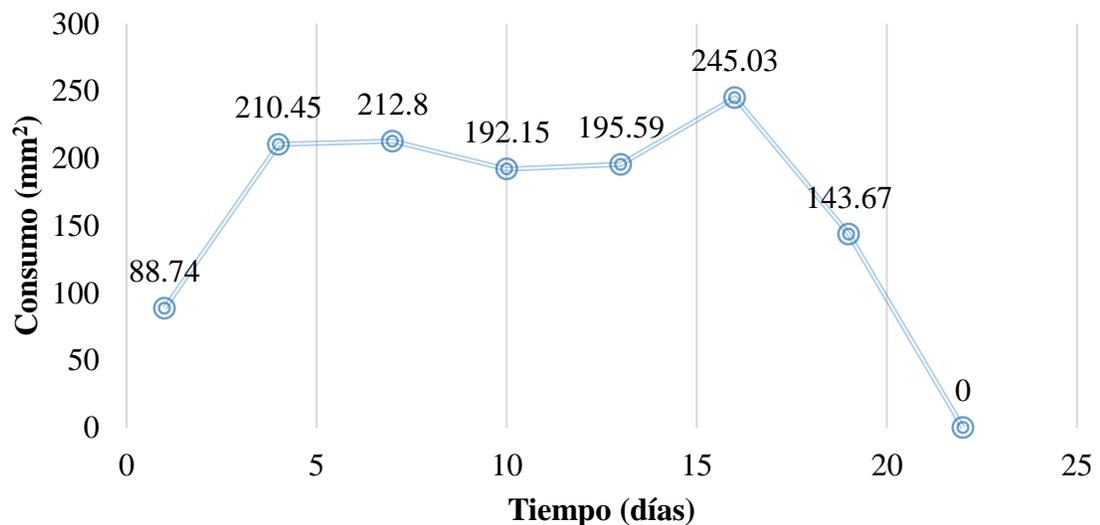


Figura 11. Comportamiento de consumo de *L. cheni* que presentó micosis por *I. fumosorosea*.

### **Longevidad.**

Los adultos de *L. cheni* pueden llegar a vivir por más de 5 meses (Center et al., 2016). Sin embargo, la vida promedio de los adultos en las colonias criadas en el laboratorio BCRCL es de 40 días. De los 60 adultos en el experimento, 52 sobrevivieron los 22 días de duración de éste. En la Figura 12 se muestra el tiempo de supervivencia promedio de *L. cheni* por tratamiento para cada ensayo y el promedio de ambos ensayos.

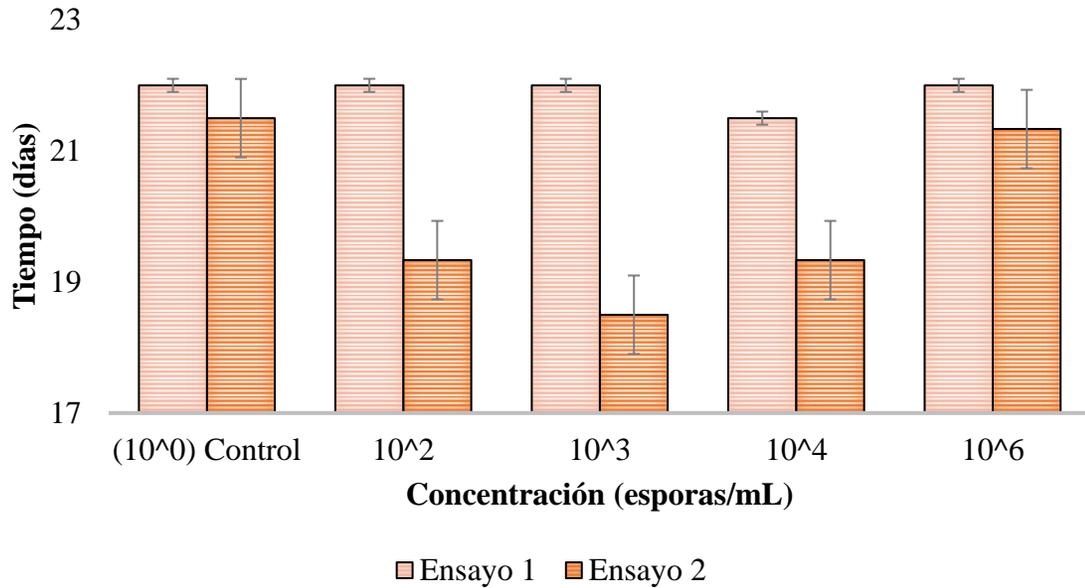


Figura 12. Comparación de la longevidad promedio (con error estándar) por adultos de *Lilioceris cheni* expuestos a las esporas de *Isaria fumosorosea* de los dos ensayos.

No se encontraron diferencias significativas en la longevidad de *L. cheni* según los diferentes tratamientos ( $F=4.91$ ;  $gl=4$ ;  $P=0.742$ ). Se comprobó que no existieron diferencias significativas entre la longevidad de escarabajos de diferentes edades al inicio del experimento y los días de sobrevivencia según la prueba exacta de Fisher ( $P=0.195$ ).

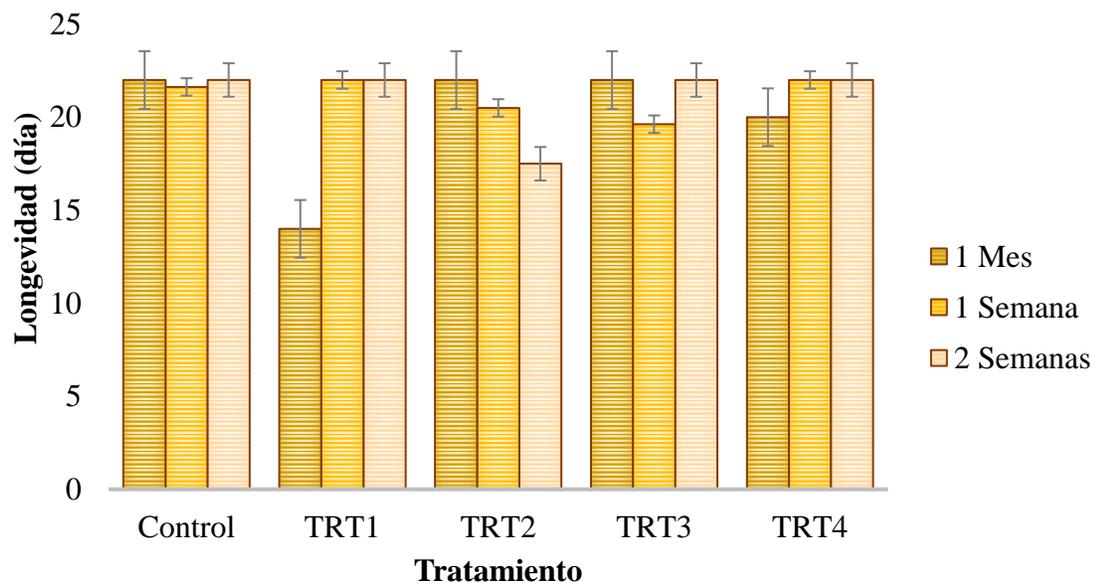


Figura 13. Longevidad de *Lilioceris cheni* (con error estándar) durante el experimento según tres edades iniciales.

#### 4. CONCLUSIONES

- La presencia del hongo entomopatógeno *I. fumosorosea* en las hojas de *D. bulbifera* y en las concentraciones de  $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  y  $10^2$  esporas/mL, no afecta significativamente el consumo de esta planta por parte de *L. cheni* bajo condiciones de laboratorio.
- El escarabajo *L. cheni* no es susceptible a infectarse con el hongo *I. fumosorosea* bajo condiciones de laboratorio a 25 °C y con una humedad relativa de 60%.
- La longevidad de adultos de *L. cheni* no es afectada significativamente por la exposición a las blastosporas de *I. fumosorosea*.
- El hongo *I. fumosorosea* no generó efectos adversos en adultos de *L. cheni*, por lo que el consumo de la batata aérea *D. bulbifera* no se ve afectado negativamente debido al uso de *I. fumosorosea* como mecanismo de control biológico.

## 5. RECOMENDACIONES

- Estudiar el efecto de *I. fumosorosea* sobre el consumo y mortalidad de las larvas de *L. cheni*.
- Realizar pruebas de elección en insectos de *L. cheni* con hojas infectadas y no infectadas, para determinar si existe una preferencia en el consumo de *D. bulbifera*.
- Comparar los efectos de *I. fumosorosea* sobre ambos biotipos chino y nepalés de *L. cheni*.
- Realizar experimentos utilizando otros hongos entomopatógenos, tales como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

## 6. LITERATURA CITADA

- Abbott, W. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265-267.
- Ayala, M. (2012). *Persistencia y dispersión del hongo entomopatógeno Isaria fumosorosea Wize utilizado en el control biológico de la mosquita blanca (Hemiptera: Aleyrodidae)*. México D. F.: Casa abierta al tiempo.
- Bell, C., & Taylor, B. (1982). *Florida Wild Flowers and Roadside Plants*. Florida: Laurel Hill Press, Chapel Hill, N.C.
- Bernays, E., & Chapman, R. (1994). *Host-Plant Selection by Phytophagous Insects*. Nueva York: Chapman & Hall.
- Center, T., Overholt, W., Rohrig, E., & Rayamajhi, M. (2016). *Control biológico clásico de la Batata Aérea en la Florida*. Florida: Universidad de la Florida (UF/IFAS).
- Croxton, M., Andreu, M., Williams, D., Overholt, W., & Smith, J. (2011). Geographic origins and genetic diversity of air-potato (*Dioscorea bulbifera*) in Florida. *Science and Management*, 4, 22-30.
- Cuesta, J. (2018). *Ecología y hábitat de los hongos*. Recuperado de Asociación Micológica El Royo: [http://amanitacesarea.com/guia\\_ecologia2.html](http://amanitacesarea.com/guia_ecologia2.html)
- Elósegui, O., & Elizondo, A. (2010). Evaluación microbiológica in vitro de mezclas de especies de hongos entomopatógenos ingredientes activos de bioplaguicidas cubanos. *Fitosanidad*, 14(2), 103-109.
- Finch, S., & Collier, R. (2000). Host-plant selection by insects- a theory based on "appropriate/inappropriate landings" by pest insects of cruciferous plants. *Entomol. Exp. Appl.*, 96, 91-102.
- Flores, A., Pucheta, M., Ramos-López, M. A., Rodríguez, S., Ramos, G., & Juárez, D. (2015). Estudio del hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* como control biológico de la mosquita blanca *Bemisia tabaci*. *Sistema de Información Científica Redalyc*, 38, 523-526.

- Florida Exotic Pest Plant Council (2003). *Florida Exotic Pest Plant Council's 2003 list of invasive species*. Recuperado de <https://www.se-eppc.org/wildlandweeds/pdf/Fall2003-2003List.pdf>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2002). *Perspectivas para el medio ambiente*. Recuperado de FAO: <http://www.fao.org/docrep/004/Y3557S/y3557s11.htm#TopOfPage>
- France, A., Espinosa, S., Vivanco, E., Gerding, M., & Sandoval, A. (1999). Patología de insectos. *Serie Quilamapu*, 97-122.
- Gámez, C., Niño, A., Avery, P., & Cave, R. (2014). Uso del hongo *Isaria fumosorosea* para controlar adultos del escarabajo de margen amarillo, *Microtheca ochroloma* Stål (Coleoptera: Chrysomelidae). *Ceiba*, 54(2), 118-126.
- Hayek, A., & St. Leger, R. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect host. *Annual Review of Entomology*, 39, 293-322.
- Labrada, R., Caseley, J., & Parker, C. (1996). *Manejo de Malezas para Países en Desarrollo*. Roma: FAO.
- Malpartida, J., Narrea, M., & Dale, W. (2013). Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., sobre el gusano defoliador del maracuyá *Dione juno* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae) en laboratorio. *Ecología Aplicada*, 12(2), 75-81.
- Montemayor, C., Avery, P., & Cave, R. (2016). Infection and mortality of *Microtheca ochroloma* (Coleoptera: Chrysomelidae) by *Isaria fumosorosea* under laboratory conditions. *Biocontrol Science & Technology*, 5, 605-616.
- Morton. (1976). Pestiferous spread of many ornamental. *Proceedings Florida State Horticultural Society*, 89, 348-353.
- Overholt, W., Rayamajhi, M., Rohrig, E., Hight, S., Allen, F., Bhattarai, G., . . . Hibbard, K. (2016). Release and distribution of *Lilioceris cheni* (Coleoptera: Chrysomelidae), a biological control agent of air potato (*Dioscorea bulbifera*: Dioscoreaceae), in Florida. *Biocontrol Science and Technology*, 26(8), 1087-1099.
- Pemberton, R., & Witkus, G. (2010). Laboratory host range testing of *Lilioceris* sp. near *impressa* (Coleoptera: Chrysomelidae) a potential biological control agent of air potato, *Dioscorea bulbifera* (Dioscoreaceae). *Biocontrol Science and Technology*, 20, 567-587.
- Rayamajhi, M., Rohrig, E., Center, T., Lake, E., Smith, M., Manrique, V., . . . Overholt, W. (2014). Biological Control for Air Potato Has Arrived! *Wildland Weeds*, 14-15.

Schoonhoven, L., van Loon, J., & Dicke, M. (2005). *Insect-Plant Biology*. Nueva York: Oxford University Press.

Tishechkin, A., Konstantinov, A., Bista, S., Pemberton, R., & Center, T. (2011). Review of the continental Oriental species of *Lilioceris* Reitter (Coleoptera, Chrysomelidae, Criocerinae) closely related to *Lilioceris impressa*. *ZooKeys*, *103*, 63-83.

University of Florida. (2011). *Hayslip Biological Control Research and Containment Laboratory*. Recuperado de University of Florida: <http://bcrc1.ifas.ufl.edu/>

## 7. ANEXOS

### Anexo 1. Etiqueta de PFR-97™ 20% WDG.

# PFR-97™ 20% WDG

## MICROBIAL INSECTICIDE

For control of insect and mite pests on vegetables, fruits, tobacco, and other food crops.

<b>ACTIVE INGREDIENT:</b>	
<i>Isaria fumosorosea</i> Apopka Strain 97.....	20.0%*
(formerly <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> )	
<b>OTHER INGREDIENTS:</b> .....	80.0%
<b>TOTAL:</b> .....	100.0%

\*Contains 1 x 10<sup>8</sup> CFU/g of product

Net Weight: 5 pounds  
 EPA Reg. No. 70051-19  
 EPA Est. No. 70051-CA-001  
 Lot Number:  
 Store Refrigerated (~35-40°F)

**KEEP OUT OF REACH OF CHILDREN  
 CAUTION**

#### FIRST AID

**If on skin or clothing:** Take off contaminated clothing. Rinse skin immediately with plenty of water for 15-20 minutes. Call a poison control center or doctor for treatment advice.

**If in eyes:** Hold eye open and rinse slowly and gently with water for 15-20 minutes. Remove contact lenses, if present, after the first 5 minutes, then continue rinsing eye. Call a poison control center or doctor for treatment advice.

Have the product container or label with you when calling a poison control center or doctor, or going for treatment. Hot Line Number: 1-800-255-3924 ChemTel.



FOR ORGANIC PRODUCTION

**MANUFACTURED BY:**  
 Certis USA LLC  
 9145 Guilford Road  
 Suite 175  
 Columbia, MD 21046



#### PRECAUTIONARY STATEMENTS

##### HAZARDS TO HUMANS AND DOMESTIC ANIMALS

**CAUTION.** Harmful if absorbed through the skin. Causes moderate eye irritation. Avoid contact with skin, eyes or clothing. Wash thoroughly with soap and water after handling and before eating, drinking, chewing gum, using tobacco or using the toilet. Remove and wash contaminated clothing before reuse.

##### PERSONAL PROTECTIVE EQUIPMENT

Applicators and other handlers must wear:

- Long-sleeved shirt and long pants.
- Waterproof gloves.
- Shoes plus socks.
- Mixers/loaders and applicators must wear and use a NIOSH-approved particulate respirator with any N, R, or P filter with NIOSH approval number prefix TC-84A (if tank mixing with any oil-based adjuvants, spreaders, or sprayer/stickers, use only R or P filters); or a NIOSH-approved powered air purifying respirator with an HE filter with NIOSH approval number prefix TC-21C. (Repeated exposure to high concentrations of microbial proteins can cause allergic sensitization.)

Follow manufacturer's instructions for cleaning and maintaining PPE. If no such instructions for washables, use detergent and hot water. Keep and wash PPE separately from other laundry.

##### USER SAFETY RECOMMENDATIONS

User should:

- Remove clothing/PPE immediately if pesticide gets inside. Then wash thoroughly and put on clean clothing.
- Remove PPE immediately after handling this product. Wash the outside of gloves before removing. As soon as possible, wash thoroughly and change into clean clothing.

##### ENVIRONMENTAL HAZARDS

For outdoor, non-greenhouse use, do not apply when bees are actively foraging. Do not apply directly to water, or to areas where surface water is present, or to intertidal areas below the mean high water mark. Do not contaminate water

when disposing of equipment washwater or rinsate. Do not allow contamination of or discharge into lakes, streams, ponds, or public waterways. Drift and runoff may be hazardous to aquatic organisms in water adjacent to treated areas.

##### DIRECTIONS FOR USE

IT IS A VIOLATION OF FEDERAL LAW TO USE THIS PRODUCT IN A MANNER INCONSISTENT WITH ITS LABELING.

Do not apply this product in a way that will contact workers or other persons, either directly or through drift. Only protected handlers may be in the area during application. For any requirements specific to your State or Tribe, consult the State or Tribal agency responsible for pesticide regulation.

Apply this product only as specified in the label.

##### AGRICULTURAL USE REQUIREMENTS

Use this product only in accordance with its labeling and with the Worker Protection Standard, 40 CFR Part 170. This Standard contains requirements for the protection of agricultural workers on farms, forests, nurseries, and greenhouses, and handlers of agricultural pesticides. It contains requirements for training, decontamination, notification, and emergency assistance. It also contains specific instructions and exceptions pertaining to the statements on this label about personal protective equipment (PPE) and restricted-entry interval. The requirements in this box only apply to uses of this product that are covered by the Worker Protection Standard.

Do not enter or allow worker entry into treated areas during the restricted-entry interval (REI) of 4 hours.

PPE required for early entry to treated areas (that is permitted under the Worker Protection Standard and that involves contact with anything that has been treated, such as plants, soil, or water) is:

- Coveralls.
- Waterproof gloves.
- Shoes plus socks.

**Anexo 2.** Cálculos de volumen de suspensiones para el ensayo 1.

Tratamiento  $10^6$  esporas/mL

$$V_i = \frac{4.32 \times 10^6 \text{ esporas/mL} \times 50 \text{ mL}}{4.32 \times 10^7 \text{ esporas/mL}} = 5 \text{ mL de suspensión inicial} + 45 \text{ mL de agua destilada}$$

Tratamiento  $10^4$  esporas/mL

$$V_i = \frac{4.32 \times 10^4 \text{ esporas/mL} \times 50 \text{ mL}}{4.32 \times 10^7 \text{ esporas/mL}} = 0.05 \text{ mL de suspensión madre} + 49.95 \text{ mL de agua destilada}$$

Tratamiento  $10^3$  esporas/mL

$$V_i = \frac{4.32 \times 10^3 \text{ esporas/mL} \times 50 \text{ mL}}{4.32 \times 10^7 \text{ esporas/mL}} = 0.005 \text{ mL de suspensión madre} + 49.995 \text{ mL de agua destilada}$$

Tratamiento  $10^2$  esporas/mL

$$V_i = \frac{4.32 \times 10^2 \text{ esporas/mL} \times 50 \text{ mL}}{4.32 \times 10^7 \text{ esporas/mL}} = 0.0005 \text{ mL de suspensión madre} + 49.9995 \text{ mL de agua destilada}$$

**Anexo 3.** Cálculos de volumen de suspensiones para el ensayo 2.

Tratamiento  $10^6$  esporas/mL

$$V_i = \frac{4.32 \times 10^6 \text{ esporas/mL} \times 50 \text{ mL}}{3.72 \times 10^7 \text{ esporas/mL}} = 5.8 \text{ mL de suspensión madre} + 44.2 \text{ mL de agua destilada}$$

Tratamiento  $10^4$  esporas/mL

$$V_i = \frac{4.32 \times 10^4 \text{ esporas/mL} \times 50 \text{ mL}}{3.72 \times 10^7 \text{ esporas/mL}} = 0.058 \text{ mL de suspensión madre} + 49.942 \text{ mL de agua destilada}$$

Tratamiento  $10^3$  esporas/mL

$$V_i = \frac{4.32 \times 10^3 \text{ esporas/mL} \times 50 \text{ mL}}{3.72 \times 10^7 \text{ esporas/mL}} = 0.0058 \text{ mL de suspensión madre} + 49.9942 \text{ mL de agua destilada}$$

Tratamiento  $10^2$  esporas/mL

$$V_i = \frac{4.32 \times 10^2 \text{ esporas/mL} \times 50 \text{ mL}}{3.72 \times 10^7 \text{ esporas/mL}} = 0.00058 \text{ mL de suspensión madre} + 49.99942 \text{ mL de agua destilada}$$

**Anexo 4.** Resultados de ANDEVA para el consumo total entre tratamientos.

	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
Inter-grupos	8842020.624	4	2210505.156	.343	.847
Intra-grupos	3.540E8	55	6436263.828		
Total	3.628E8	59			

**Anexo 5.** Resultados de ANDEVA para los datos de consumo total del ensayo 2 por las edades al inicio del ensayo.

		<b>gl</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
Consumo inicial	Inter-grupos	2	2.646	.089
	Intra-grupos	27		
	Total	29		
Consumo final	Inter-grupos	2	.885	.424
	Intra-grupos	27		
	Total	29		
Consumo total	Inter-grupos	2	1.347	.277
	Intra-grupos	27		
	Total	29		

**Anexo 6.** Resultados de Chi cuadrado para micosis entre tratamientos.

	<b>Valor</b>	<b>gl</b>	<b>Sig. asintótica (bilateral)</b>
Chi-cuadrado de Pearson	4.068 <sup>a</sup>	4	.397
Razón de verosimilitudes	3.288	4	.511
Asociación lineal por lineal	2.000	1	.157
N de casos válidos	60		

**Anexo 7.** Resultados de ANDEVA para la longevidad entre tratamientos.

	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
Inter-grupos	24.100	4	6.025	.491	.742
Intra-grupos	674.750	55	12.268		
Total	698.850	59			