



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**EFFECTO DEL DETERGENTE AGRÍCOLA TS-2035 USADO COMO
COADYUVANTE DE DOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y UN
INSECTICIDA CONVENCIONAL, ASPERJADOS SOBRE HEMBRAS
ADULTAS DE CHANCHITO BLANCO DE LA VID (*Pseudococcus viburni*
Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae) EN LABORATORIO**

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Agropecuarias,
Mención Sanidad Vegetal

JONATHAN PATRICIO VILLAR MUÑOZ

Directores de Tesis
TOMISLAV CURKOVIC SEKUL
ÍTALO CHIFFELLE GÓMEZ

Profesores Consejeros
AMANDA HUERTA FUENTES
JOSÉ LUIS HENRÍQUEZ SÁEZ

SANTIAGO - CHILE
2015

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

EFECTO DEL DETERGENTE AGRÍCOLA TS-2035 USADO COMO COADYUVANTE DE DOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y UN INSECTICIDA CONVENCIONAL, ASPERJADOS SOBRE HEMBRAS ADULTAS DE CHANCHITO BLANCO DE LA VID (*Pseudococcus viburni* Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae) EN LABORATORIO

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de Magister en Ciencias Agropecuarias, Mención Sanidad Vegetal

JONATHAN PATRICIO VILLAR MUÑOZ

Calificaciones

DIRECTORES DE TESIS

Tomislav Curkovic S.

Ing. Agr., Ph.D

Ítalo Chiffelle G.

Bioquímico, Dr.

PROFESORES CONSEJEROS

Amanda Huerta F.

Ing. Forestal, Dra.

José Luis Henríquez S.

Ing. Agr., M. Sc., Ph.D

Santiago, Chile
2015

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO I: MONOGRAFÍA.....	1
INTEGUMENTO DE <i>PSEUDOCOCCUS</i> SPP. Y SU ROL FRENTE A LA EXPOSICIÓN A DETERGENTES AGRÍCOLAS, INSECTICIDAS CONVENCIONALES Y HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.....	1
Revisión Bibliográfica.....	2
Características generales de la familia <i>Pseudococcidae</i>	2
Integumento de los insectos.....	3
Técnicas de extracción y análisis de componentes epicuticulares.....	4
Insecticidas sintéticos y hongos entomopatógenos.....	5
Detergentes sintéticos.....	7
Efectos en la mortalidad de <i>P. viburni</i>	8
Literatura Citada.....	9
CAPÍTULO II: ARTÍCULO CIENTÍFICO.....	14
EFECTO DEL DETERGENTE AGRÍCOLA TS-2035 USADO COMO COADYUVANTE DE DOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y UN INSECTICIDA CONVENCIONAL, ASPERJADOS SOBRE HEMBRAS ADULTAS DE CHANCHITO BLANCO DE LA VID (<i>Pseudococcus viburni</i> Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae) EN LABORATORIO.....	14
Resumen.....	15
Abstract.....	15
Introducción.....	16
Características generales de <i>P. viburni</i>	16
Insecticidas sintéticos y hongos entomopatógenos.....	16
Detergentes sintéticos.....	17
Efectos en la mortalidad de <i>P. viburni</i>	17
Hipótesis.....	18
Objetivos.....	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos.....	18
Materiales y Métodos.....	19
I. Ubicación del estudio.....	19
II. Material Biológico.....	19
III. Tratamientos y Diseño.....	19
IV. Análisis Estadístico.....	23
Resultados.....	25
1. Mortalidad de <i>P. viburni</i> según concentración de TS-2035.....	25
2. Efecto de Mycotrol en la Mortalidad de <i>P. viburni</i>	27
3. Efecto de clorpirifós (48% p/v) en la Mortalidad de <i>P. viburni</i>	33
4. Efecto de <i>M. anisopliae</i> en la mortalidad de <i>P. viburni</i>	38
Discusión.....	48
Características de patogenicidad de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	48
Efecto de clorpirifós en la mortalidad de <i>Pseudococcus</i> spp.....	51
Conclusiones.....	54

Literatura Citada.....	55
ANEXO 1	61
Viabilidad de <i>B. bassiana</i> S. (prueba de pureza)	61
Procedimiento.....	61
ANEXO 2.....	62
Fichas técnicas de materiales químicos y biológicos utilizados	62
2.1. Mycotrol	62
2.2. <i>Metarhizium anisopliae</i>	63
2.3. Lorsban 4E.....	64
2.4. TS-2035	65
ANEXO 3.....	66
Curva de calibración de ceras de hembras adultas de <i>P. viburni</i> , determinada mediante espectrofotometría UV/VIS	66
APÉNDICE 1	67
Resultados de análisis estadísticos	67
1.1. Mortalidad por efecto de TS-2035.....	67
1.2. Mortalidad por efecto de Mycotrol.....	67
1.3. Mortalidad por efecto de Lorsban 4E (clorpirifós 48% p/v)	68
1.4. Mortalidad por efecto de <i>M. anisopliae</i>	69
1.5. Pruebas de germinación y esporulación	69
1.6. Cálculos de CL ₅₀ de Mycotrol.....	71
1.7. Cálculos de CL ₅₀ de Lorsban 4E (clorpirifós 48% p/v)	72
1.8. Cálculos de CL ₅₀ de <i>M. anisopliae</i>	73
1.9. Cálculo de remoción de ceras mediante espectrofotometría	74
2.0. Evaluaciones de pH.....	74
APÉNDICE 2	77
Registro gráfico del espectro UV contra muestra de cera removida en 1 mL de cloroformo (CHCl ₃).....	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Valores de pH de Mycotrol (% v/v) con y sin TS-2035 al 0,001% (v/v).	33
Cuadro 2. Concentraciones letales medias (CL ₅₀) en UFC (viables) mL ⁻¹ del insecticida Mycotrol (% v/v) con y sin TS-2035 al 0,001% (v/v), registradas a las 24 y 72 h.	33
Cuadro 3. Valores de pH de clorpirifós (48% p/v) con y sin TS-2035 (0,001% v/v).	38
Cuadro 4. Concentraciones letales medias, para cada repetición, del clorpirifós (48% p/v) con y sin TS-2035 (0,001% v/v).	38
Cuadro 5. Valores de pH de <i>M. anisopliae</i> (% p/v) con y sin TS-2035 al 0,001% (v/v). ...	46
Cuadro 6. Concentraciones letales medias (CL ₅₀) en UFC (viables) mL ⁻¹ de <i>M. anisopliae</i> con y sin TS-2035 al 0,001% v/v.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Hembras adultas de *P. viburni* consideradas muertas 24 h post exposición a la concentración crítica de detergente por sí sola (A), en mezcla con Mycotrol ($1,7 \times 10^6$ UFC mL⁻¹) (B), en mezcla con clorpirifós (576 ppm) (C), y en mezcla con *M. anisopliae* (D). . 22
- Figura 2. Hembra adulta de *P. viburni* con esporulación de *B. bassiana* cubriendo aproximadamente el 30% (A), 70% (B), y 100% de su cuerpo (C), a las 24, 72 y 168 h en cámara húmeda, respectivamente. Ejemplo de individuos considerados “con esporulación”.
..... 23
- Figura 3. Mortalidad (%) de hembras adultas de *P. viburni* expuestas a distintas concentraciones de detergente agrícola TS-2035, registrada a las 24 h (A) y 72 h (B). Letras distintas en columnas de cada tiempo evaluado indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$). 25
- Figura 4. Promedio de pH para las distintas concentraciones utilizadas de TS-2035 (% v/v). Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica de Friedman ($p < 0,05$). 26
- Figura 5. Cera remanente (% p/p) de hembras adultas de *P. viburni* expuestas a TS-2035 (% v/v). Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$). 26
- Figura 6. Mortalidad (%) de hembras adultas de *P. viburni* expuestas a diferentes concentraciones de Mycotrol (% v/v), registrada a las 24 h (A) y 72 h (B). 100% equivale a $1,7 \times 10^6$ UFC (viables) mL⁻¹. Letras distintas en columnas de cada tiempo evaluado indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba no paramétrica de Friedman ($p < 0,05$). 27
- Figura 7. Probit de la mortalidad en hembras adultas de *P. viburni* a diferentes concentraciones de Mycotrol (% v/v), registrado a las 24 h (A) y 72 h (B), con un 5% de significancia..... 28
- Figura 8. Esporulación de *B. bassiana* y remoción de cera en hembras adultas de *P. viburni*, registradas luego de 144 h en cámara húmeda, en contraste con la mortalidad registrada a las 72 h, al ser expuestas a los tratamientos con Mycotrol (% v/v). Letras distintas en columnas del mismo color indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). 29
- Figura 9. pH de las concentraciones de Mycotrol (% v/v). Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$)..... 29
- Figura 10. Mortalidad (%) de hembras adultas de *P. viburni* expuestas a diferentes concentraciones de Mycotrol (% v/v) con TS-2035 al 0,001% (v/v), registrada a las 24 h

(A) y 72 h (B). 100% equivale a $1,7 \times 10^6$ UFC (viables) mL^{-1} . Letras distintas en columnas de cada tiempo evaluado indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Friedman ($p < 0,05$). 30

Figura 11. Probit de la mortalidad en hembras adultas de *P. viburni* a diferentes concentraciones de Mycotrol (% v/v) con 0,001% (v/v) de TS-2035, registrada a las 24 h (A) y 72 h (B), con un 5% de significancia..... 31

Figura 12. Esporulación de *B. bassiana* y remoción de cera en hembras adultas de *P. viburni* a diferentes concentraciones de Mycotrol (% v/v) con 0,001% (v/v) de TS-2035, registradas luego de 144 h en cámara húmeda, y contrastadas con la mortalidad a las 72 h. Letras distintas, en columnas del mismo color, indican diferencias significativas según la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$)..... 32

Figura 13. Germinación de *B. bassiana* en Agar Papa Dextrosa (PDA) a 20 °C, registrada a las 36 h. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$). 32

Figura 14. Mortalidad (%) de hembras adultas de *P. viburni* expuestas a diferentes concentraciones de clorpirifós (48% p/v), registrado a las 24 h (A) y 72 h (B). 100% = 1,2 mL p.c./L agua. Letras distintas en columnas de cada tiempo evaluado indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba no paramétrica de Friedman ($p < 0,05$)... 34

Figura 15. Probit de la mortalidad hembras adultas de *P. viburni* a diferentes concentraciones de clorpirifós (48% p/v), registrada a las 24 h (A) y 72 h (B), con un 5% de significancia..... 35

Figura 16. Promedio de pH para las distintas concentraciones de Lorsban 4E (100% v/v = 1,2 mL p.c./L agua). Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$)..... 35

Figura 17. Mortalidad (%) de hembras adultas de *P. viburni* expuestas a diferentes concentraciones de clorpirifós (48% v/v) con 0,001% v/v de TS-2035, registrado a las 24 h (A) y 72 h (B). 100% = dosis recomendada de 1,2 mL p.c./L agua). Letras distintas en columnas de cada tiempo de evaluación indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). 36

Figura 18. Probit de la mortalidad de hembras adultas de *P. viburni* a diferentes concentraciones de clorpirifós (48% p/v) con 0,001% v/v de TS-2035, registrada a las 24 h (A) y 72 h (B), con un 5% de significancia..... 37

Figura 19. Mortalidad (%) de hembras adultas de *P. viburni* expuestas a diferentes concentraciones de *M. anisopliae* (% p/v), registrado a las 24 (A), 72 (B) y 144 h (C). 100% = $3,7 \times 10^7$ UFC (viables) mL^{-1} . Letras distintas en columnas de cada período de evaluación indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$). 39

Figura 20. Probit de la mortalidad hembras adultas de <i>P. viburni</i> a diferentes concentraciones de <i>M. anisopliae</i> (% p/v), registrada a las 24 (A), 72 (B) y 144 h (C) con un 5% de significancia.	40
Figura 21. Esporulaci3n de <i>M. anisopliae</i> en hembras adultas de <i>P. viburni</i> , registrada en c3mara h3meda 13 d3as post exposici3n, en contraste con la mortalidad registrada a las 144 h. Letras distintas indican diferencias estad3sticamente significativas, seg3n la prueba de Tukey ($p < 0,05$).	41
Figura 22. PH para las concentraciones de <i>M. anisopliae</i> (% p/v). 100% = $3,7 \times 10^7$ UFC (viables) mL ⁻¹ . Letras distintas indican diferencias significativas seg3n la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$).	42
Figura 23. Mortalidad (%) de hembras adultas de <i>P. viburni</i> expuestas a distintas concentraciones de <i>M. anisopliae</i> (% p/v) con TS-2035 al 0,001% (v/v), registrada a las 24 h (A), 72 h (B) y 144 h (C). 100% = $3,7 \times 10^7$ UFC (viables) mL ⁻¹ . Letras distintas en columnas de cada tiempo evaluado indican diferencias significativas, seg3n la prueba de Friedman ($p < 0,05$).	43
Figura 24. Probit de la mortalidad de hembras adultas de <i>P. viburni</i> a diferentes concentraciones de <i>M. anisopliae</i> (% p/v) con 0,001% (v/v) de TS-2035, registrada a las 24 (A), 72 (B) y 144 h (C), con un 5% de significancia.	44
Figura 25. Esporulaci3n de <i>M. anisopliae</i> y remoci3n de cera en hembras adultas de <i>P. viburni</i> a diferentes concentraciones (% p/v) con 0,001% v/v de TS-2035, registradas en c3mara h3meda 13 d3as post exposici3n, y contrastadas con la mortalidad a las 144 h. 100% = $3,7 \times 10^7$ UFC (viables) mL ⁻¹ . Letras distintas, en columnas de un mismo color, indican diferencias significativas seg3n la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$).	45
Figura 26. Germinaci3n de <i>M. anisopliae</i> (%), registrada a los 6 d3as de incubaci3n en PDA a 20° C. Letras iguales indican diferencias no significativas seg3n el ANDEVA ($p < 0,05$).	46

CAPÍTULO I: MONOGRAFÍA

**INTEGUMENTO DE *PSEUDOCOCCUS* SPP. Y SU ROL FRENTE A LA
EXPOSICIÓN A DETERGENTES AGRÍCOLAS, INSECTICIDAS
CONVENCIONALES Y HONGOS ENTOMOPATÓGENOS.**

Revisión Bibliográfica

Características generales de la familia *Pseudococcidae*

En Chile, los chanchitos blancos (Hemiptera: Pseudococcidae) son una plaga clave, es decir, deben ser controlados todas las temporadas, con aplicaciones de insecticidas u otras estrategias, debido al daño directo e indirecto que causan, especialmente los importantes rechazos cuarentenarios. Los chanchitos blancos se caracterizan por producir secreciones cerosas integumentarias pulverulentas (Cox y Pearse, 1983) y filamentos, que cubren sus cuerpos y les dan un aspecto blanquecino-harinoso. Ripa y Rodríguez (1999) creen que estas ceras ayudan a mantenerlos fuera del contacto con la mielecilla que secretan y a protegerlos de la deshidratación. Adicionalmente, protegen las masas de huevos y de ninfas neonatas. En la mayoría de las especies, la cera es secretada por poros esclerosados, que actúan como molde, que dan distintas formas a los filamentos (Cox y Pearse, 1983).

Los pseudocócidos son insectos de tamaño pequeño y cuerpo blando y ovalado, de notable simetría corporal, generalmente recubiertos de una secreción cerosa blanca, hembras ápteras y machos generalmente macrópteros, de alimentación floemática cuyo proceso alimentario y de desarrollo puede también verificarse paralelamente en la parte aérea y/o subterránea de la planta. Son especies gregarias (aunque no forman verdaderas colonias) que se manifiestan como grupos de individuos blancos, lanosos, muchas veces con producción de mielecilla. Su estructura externa se caracteriza por su cuerpo ancho o estrechamente ovalado, con división corporal poco evidente entre la cabeza y el tórax, siendo los segmentos torácicos proporcionalmente de mayor desarrollo que los abdominales (González, 2011).

Su desarrollo involucra 3 estados ninfales en la hembra y 4 en el macho, pudiendo cumplir con 3 a 5 generaciones anuales, sea en el ambiente hipógeo alimentándose del sistema radicular o en la porción aérea de la planta. El estudio morfológico macroscópico revela que las formas del cuerpo presentan características que ayudan a definir particularmente la especie (González, 2011).

Las hembras de las especies pertenecientes a la familia *Pseudococcidae* tienen el cuerpo blando, ovalado y relativamente aplanado, patas pequeñas y tamaño entre 3 y 4 mm de largo (Ripa y Rodríguez, 1999). Presentan 16 a 17 pares de cerarios, en correspondencia con los filamentos marginales, caudales y paracaudales. Los cerarios son estructuras que consisten en pares de cetas cónicas, cortas, rodeadas por grupos de poros secretores, que se encuentran en los márgenes del cuerpo (Cox y Pearse, 1983), encargados de la secreción de cera. Adicionalmente, las hembras poseen una gran cantidad de poros secretores de cera, distribuidos tanto en la zona ventral como en la dorsal (González, 2011).

Mantención y comportamiento de colonias de *Pseudococcus spp.* en laboratorio

Las especies de *Pseudococcus spp.*, en especial *P. viburni* y *P. longispinus*, presentan versatilidad para adaptarse en condiciones de laboratorio. La crianza se realiza principalmente sobre brotes etiolados de papas, lo que hace muy sencilla la observación de las colonias. Los tubérculos, completos, y sin lesiones son primeramente inducidos a

producir brotes blancos (etiolados) en salas de ambiente frío, no expuestos a la luz. Sin exigir temperaturas muy precisas, se ha logrado determinar que ambientes oscuros a temperaturas de $12 \pm 5^{\circ}\text{C}$ son los que más rápidamente provocan la emisión de brotes. El tubérculo de cosecha reciente, lavado y escobillado, sin heridas, puede ser mantenido sobre mesones durante 3 a 4 meses, y se usan a medida que los brotes alcanzan unos 2 a 3 cm de largo (González, 2011).

Para evitar la emigración de los ejemplares, las colonias deben mantenerse escasamente expuestas a la luz. Un tubérculo con brotes etiolados recientes y turgentes puede soportar poblaciones de hasta 500 neonatos por unidad y un número mucho menor de estadios intermedios y adultos en la medida que las cajas de cultivo se mantengan con ventilación, sin luz y temperaturas máximas de unos $20\text{-}22^{\circ}\text{C}$. Colocar arena seca bajo los tubérculos previene la acumulación de humedad o mielecilla que algunas especies secretan, como también, al menos en el caso de *P. viburni*, favorece la formación de capullos pupoides de machos, los que buscan la menor cantidad posible de luz para completar su metamorfosis, generalmente en la parte basal del tubérculo (González, 2011).

Integumento de los insectos

El integumento es la capa externa del insecto, característica particular de los artrópodos y es, por mucho, responsable del éxito de los insectos como animales terrestres. Los insectos poseen un exoesqueleto, formado por tres estratas: la membrana basal, la epidermis y la cutícula. Esta última es una capa lipofílica, continua, no celular, formada por varias partes claramente definidas, que recubre la epidermis. La epidermis, es la capa de células más externa del insecto. Sus células son glandulares que producen y secretan múltiples sustancias, incluyendo las relacionadas con la muda, feromonas y ceras. En la epidermis se encuentran también mecano y quimio-receptores (Chapman, 1998).

Cutícula

La cutícula es una secreción de la epidermis y cubre la totalidad del cuerpo exterior así como también invaginaciones ectodermales lineales como el estomodeo, proctodeo y sistema traqueal. Se diferencia en dos regiones mayores: una interna de hasta $200\ \mu\text{m}$ de grosor, denominada procutícula, y otra delgada región externa de $1\text{-}4\ \mu\text{m}$, conocida como epicutícula, que se compone de proteínas y ceras, sin quitina. Algunos insectos poseen una delgada capa de cemento sobre la capa de la cera, posiblemente constituida por mucopolisacáridos, los cuales se asocian con lípidos, y que pueden servir para proteger la cera, aunque en ocasiones se presenta como una malla abierta (Chapman, 1998).

La procutícula se compone principalmente de lípidos. Wigglesworth (1988) cree que estos lípidos, junto con las proteínas esclerotizadas, juegan un rol importante en el endurecimiento de la cutícula.

La epicutícula está formada por varias capas. La más gruesa, de $0,5$ a $2,0\ \mu\text{m}$ de grosor, es la epicutícula interna inmediatamente por fuera de la procutícula. Externa a ésta, se encuentra una muy delgada epicutícula exterior, de sólo unos $15\ \text{nm}$ de grosor, y a su vez,

externamente a ella, existe una capa cerosa de grosor variable. La cera epicuticular es normalmente una mezcla de compuestos de cadena larga, que incluyen: hidrocarburos (saturados, insaturados y ramificados), ésteres de ácidos grasos con alcoholes, ácidos grasos libres, alcoholes, cetonas, aldehídos y compuestos cíclicos (Hadley, 1981). La composición y grosor de las capas de cera depende de la especie, tejido y su estado de desarrollo.

Los hidrocarburos de la capa cerosa están universalmente presentes, y pueden comprender más del 90% de la cera. La longitud de las cadenas es de 12 a 50 o más átomos de carbono. La cera es importante en proteger la cutícula mediante resistencia a la pérdida de agua, y en algunos insectos, es la fuente de importantes señales químicas intra e interespecíficas. Los componentes céreos se sintetizan en los oenocitos. Estos componentes son transportados en la hemolinfa mediante lipoporinas, desde éstas células hacia la epidermis (Chapman, 1998). La cera depositada sobre la cutícula, o embebida en ella, es responsable de la protección contra la deshidratación de los insectos (Hadley, 1981), aunque también participa en la comunicación química, defensa, control de temperatura, entre otros (Toro *et al.*, 2003), lo que depende de la estructura física y del ordenamiento de los lípidos depositados, su cantidad y composición química. Adicionalmente, la cera afecta la penetración de insecticidas (Hadley, 1981). La cera es secretada al exterior de la cutícula aproximadamente al momento de la ecdisis y su producción y secreción probablemente continúa a través de casi el período total de la muda (Chapman, 1998).

Funciones de la cutícula

La cutícula es una característica particular de los artrópodos. El exoesqueleto tubular de las piernas provee gran fuerza y relativa ligereza comparado con el esqueleto interno de los vertebrados. Además, la presencia de apéndices duros y articulados hace posibles movimientos precisos con un mínimo de musculatura, y, al estar levantado el cuerpo del suelo, facilita el movimiento rápido. La rigidez de la cutícula, formando alas, también hace posible el vuelo. La cutícula también provee protección al reducir la pérdida de agua. Ésta también es una función de la capa cerosa, pero ambas contribuyen (Chapman, 1998), y actúan como la primera barrera contra la infección de hongos entomopatógenos y el daño por insecticidas de contacto (Pedrini *et al.*, 2007).

Técnicas de extracción y análisis de componentes epicuticulares

Los componentes epicuticulares de los insectos se extraen sumergiéndolos en un solvente o mezcla de ellos, como hexano y cloroformo, por 30 a 60 s (Nelson *et al.*, 2003; Nelson y Charlet, 2003). El análisis de la solución se puede hacer mediante espectrofotometría UV-visible (Christie, 2008). La espectrofotometría UV-visible se utiliza para identificar algunos grupos funcionales de moléculas (o cromóforos) y además, permite cuantificar la concentración del analito. El principio es que todas las sustancias absorben energía radiante, en diferentes longitudes de onda, con distintos máximos de absorción. Mediante este método, es posible comparar el espectro de absorción de compuestos diferentes, ya que la absorbancia de una muestra es proporcional a su concentración molar (Reusch, 1999). La espectrofotometría permite determinar la concentración de, en este caso, la cera o lípido extraído. El espectrofotómetro registra las longitudes de onda a las cuales ocurre la absorción y el nivel de absorción de cada longitud, información que se presenta como un

gráfico de absorbancia (A) versus longitud de onda (Reusch, 1999). A su vez, este instrumento puede arrojar como resultado la transmitancia (T) de la muestra, que es la fracción de radiación incidente que se transmite en la solución (Skoog *et al.*, 2005), valor que fluctúa entre 0 y 100%. La absorbancia se relaciona de forma inversamente proporcional con la transmitancia, de manera logarítmica (Skoog *et al.*, 2005), por lo que sus valores fluctúan entre 0 y 2. Este método se rige por la ley de Beer – Lambert, en el que la absorbancia de la muestra se correlaciona directamente con su concentración, con la longitud del trayecto del medio de absorción y una constante de proporcionalidad, denominada absorptividad. Esta constante, en el punto máximo de absorción, es característica de cada sustancia, y se puede estimar mediante la construcción de una curva de calibración (Skoog *et al.*, 2005).

Insecticidas sintéticos y hongos entomopatógenos

Clorpirifos

Pertenece al grupo químico de los organofosforados (Ulloa, 2010), el cual tiene actividad neurotóxica. Es un insecticida de contacto, con baja solubilidad en agua, alta en solventes orgánicos, $\log K_{ow}$ $5,0 \pm 0,3$ (Racke, 1993; EFSA, 2005; PPDB, 2012; Gebremariam *et al.*, 2012) y presión de vapor intermedia (1,43 mPa a 25°C) (PPDB, 2012). Estas características le permiten persistir por períodos relativamente prolongados en el substrato confiriéndole un efecto de protección en el tiempo (efecto residual). El valor de $\log K_{ow}$ indica una alta afinidad a los lípidos (CCME, 2008), lo que facilita su ingreso en organismos con superficies cerosas ante la exposición tópica o residual de contacto, por lo que es frecuentemente usado contra diferentes grupos de plagas pertenecientes al orden Hemiptera. Para el control de chanchitos en cítricos en Chile, se ha recomendado aplicar clorpirifos apenas se detecten los primeros individuos, si la producción es para la exportación. El clorpirifos es menos selectivo para enemigos naturales, en cítricos, sin embargo, protege el fruto por un período mayor de tiempo que el aceite (que no presenta efecto residual) y se deberá preferir ante ataques más intensos (Ripa y Rodríguez, 1999).

Según Ulloa (2010), los insecticidas Lorsban® 50 WP (Dow), que contiene clorpirifos como ingrediente activo; además de Confidor® Forte 200 SL (Bayer), ingrediente activo imidacloprid; y Movento® 240 SC (Bayer), ingrediente activo espirotetramato; aplicados en arándano sobre ninfas de segunda generación de *P. viburni* en primavera, disminuyen significativamente las poblaciones del chanchito blanco con respecto al testigo no tratado. No obstante, no todos ellos son efectivos al nivel requerido. El mismo autor señala además que sólo la aplicación de imidacloprid (Confidor Forte 200 SL 80 a 100 mL hL⁻¹) y espirotetramato (Movento 240 SC 40 mL hL⁻¹), aplicados a fines de primavera, controlan totalmente a *P. viburni* a nivel de racimos. En los ensayos realizados al momento de la cosecha sólo con imidacloprid (Confidor Forte 200 SL) se logra obtener cero detecciones de *P. viburni*, lo que en términos prácticos significa evitar un rechazo cuarentenario. Salazar *et al.* (2010), recomiendan utilizar insecticidas como buprofezin, clorpirifos, diazinon y metomilo durante la etapa de dispersión de ninfas migratorias.

Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos son microorganismos patógenos de insectos, los cuales tienen la habilidad de infectarlos, matarlos, multiplicarse en ellos y diseminarse hacia otros individuos. Juegan un rol clave en la regulación de las poblaciones de insectos en la naturaleza (Charnley, 1997; Mohammadbeigi and Port, 2013) y no representan una amenaza para organismos benéficos ni organismos plaga que no se desea controlar, ya que son específicos (Salazar *et al.*, 2010).

El control biológico con hongos entomopatógenos (control microbiológico) ha sido desarrollado ampliamente en el mundo y actualmente es parte importante dentro del manejo integrado de plagas agrícolas, en particular por su selectividad, inocuidad y complejo mecanismo de infección. Las especies de hongos entomopatógenos más estudiadas a nivel mundial corresponden a *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin y *Beauveria bassiana* (Bals.) (Fungi, Ascomycota: Hypocreales), las cuales son capaces de atacar diversos tipos de ácaros e insectos, en diferentes estados de desarrollo (Salazar *et al.*, 2010).

El principal medio de dispersión de estos hongos es su unidad infectiva y de reproducción, la conidia, de color verde para *M. anisopliae* y blanca para *B. bassiana*; que posee una alta capacidad de diseminación y multiplicación en el hospedero, lo que permite su persistencia en el tiempo (Salazar *et al.*, 2010). Las conidias pueden penetrar al interior del insecto a través de los espacios intersegmentales, vía tracto digestivo o adhiriéndose a la cutícula del insecto formando un tubo germinativo y un apresorio para luego penetrar debido a la presión física ejercida y a la degradación enzimática producida por el hongo (Vicentini and Magalhães, 1996; Alves *et al.*, 2002; García *et al.*, 2005; Bai *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2013). En el interior del insecto parasitado se produce una micosis, en donde el hongo logra ramificarse y penetrar hacia diferentes órganos del insecto provocando, finalmente, su muerte. Posteriormente, el hongo emerge desde el interior como hifas dando paso a nuevas conidias que propagarán el hongo hacia otros hospederos, manteniendo así el inóculo en el ambiente (Salazar *et al.*, 2010).

Estos hongos han sido reportados como parásitos facultativos, cuyo ciclo biológico comprende dos fases: una patogénica y otra saprofitica. La fase patogénica ocurre cuando el hongo entra en contacto con el tejido vivo de los insectos en condiciones adecuadas de humedad y temperatura (Corral *et al.*, 2006; Posada y Forigua, 2011). Como patógeno de *Pseudococcus* spp., han mostrado resultados promisorios en plantas con alto grado de infestación al reducir los tamaños poblacionales, así como la infestación de los racimos de uva y la severidad con que estaban siendo afectados (Corral *et al.*, 2006; Posada y Forigua, 2011; Salazar *et al.*, 2010). También han sido utilizados con éxito contra otros hemípteros como *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) (Ibarra-Aparicio *et al.*, 2005; Posada y Forigua, 2011), *Blissus leucopterus* (Hemiptera: Lygaeidae) (Ramoska, 1984; Samuels and Araújo, 2004) y *Scaptocoris carvalhoi* (Hemiptera: Cydnidae) (Luciane-Modenez y Ávila, 2006; Posada y Forigua, 2011).

Estudios en otras especies también han sido eficaces. Se reportan en plagas agrícolas como *Phyllophaga* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae) (Poprawsky and Yule, 1991; Nájera-Rincón *et al.*, 2005), *Strymon megarus* (Lepidoptera: Lycaenidae) (Inclán *et al.*, 2007), y *Cyrtomenus bergi* (Hemiptera: Cydnidae) (Herrera *et al.*, 2001; Posada y Forigua, 2011),

entre otros, con eficacias superiores al 55% en condiciones de laboratorio y campo; algunas formulaciones granulares parecen ser promisorias contra gusanos cortadores (Lepidoptera: Noctuidae) y otros insectos que se alimentan en la superficie del suelo (van Driesche *et al.*, 2008; Posada y Forigua, 2011).

Detergentes sintéticos

En el manejo de plagas actual, se busca implementar métodos efectivos y amigables con el entorno, dando relevancia al estudio de alternativas para programas de manejo integrado, como los detergentes sintéticos, debido a su modo de acción múltiple, ausencia de efecto residual, bajo impacto ambiental, menor costo que plaguicidas convencionales, mayor grado de selectividad residual hacia enemigos naturales y menores restricciones legales y comerciales (Curkovic, 2003, Curkovic *et al.*, 2007).

Características químicas

Los detergentes pertenecen al grupo de los surfactantes o tensioactivos, es decir, sustancias que reducen la tensión superficial de las soluciones (Salager y Fernández, 2004a; Santibáñez, 2010). Los surfactantes se clasifican según su ionización en agua. De esta forma, se separan en catiónicos, aniónicos y anfóteros. Estos últimos actúan como aniónicos o catiónicos en función de la acidez de la solución (Hassall, 1990; García *et al.*, 2003). Los surfactantes se clasifican como agentes de enlace, emulsionantes, dispersantes, agentes mojables, penetrantes y detergentes (García *et al.*, 2003; Santibáñez, 2010).

Los detergentes sintéticos, en su mayoría, son del tipo n-alkil-aril sulfonatos lineales, cuyo núcleo aromático suele ser benceno (Salager y Fernández, 2004b; Santibáñez, 2010), formados a través de alquilación y sulfonación del núcleo aromático (Salager, 2002; Santibáñez, 2010). El ingrediente activo es una molécula compuesta por una cadena de hidrocarbonada ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n$) larga, apolar, lipofílica y de un extremo polar, hidrofílico. Esta característica les otorga dos importantes propiedades, ya que estabilizan emulsiones y suspensiones y reducen la tensión superficial de la solución (Hassall, 1990; Santibáñez, 2010).

La emulsión de compuestos inmiscibles es posible, porque en medio acuoso estas sustancias forman micelas, es decir, varias moléculas del detergente se unen a través de su extremo lipofílico a una grasa, y la dejan aislada en el centro de una esfera, cuya superficie externa (extremo hidrofílico) permite su disolución en agua, mediante puentes de hidrógeno (Hassall, 1990; García *et al.*, 2003; Santibáñez, 2010). La reducción de la tensión superficial se debe a que al mezclar un surfactante con agua, la fuerza de cohesión entre las moléculas de agua es, en parte, reemplazada por la baja fuerza de adhesión entre las moléculas del surfactante y del agua. De esta forma las moléculas de agua se separan y generan un efecto de “rompimiento” de las gotas (Hassall, 1990; Santibáñez, 2010).

Modo de acción de los detergentes como insecticidas:

Los detergentes actúan por contacto; no tienen efecto residual y, usualmente, no son selectivos por acción tóxica hacia algunos enemigos naturales (Cloyd, 2007). Los

artrópodos pequeños y de cuerpo blando como áfidos, chanchitos blancos, psílicos, arañas, mosquitas blancas y estados juveniles de escamas y conchuelas son los más susceptibles a estas sustancias (Marer *et al.*, 1988; Cloyd, 2006; Cranshaw, 2006; Cloyd, 2007; Santibáñez, 2010). Adicionalmente, la literatura señala que la capacidad de los surfactantes para solubilizar ciertos lípidos depende tanto del largo de la cadena de su agente activo como del lípido en cuestión (Lim and Laurence, 2004 citados por Santibáñez, 2010).

Si bien, hasta el momento no se conoce con certeza su modo de acción, se ha señalado que el efecto plaguicida de los detergentes se atribuye a varios mecanismos. Entre ellos, se menciona la remoción de las ceras epicuticulares, lo que generaría la muerte de los individuos al dejarlos desprotegidos y vulnerables a condiciones ambientales adversas (Curkovic, 2003), así como al ataque de patógenos y a la acción de insecticidas (Pedrini *et al.*, 2007). Incluso, los detergentes, en concentraciones elevadas, podrían traspasar la cutícula, disolviendo los lípidos de las membranas celulares, y causar la muerte (Ware, 1994; Zeiss y Den Braber, 2001; Cranshaw, 2006; Cloyd, 2007; Santibáñez, 2010). Adicionalmente, al tener una menor tensión superficial, la solución podría penetrar a través de los espiráculos y limitar el intercambio gaseoso, generando un ahogamiento (Ware, 1994) o remover individuos desde una superficie (Curkovic y Araya, 2004).

Efectos en la mortalidad de *P. viburni*

Todo lo anteriormente señalado permite suponer que la aplicación de insecticidas en mezcla con detergentes agrícolas (actuando como coadyuvantes) aumentaría la mortalidad de estos insectos, ya que al estar removidos de su cera integumentaria, verían mermada su capacidad de protección, quedando vulnerables a la acción de microorganismos, como los entomopatógenos, y compuestos químicos nocivos, como los insecticidas de contacto.

Literatura Citada

- Alves S.; L. Rossi; R. Lopes; M. Tai and R. Pereira. 2002. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 8:70-77 pp.
- Bai, N.; T. Sasidharan; O. Remadevi; P. Rajan and M. Balachander. 2010. Virulence of *Metarhizium* isolates against the polyphagous defoliator pest, *Spilarctia obliqua* (Lepidoptera; Arctiidae). *Journal of Tropical Forest Science* 22(1):74-80 pp.
- Burett, G. 2005. Evaluación de dos detergentes agrícolas sobre ninfas de segundo estado y hembras de *Pseudococcus longispinus* (Targioni & Tozzetti) en laboratorio. Memoria de Título Ing. Agr. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Santiago. 33p.
- CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment). 2008. Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: Chlorpyrifos. In: Canadian environmental quality guidelines, 1999, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg. Available at <http://ceqg-rcqe.ccme.ca/download/en/164>. Consultado el 20 de Julio del 2015.
- Chapman, R. 1998. Integument. The insects. Structure and function. Cambridge University Press. 4ta. Ed. EE. UU. pp 415-440.
- Charnley, A. 1997. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: Wicklow DT, Soderstorm BE. (eds) *The Mycota IV Environmental and Microbial Relationships*, Springer, Heidelberg. pp 185-201.
- Christie, W. 2008. Waxes: structure, composition, occurrence and analysis. The Lipid Library. Disponible en: <http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/waxes/>. Consultado el 13 de agosto 2014.
- Cloyd, R. 2006. No lave su cultivo usando jabones. *Grower Talks* 67(12): 56-58.
- Cloyd, R. 2007. Soaps and detergents: should they be used on roses? 4p. Available at: <http://www.rose.org/soaps-and-detergents-should-they-be-used-on-roses/>. Consultado el 30 de agosto del 2014.
- Corral, G.; A. Romero; C. Radrigán y T. Zaviezo. 2006. Las virtudes de los hongos entomopatógenos. *Revista de Agronomía y Forestal* 30: Chile. pp 12-15. Disponible en línea: http://www.puc.cl/agronomia/c_extension/Revista/Ediciones/30/hongos.pdf.
- Cox, J. and M. Pearse. 1983. Wax produced by dermal pores in three species of mealybugs (Homoptera: Pseudococcidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 12(4): 235-248.

Cranshaw, W. 2006. Insect control: soap and detergents. Available at: www.ext.colostate.edu/PUBS/insect/05547.html. Consultado el 30 de agosto del 2014.

Curkovic, T. 2003. Control de plagas de frutales con detergentes. *Aconex* 81: 18-23.

Curkovic, T. and J. Araya. 2004. Acaricidal action of two detergents against *Panonychus ulmi* (Koch) and *Panonychus citri* (McGregor) (Acarina; Tetranychidae) in the laboratory. *Crop Protection* 23(8): 731-733.

Curkovic, T.; G. Burett and J. Araya. 2007. Evaluation of the insecticide activity of two agricultural detergents against the long-tailed mealybug, *Pseudococcus longispinus* (Hemiptera: Pseudococcidae), in the laboratory. *Agricultura Técnica* 67(4): 422-430.

EFSA, 2005. Review report for the active substance chlorpyrifos. SANCO/3059/99-rev. 1.5 (3). European Food Safety Authority. http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=activesubstance.selection. Consultado el 20 de Julio del 2015.

García M.; A. Monteiro; M. Szabo; N. Pretti and G. Bechara. 2005. Mechanism of infection and colonization of *Rhipicephalus sanguineus* eggs by *Metarhizium anisopliae* as revealed by scanning electron microscopy and histopathology. *Brazilian Journal of Microbiology* 36: 368-372.

García, B.; O. Bortolussi y L. Blatner de Mayoral. 2003. Formulaciones y Adyuvantes. E.E.A. Anguil INTA, Argentina. 28p.

Gebremariam S.; M. Beutel; D Yonge; M. Flury and J. Harsh. 2012. Adsorption and desorption of chlorpyrifos to soils and sediments. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 215:123-175.

González, R. 2011. Pseudocóccidos de importancia frutícola en Chile. Publicaciones en Ciencias Agrícolas N° 18. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile, Chile. 186p.

Hadley, N. 1981. Cuticular lipids of terrestrial plants and arthropods: a comparison of their structure, composition, and waterproofing function. *Biological reviews* 56(1): 23-47.

Hassal, K. 1990. Biochemistry and use of pesticides. Mc Millan Press Ltd., London, UK. pp 50-53.

Herrera, C.; A. Caicedo y A. Bellotti. 2001. Avances en el manejo integrado de *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae), chinche de la viruela, en el cultivo de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Unidad de Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades. Proyecto CIAT. Cali, Colombia. 5p.

Ibarra-Aparicio, G.; G. Moya-Raygoza y A. Berlanga-Padilla. 2005. Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la chicharrita del maíz (*Dalbulus maidis*) (Hemiptera: Cicadellidae). *Folia Entomológica Mexicana* 44(1): 1-6.

Inclán, D.; E. Alvarado y R. Williams. 2007. Evaluación de cuatro insecticidas naturales para control de Tecla, *Strymon megarus* (Godart) (Lepidoptera: Lycaenidae) en el cultivo de piña. *Tierra Tropical* 3(2): 199-210.

Luciane-Modenez, S. y J. Ávila. 2006. Patogenicidad de aislados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin a *Scaptocoris carvalhoi* Becker (Hemiptera: Cydnidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 50(4):540-546.

Marer, P.; M. Flint and M. Stimmann. 1988. The safe and effective use of pesticides. Univ. California, Statewide IPM Project, Division of Agriculture & Natural Resources, Oakland, California, Publication 3324. (90): 114-115.

Mohammadbeigi, A and G. Port. 2013. Efficacy of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Uvarovistia zebra* (Orthoptera: Tettigoniidae) via contact and ingestion. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 5(2): 138-146.

Nájera-Rincón, M; M. García; R. Crocker; V. Hernández-Velázquez y L. Rodríguez del Bosque. 2005. Virulencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, nativos del occidente de México, contra larvas de tercer estadio de *Phyllophaga crinita* (Coleoptera: Melolonthidae) bajo condiciones de laboratorio. *Fitosanidad* 9(1): 33-36.

Nelson, D. and L. Charlet. 2003. Cuticular hydrocarbons of the sunflower beetle, *Zygogramma exclamationis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* Part B 135: 273 – 284.

Nelson, D.; T. Adams and C. Fatland. 2003. Hydrocarbons in the surface wax of eggs and adults of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Comparative Biochemistry and Physiology* Part B 134: 447-466.

Pedrini, N.; R. Crespo y M. Juárez. 2007. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemical and Physiology* 146(1-2): 124-137.

Poprawsky, T. and W. Yule. 1991. Incidence of Fungi in Natural Population of *Phyllophaga* spp. and Susceptibility of *Phyllophaga anxia* (LeConte) (Col., Scarabaeidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina), *Journal of Applied Entomology* 112: 359-365.

Posada, R. y L. Forigua. 2011. Eficacia de dos hongos entomopatógenos para el control de *Pseudococcus* spp. Ed. Bogotá: Jardín Botánico José Celestino Mutis, pp. 141-151.

PPDB. 2012. Pesticide Properties DataBase, University of Hertfordshire. Available at <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/154.htm>. Consultado el 20 de Julio del 2015.

Racke, K. 1993. Environmental fate of chlorpyrifos. *Review of Environmental Contamination and Toxicology* 131:1-150.

Ramoska, W. 1984. The influence of relative humidity on *Beauveria bassiana* infectivity and replication in the chinch bug, *Blissus leucopterus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 43: 389-394.

Reusch, W. 1999. Ultraviolet – Visible Spectroscopy. Available at: <http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/UV-Vis/spectrum.htm#uv1>. Consultado el 18 de agosto 2014.

Ripa, R. y F. Rodríguez. 1999. Plagas de cítricos, sus enemigos naturales y manejo. Colección Libros INIA N°3, Santiago, Chile, 151p.

Salager, J. 2002. Tipos y usos. Surfactantes. Cuaderno FIRP S300 – A. Módulo de Enseñanza en Fenómenos Interfaciales. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela, 54p.

Salager, J. y A. Fernández. 2004a. Generalidades y materias primas. Surfactantes. Cuaderno FIRP S301-PP, Módulo de Enseñanza en Fenómenos Interfaciales. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela, 24p.

Salager, J. y A. Fernández. 2004b. Surfactantes aniónicos. Surfactantes. Cuaderno FIRP S302-PP, Módulo de Enseñanza en Fenómenos Interfaciales. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela, 30p.

Salazar, A.; M. Gerding; P. Luppichini; R. Ripa; P. Larraín; T. Zaviezo y P. Larral. 2010. Biología, manejo y control de chanchitos blancos. Boletín INIA N° 204. Instituto de Investigaciones Agropecuarias Quilamapu. Chillán, Chile.

Samuels, R. and D. Araújo, 2004. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for the control of *Blissus antillus* (Hemiptera: Lygaeidae). *Scientia Agricola* 61(3): 271-275.

Santibáñez, D. 2010. Evaluación de la deshidratación y la remoción de ceras epicuticulares como factores asociados a la mortalidad de hembras de *Pseudococcus viburni* Signoret (Hemiptera: Pseudococcidae) tratadas con detergentes de uso agrícola. Tesis de Título Ing. Agr. y M.Sc. Mención Sanidad Vegetal. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Santiago. 56p.

Schneider, L.; C. Silva; J. Pamphile and H. Conte. 2013. Infection, colonization and extrusion of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in pupae of *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Entomology and Nematology* 5(1): 1-9.

Skoog, D.; D. West; F. Holler and S. Crouch. 2005. Introducción a las separaciones analíticas. Fundamentos de Química Analítica. 8ª ed., Thomson. Madrid, España, pp. 931 – 932.

Stahl, E. 1969. Thin – Layer Chromatography. Springer-Verlag New York Inc., pp. 374 – 379.

Toro, H.; E. Chiappa y C. Tobar. 2003. Biología de insectos. Ediciones Universitarias de Valparaíso, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile. 42p.

Ulloa, F. 2010. Efectividad de insecticidas para el control de *Pseudococcus viburni* (Hemiptera: Pseudococcidae) en arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) “Brigitta”. Tesis para obtener el grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Chile. 25p.

Van Driesche, R.; M. Hoddle y T. Center. 2008. Control de plagas y malezas por enemigos naturales. Forest Health Technology Enterprise Team. USA. p. 449.

Vicentini, S. y P. Magalhães. 1996. Infection of the grasshopper *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn by the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 25:309-314.

Ware, G. 1994. The pesticide book. Thompson Publication, California. 366p.

Wigglesworth, V. 1988. The control of pattern as seen in the integument of an insect. *Bioessays* 9(1): 23-27.

Zeiss, M. and Den Braber, K. 2001. Tea IPM Ecological Guide. Available at: www.adam-project-vietnam.net/index.../Tea%20IPM%20guide.pdf. Consultado el 01 de septiembre del 2014.

CAPÍTULO II: ARTÍCULO CIENTÍFICO

**EFFECTO DEL DETERGENTE AGRÍCOLA TS-2035 USADO COMO
COADYUVANTE DE DOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y UN
INSECTICIDA CONVENCIONAL, ASPERJADOS SOBRE HEMBRAS ADULTAS
DE CHANCHITO BLANCO DE LA VID (*Pseudococcus viburni* SIGNORET)
(HEMIPTERA: PSEUDOCOCCIDAE) EN LABORATORIO**

Resumen

Las hembras adultas de *Pseudococcus viburni* Signoret se caracterizan por producir abundantes secreciones cerosas epicuticulares. Los detergentes agrícolas remueven estas ceras, dejándolas vulnerables a patógenos e insecticidas. En el presente trabajo se realizaron ensayos en laboratorio con el detergente agrícola TS-2035[®], los insecticidas Lorsban 4E[®] (clorpirifós 48% p/v), Mycotrol[®] (*Beauveria bassiana* Vuillemin 11,3% p/v), y el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* Sorokin. Los tratamientos consistieron en la aspersión del detergente en concentraciones en escala logarítmica y un testigo (agua destilada), sobre 20 de estos insectos, en placas Petri, con cuatro repeticiones, utilizando una torre de Potter, hasta encontrar una concentración que no causó mortalidad significativa (0,001% v/v). Además, se procedió a encontrar la concentración letal 50 (CL₅₀) de cada insecticida solo y con esta concentración de detergente, desde la dosis recomendada y disminuyendo en escala logarítmica hasta en cuatro órdenes de magnitud. La mortalidad de los insectos fue evaluada a las 24, 72 y 144 h post exposición. Bajo estas condiciones, la adición de detergente disminuye significativamente la CL₅₀ de Lorsban y *M. anisopliae* en todos los tiempos evaluados, en cambio, con Mycotrol, ésta disminuyó sólo a las 72 h. Finalmente, según estos resultados, resulta promisorio evaluar estos tratamientos en campo.

Palabras clave:

Integumento de insectos, manejo integrado de plagas, toxicología.

Abstract

Adult females of *Pseudococcus viburni* Signoret are well known for its production of abundant waxy epicuticular secretions. Agricultural detergents remove these waxes leaving them unprotected and vulnerable to environmental conditions, pathogens and pesticides. In this study, laboratory assays were carried out using the detergent TS-2035[®], the pesticides Lorsban 4E[®] (chlorpyrifos 48% w/v), Mycotrol[®] (*Beauveria bassiana* Vuillemin 11,3% w/v), and the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* Sorokin. The treatments consisted in detergent sprays in logarithmic scale concentrations and a control (distilled water), sprayed on 20 of these insects, placed in Petri dishes, with four replicates, using a Potter tower, until finding a concentration unable to cause a significant mortality (0,001% v/v). Besides, the median lethal concentration (LC₅₀) was calculated for each pesticide, with and without this detergent concentration, starting from the recommended dose and decreasing it, in logarithmic scale, up to four orders of magnitude. The insect mortality was assessed at 24, 72 and 144 h postexposure. Under these conditions, the addition of detergent significantly decreases LC₅₀ of Lorsban and *M. anisopliae* in all times evaluated, however, with Mycotrol it decreased only at 72 h. Finally, according to these results, it is promising to evaluate these treatments in field assays.

Keywords:

Insect integument, integrated pest management, toxicology.

Introducción

En el manejo de plagas actual, se busca implementar métodos efectivos y amigables con el entorno, dando relevancia al estudio de alternativas para programas de manejo integrado de plagas (MIP), como los detergentes sintéticos, debido a su modo de acción, relativamente bajo impacto ambiental, menor costo que plaguicidas convencionales, menores restricciones legales y ausencia de efecto residual (Curkovic, 2003; Curkovic *et al.*, 2007).

El chanchito blanco de la vid (*Pseudococcus viburni* Signoret), es un insecto cuarentenario de gran importancia económica para nuestro país al encontrarse en fruta de exportación y ser causa de rechazos al detectarlos en fruta fresca, tanto en origen como en lugares de destino. Es una plaga de difícil control y clave en nuestro país, es decir, deben ser controlados con aplicaciones de insecticidas todas las temporadas, debido al daño directo y especialmente a los importantes rechazos cuarentenarios (González, 2011).

Características generales de *P. viburni*

Esta especie posee factibilidad de crianza en laboratorio y manipulación. Pueden cumplir con 3 a 5 generaciones anuales (González, 2011) e incluso más en estas condiciones controladas. Su crianza se realiza principalmente sobre brotes etiolados de papas, lo que hace muy sencilla la observación de las colonias (González, 2011).

Se caracterizan por producir abundantes secreciones cerosas epicuticulares (Cox y Pearse, 1983), que cubren sus cuerpos y les dan un aspecto blanquecino. Ripa y Rodríguez (1999) creen que ayuda a mantenerlos fuera del contacto con la mielecilla que secretan y a protegerlos de la deshidratación, condiciones ambientales adversas (Curkovic, 2003), y contra la penetración de insecticidas (Hadley, 1981; Toro *et al.*, 2003) y patógenos (Pedrini *et al.*, 2007). Además, sirven para proteger las masas de huevos y de ninfas neonatas.

Insecticidas sintéticos y hongos entomopatógenos

Clorpirifos

Perteneciente al grupo químico de los organofosforados. Tiene efecto de contacto y acción residual. Es poco selectivo para enemigos naturales. En cítricos, sin embargo, protege el fruto por un período mayor de tiempo que el aceite (que no presenta efecto residual) y se debería preferir ante ataques más intensos (Ripa y Rodríguez, 1999).

Según Ulloa (2010), los insecticidas Lorsban® 50 WP (Dow), que contiene clorpirifos como ingrediente activo; además de Confidor® Forte 200 SL (Bayer), ingrediente activo imidacloprid; y Movento® 240 SC (Bayer), ingrediente activo espirotetramato; aplicados en arándano sobre ninfas de segunda generación de *P. viburni* en primavera, disminuyen significativamente las poblaciones del chanchito blanco con respecto al testigo no tratado.

Hongos entomopatógenos

Son microorganismos patógenos de insectos. Juegan un rol clave en la regulación de las poblaciones de insectos en la naturaleza (Charnley, 1997; Mohammadbeigi and Port, 2013) y, debido a su especificidad no representan una amenaza para organismos benéficos ni organismos plaga que no se desea controlar (Salazar *et al.*, 2010).

Las especies de hongos entomopatógenos (HEP) más estudiadas a nivel mundial corresponden a *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin y *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) (Salazar *et al.*, 2010).

Como patógenos de *Pseudococcus* spp., han mostrado resultados promisorios en plantas con alto grado de infestación al reducir los tamaños poblacionales, así como la infestación de los racimos de uva y la severidad con que estaban siendo afectados (Corral *et al.*, 2006; EDAFON, 2007; Posada y Forigua, 2011; Salazar *et al.*, 2010).

Detergentes sintéticos

Los artrópodos pequeños y de cuerpo blando como áfidos, chanchitos blancos, psíidos, arañitas, mosquitas blancas, entre otros, son los más sensibles a estas sustancias (Marer *et al.*, 1988; Cloyd, 2006; Cranshaw, 2006; Cloyd, 2007; Santibáñez, 2010).

Pueden ser coadyuvantes por sus propiedades surfactantes y desgrasantes (Curkovic *et al.*, 2007). Se ha señalado que el efecto plaguicida de los detergentes depende de la concentración y se atribuye principalmente a la remoción de las ceras epicuticulares, lo que generaría la muerte de los individuos al dejarlos desprotegidos y vulnerables (Curkovic, 2003).

En Chile se han realizado varios estudios para evaluar el efecto de detergentes agrícolas en especies de *Pseudococcus* mediante la estimación de la concentración letal media (CL₅₀), que indica la concentración de producto que causa la mortalidad del 50% de la población expuesta (Burett, 2005; Santibáñez, 2010). Santibáñez (2010), encontró que el detergente agrícola TS-2035[®] fue capaz de remover una cantidad de cera epicuticular de hembras adultas y ninfas de *P. viburni* significativamente mayor al detergente TecsFruta[®] a la misma CL₅₀, probablemente a causa de la diferente concentración de ingredientes activos (38% y 2%, respectivamente).

Efectos en la mortalidad de *P. viburni*

Todo lo anteriormente expuesto permitió suponer que la aplicación de los insecticidas Lorsban 4E (clorpirifós 48% p/v) y Mycotrol (cepa GHA específica de *B. bassiana*), además del hongo entomopatógeno *M. anisopliae*, en mezcla con el detergente agrícola TS-2035, incrementaría significativamente la mortalidad en hembras adultas de *P. viburni*, al compararla con la mortalidad causada por estos insecticidas utilizados solos, basándose en el contraste entre sus CL₅₀.

Hipótesis

La mortalidad de hembras adultas de *P. viburni* causada por los insecticidas Lorsban 4E y Mycotrol ES, y por el hongo entomopatógeno *M. anisopliae*, se incrementa significativamente al adicionarles una concentración del detergente agrícola TS-2035 que no provoque una mortalidad significativa por sí sola, bajo condiciones de laboratorio.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto del detergente agrícola TS-2035 en la mortalidad causada por los insecticidas Mycotrol ES (*B. bassiana* 11,3% p/v), Lorsban 4E (i.a. clorpirifós 48% p/v), y el hongo entomopatógeno *M. anisopliae*, sobre hembras adultas de *P. viburni*.

Objetivos específicos

1. Calcular la máxima concentración de detergente que no muestre diferencias estadísticamente significativas con el control (concentración crítica) respecto de la mortalidad de hembras adultas de *P. viburni*.
2. Cuantificar la remoción de la cera epicuticular de hembras adultas de *P. viburni* causada por la concentración crítica del detergente agrícola TS-2035.
3. Obtener la concentración letal media (CL₅₀) de Mycotrol ES (*B. bassiana* 11,3% p/v), Lorsban 4E (i.a. clorpirifós 48% p/v) y la cepa M984 de *M. anisopliae*, en hembras adultas de *P. viburni*.
4. Obtener la concentración letal media (CL₅₀) de la mezcla de la concentración crítica del detergente TS-2035 con Mycotrol ES (*B. bassiana* 11,3% p/v), con Lorsban 4E (i.a. clorpirifós 48% p/v) y con la cepa M984 de *M. anisopliae*, en hembras adultas de *P. viburni*, y compararlas estadísticamente con las CL₅₀ del objetivo N° 3.

Materiales y Métodos

I. Ubicación del estudio

Los ensayos y evaluaciones de mortalidad fueron realizados en el Laboratorio de Comportamiento y Ecología Química de Insectos del Departamento de Sanidad Vegetal, mientras que los análisis químicos se efectuaron en el Laboratorio de Química del Departamento de Agroindustria y Enología, ambos de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, La Pintana, Santiago, Chile.

II. Material Biológico

Colonias de chanchitos blancos (*P. viburni*) criados en papas etioladas de distintas variedades dentro de cajas plásticas transparentes de 32 x 21 x 14 cm, cerradas, con ventanas laterales y en la tapa, de 3 x 5 cm, cubiertas de tela tul, para permitir la ventilación en su interior, y con una capa de arena en su base, de 2 cm de alto. Se mantuvieron en una cámara climática (19,5 °C; ~40% HR; fotoperíodo 16:8) durante la crianza.

III. Tratamientos y Diseño

El diseño experimental que se utilizó en todos los ensayos fue de bloques completamente aleatorizados (DBCA); los bloques (n = 4) estuvieron conformados por una repetición de cada tratamiento realizada en un mismo día y entre cada bloque transcurrió un lapso de una semana, para disminuir el posible efecto de variables de tipo medioambientales (temperatura, luminosidad, humedad relativa, etc.). La unidad experimental consistió en 20 hembras adultas de *P. viburni*, con un promedio de 40 mg en total, en una placa Petri.

Todas las aspersiones se realizaron en una Torre de Potter ST-4 calibrada a 15 lb/pulg² y un tubo de ensayo transparente de 10 mL de capacidad para cada tratamiento.

Ensayo 1. Mortalidad de individuos versus concentración de detergente

Se evaluaron cinco tratamientos de distintas concentraciones del detergente agrícola TS-2035, comenzando desde 1% (v/v) y reduciendo en escala logarítmica hasta cinco niveles de magnitud, y un testigo (agua destilada), con cuatro repeticiones.

Ensayo 2. Análisis de remoción de cera epicuticular por efecto de TS-2035

La máxima concentración de detergente asperjada sobre los pseudocóccidos, que no presentó diferencias significativas con el testigo en el porcentaje de mortalidad (según los resultados del ensayo 1), fue analizada mediante espectrofotometría UV - visible para cuantificar la cera removida de los individuos. Para contrastar, se asperjaron 20 hembras adultas de *P. viburni* con la concentración máxima (1% v/v) y con agua destilada, conformando tres tratamientos cada uno en triplicado. Luego, los individuos se dejaron secar a temperatura ambiente, se pesaron en una balanza analítica modelo BRB32 marca Boeco, Alemania, se trasladaron a tubos Eppendorf y, siguiendo la metodología de Buckner

et al. (1999), se conservaron en un congelador a -20°C hasta el momento de realizar el análisis. La extracción de ceras se realizó, según Nelson y Charlet (2003), con 1 mL de cloroformo (CHCl_3) por 1 min, extrayéndose con una micropipeta el sobrenadante, para ser analizados en un espectrofotómetro UV/VIS modelo UV-1700 PharmaSpec, marca Shimadzu, Japón, y obtener su valor de absorbancia a 245 nm (apéndice 2). Con estos resultados se calculó el contenido de ceras remanentes de los individuos tratados, basándose en la curva de calibración descrita por Santibáñez (2010).

Ensayo 3. Mortalidad de individuos versus concentración de insecticidas

Se evaluaron cuatro tratamientos de distintas concentraciones de los dos insecticidas utilizados, además de un testigo (agua destilada), siguiendo la metodología del ensayo 1, pero ahora las concentraciones evaluadas fueron desde la recomendada y reduciéndola, en escala logarítmica, en cuatro órdenes de magnitud, para encontrar la CL_{50} de cada uno (apéndice 1).

Según un estudio preliminar (anexo 1), la concentración máxima viable de Mycotrol es de $1,7 \times 10^6$ Unidades Formadoras de Colonias (UFC) mL^{-1} , en adelante 100% v/v, desde la que se prepararon diluciones en serie $1,7 \times 10^5$, $1,7 \times 10^4$ y $1,7 \times 10^3$.

Por otra parte, la dosis recomendada de Lorsban 4E (Clorpirifós 48% p/v) para *P. viburni* es de 1,0-1,2 mL L^{-1} . En este estudio, se trabajó con el valor más alto, equivalente a 576 ppm de clorpirifós, en adelante 100% (v/v), desde la que se prepararon diluciones en serie.

En el caso de *M. anisopliae*, la concentración recomendada para *P. viburni* en laboratorio es de $1,0 \times 10^8$ UFC mL^{-1} . Para alcanzar esta concentración se requirió preparar una solución de 5g de conidias en 100 mL de agua destilada, pero, según los resultados de germinación realizados, esta concentración equivale sólo a $3,7 \times 10^7$ UFC (viables) mL^{-1} , en adelante 100% p/v, desde la cual se prepararon diluciones en serie de $3,7 \times 10^6$ y $3,7 \times 10^5$ UFC (viables) mL^{-1} .

En los tratamientos con Mycotrol y *M. anisopliae*, a los 7 días post exposiciones, los individuos tratados fueron puestos en cámaras húmedas, realizadas con envases plásticos, transparentes, circulares, de 10 cm de diámetro basal, cerrados, desinfectados, y con una toalla de papel absorbente en su base. Luego, fueron humedecidos con 5 mL de agua destilada y puestos en una cámara de crianza a iguales condiciones de temperatura y humedad antes descritas. Se revisaron diariamente durante 6 días y se registró el porcentaje de individuos con esporulación de *B. bassiana* y *M. anisopliae* y con remoción total de cera observable bajo lupa estereoscópica.

Para verificar que la adición de la concentración crítica de detergente TS-2035 no influyó en la germinación de conidias de *B. bassiana* y de *M. anisopliae*, se realizó un análisis de viabilidad de éstas. Se trabajó en el Laboratorio de Fitopatología de Postcosecha del Departamento de Sanidad Vegetal de la Universidad de Chile. Se evaluó el porcentaje de germinación de conidias de *B. bassiana* cepa GHA del producto Mycotrol® ES formulada en el año 2012, y de la cepa M984 de *M. anisopliae*, realizando para cada entomopatógeno, tres tratamientos con cuatro repeticiones y, sembrando homogéneamente 100 μL de cada repetición a una dilución de 10^6 UFC mL^{-1} (según conteo en cámara de Neubauer) en agua

destilada y 0,05% de Tween 80 en placas Petri con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) a pH 6,0. En el primer tratamiento no se adicionó TS-2035, en el segundo se adicionó la concentración crítica de este detergente y, en el tercero, una concentración diez veces superior. Los cultivos se mantuvieron en una cámara de cultivo modelo FOC225E, marca VELP, Italia, a 20°C y se revisaron cada 12 h durante 7 días, estableciendo que la germinación máxima alcanzada fue a las 36 y 144 h, para *B. bassiana* y *M. anisopliae*, respectivamente. El porcentaje se calculó observando 100 conidias al azar, en un microscopio con contraste de fases modelo Axiostar plus, marca Carl Zeiss, Alemania, y en un aumento de 400x. Se consideró conidia germinada cuando ésta presentaba el desarrollo de un tubo germinativo de longitud igual o superior al diámetro.

Ensayo 4. Efecto de la aspersión de detergente en conjunto con insecticidas

Los tratamientos estuvieron conformados por los mismos insecticidas del ensayo 3, cada uno aplicado en mezcla con la concentración crítica de detergente, las aspersiones de estas concentraciones se realizaron siguiendo la metodología utilizada en el mencionado ensayo.

Por otra parte, se evaluó el pH de todas las concentraciones asperjadas de detergente, insecticidas y las mezclas de la concentración crítica del primero con las concentraciones extremas de cada insecticida (1% y 100% v/v) y del hongo entomopatógeno (1% y 100% p/v), utilizando un pH-metro modelo SX-610, marca Sanxin, China, en 4 repeticiones, recalibrando el instrumento luego de analizar una repetición de cada tratamiento (bloques), para verificar si existió una variación de sus pH.

Manejo del experimento:

Materiales químicos: el detergente utilizado fue TS 2035-N[®]. Es un detergente líquido, neutro, concentrado, a base de una combinación de agentes surfactantes aniónicos (34%), no iónicos (4%) y sustancias no activas y agua (62%). El insecticida convencional utilizado fue Lorsban 4E[®] (Clorpirifós 48% p/v) (Dow AgroSciences, EE.UU.). El surfactante utilizado para las preparaciones de *M. anisopliae* fue Tween[®] 80 (Sigma Aldrich, EE.UU.).

Materiales de origen biológico: Los hongos entomopatógenos utilizados fueron *B. bassiana* (cepa GHA de al 11,3% p/v) (Mycotrol[®], origen Bioamérica) y *M. anisopliae* var. *anisopliae* (cepa Qu-M984, origen INIA Quilamapu) (anexo 2).

Procedimiento y manipulación del organismo modelo:

En los ensayos de aspersiones, los individuos de *P. viburni* fueron tratados con un volumen de 2 mL de solución por cada repetición, durante un período de exposición de 10 s. Entre cada aplicación se limpió el interior de la Torre de Potter con un paño de microfibra humedecido con agua destilada y se secó el líquido remanente de los tratamientos con toalla de papel absorbente. Después de 5 min, todos los individuos fueron trasladados a nuevas placas Petri esterilizadas con etanol, que contenían hojas de laurel de flor (*Nerium oleander* L.) libres de pseudocóccidos y otros artrópodos, lavadas con agua destilada y secadas, para asegurar su alimentación. Posteriormente, se colocaron en una cámara de crianza (19,5 °C; ~40% HR; fotoperíodo 16:8) durante siete días.

Evaluaciones:

A las 24 h, se realizó la primera revisión de los individuos tratados y se registró la mortalidad, considerándose individuo muerto cuando, al ser estimulado con un pincel n° 2 en reiteradas ocasiones, no presentó desplazamiento, sólo movimientos lentos o ausencia de ellos (Figura 1) (Buret, 2005; Santibáñez, 2010). Una segunda revisión se realizó a las 72 h, para registrar nuevamente la mortalidad de los individuos según este criterio. En el caso de *M. anisopliae*, la mortalidad se registró también a las 144 h.

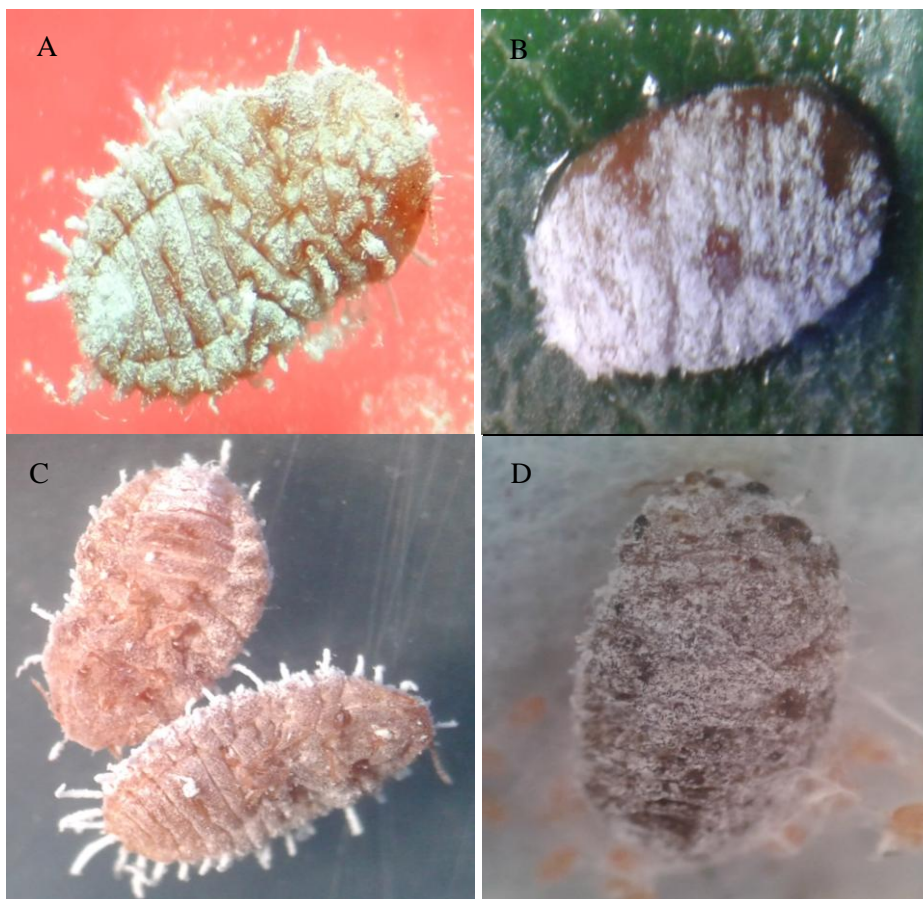


Figura 1. Hembras adultas de *P. viburni* consideradas muertas 24 h post exposición a la concentración crítica de detergente por sí sola (A), en mezcla con Mycotrol ($1,7 \times 10^6$ UFC mL⁻¹) (B), en mezcla con clorpirifós (576 ppm) (C), y en mezcla con *M. anisopliae* (D).

Cabe mencionar que, el incremento de la mortalidad en el tiempo se estabilizó a partir de las 72 h (*B. bassiana*) y las 24 h (clorpirifós y *M. anisopliae*). Un registro posterior de la mortalidad provocada por *B. bassiana* y clorpirifós se realizó a las 168 h (datos no presentados) en que se observaron mortalidades superiores a 35% en los testigos, principalmente en hembras adultas post ovipostura, atribuidas a la culminación natural del ciclo de vida de los individuos.

Por otra parte, en la evaluación de individuos con esporulación en cámara húmeda, se consideró como tal aquellos que presentaron desarrollo de micelio de los HEP, observables bajo lupa estereoscópica, registrado 6 días después (Figura 2). Además, se registró el

porcentaje de individuos que presentaban remoción total de cera epicuticular observable bajo lupa estereoscópica, ya sea estuvieran con o sin esporulación.

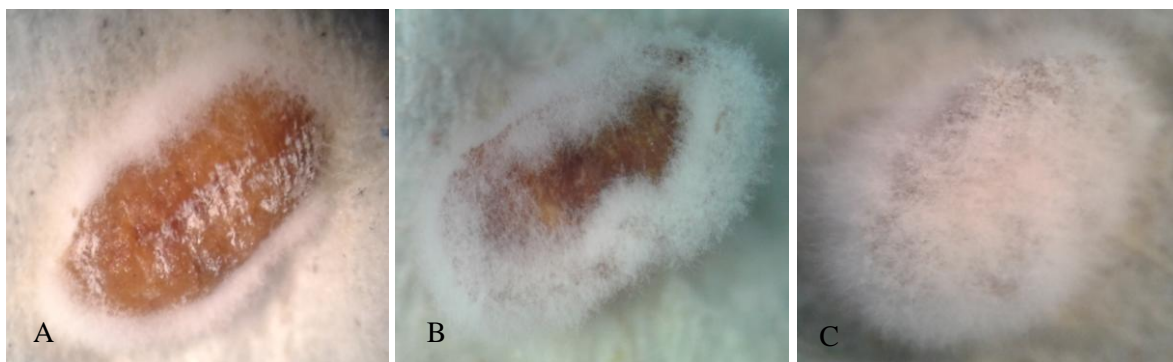


Figura 2. Hembra adulta de *P. viburni* con esporulación de *B. bassiana* cubriendo aproximadamente el 30% (A), 70% (B), y 100% de su cuerpo (C), a las 24, 72 y 168 h en cámara húmeda, respectivamente. Ejemplo de individuos considerados “con esporulación”.

IV. Análisis Estadístico

Los resultados de mortalidad de *P. viburni* frente a la exposición a los tratamientos con detergente, insecticidas y hongos entomopatógenos, fueron sometidos a las pruebas de Shapiro-Wilks y de Levene para verificar los supuestos estadísticos de normalidad y de homocedasticidad, respectivamente. En los casos que se cumplió lo anterior, se analizaron los resultados mediante la prueba estadística ANDEVA a dos vías y las diferencias de los promedios para cada tratamiento fueron comparadas con la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$). En cambio, los resultados que no cumplieron con los mencionados supuestos estadísticos, inclusive después de ser corregidos y transformados (Rustom *et al.*, 1989), se analizaron con la prueba no paramétrica de Friedman.

Los resultados de cera remanente (% p/p) en los individuos asperjados con TS-2035 se analizaron con la prueba ANDEVA a una vía, y el contraste de medias se realizó con la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$). La germinación de esporas de *B. bassiana* y de *M. anisopliae* en presencia del detergente TS-2035 se analizó con la prueba ANDEVA de una vía, y el contraste de medias se realizó con la prueba Tukey HSD ($p < 0,05$). También, se realizaron análisis de correlación de Pearson ($p < 0,01$) para contrastar las variables observadas (porcentaje de individuos con esporulación, con remoción de cera (*B. bassiana*) y mortalidad en el máximo tiempo evaluado) en los resultados con Mycotrol y *M. anisopliae* en cámara húmeda.

Para el cálculo de las concentraciones letales de los insecticidas, los resultados se sometieron a análisis Probit entre la mortalidad y el logaritmo de la concentración de insecticida (Rustom *et al.*, 1989). Además, cuando hubo mortalidades en el testigo, los porcentajes de los tratamientos fueron corregidos para mantener ajuste del modelo*, según la fórmula $(IM_{trat} - IM_{test} / Ti - IM_{test}) \times 100$, adaptada de Rustom *et al.* (1989), en que:

* Contreras, A. 2015, may. Análisis estadísticos. [Entrevista personal]. Escuela de Pregrado, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.

IMtrat = individuos muertos por efecto del tratamiento

IMtest = individuos muertos en el testigo

Ti = total de individuos por repetición

Finalmente, para contrastar entre sí las CL_{50} de cada insecticida y HEP, éstas fueron recalculadas por cada repetición (bloque), mediante análisis Probit entre la mortalidad y el $\log(\text{concentración})$, según la fórmula: $((R0 + RTS) \times TE)$, adaptada de Rustom *et al.* (1989), en que:

R0 = repeticiones de insecticida/HEP en ausencia de la concentración crítica de TS-2035

RTS = repeticiones de insecticida/HEP en presencia de la concentración crítica de TS-2035

TE = tiempos de evaluación

Obteniéndose un total de 16 CL_{50} para el caso de Mycotrol y de Lorsban, y 24 CL_{50} para *M. anisopliae*, que fueron contrastadas con la pruebas estadísticas de Friedman y de Tukey HSD, respectivamente.

Los programas estadísticos utilizados fueron SSPS V15.0 e InfoStat.

Resultados

1. Mortalidad de *P. viburni* según concentración de TS-2035

De los resultados obtenidos (Figura 3) se observa la máxima mortalidad con la concentración mayor en la evaluación de las 24 h y con las dos mayores a las 72 h. La mortalidad aumentó con la concentración en ambos períodos, sin mortalidad en el testigo a las 24 h y con un mínimo del orden de 10% en el testigo a las 72 h. En ambos tiempos de registro de mortalidad, la concentración al 0,001% v/v de TS-2035 corresponde a la máxima concentración que, al ser asperjada sobre hembras adultas de *P. viburni*, no difiere significativamente de la registrada en el tratamiento testigo. Por lo tanto, esta concentración se adicionó a los tratamientos de los ensayos posteriores (“concentración crítica”).

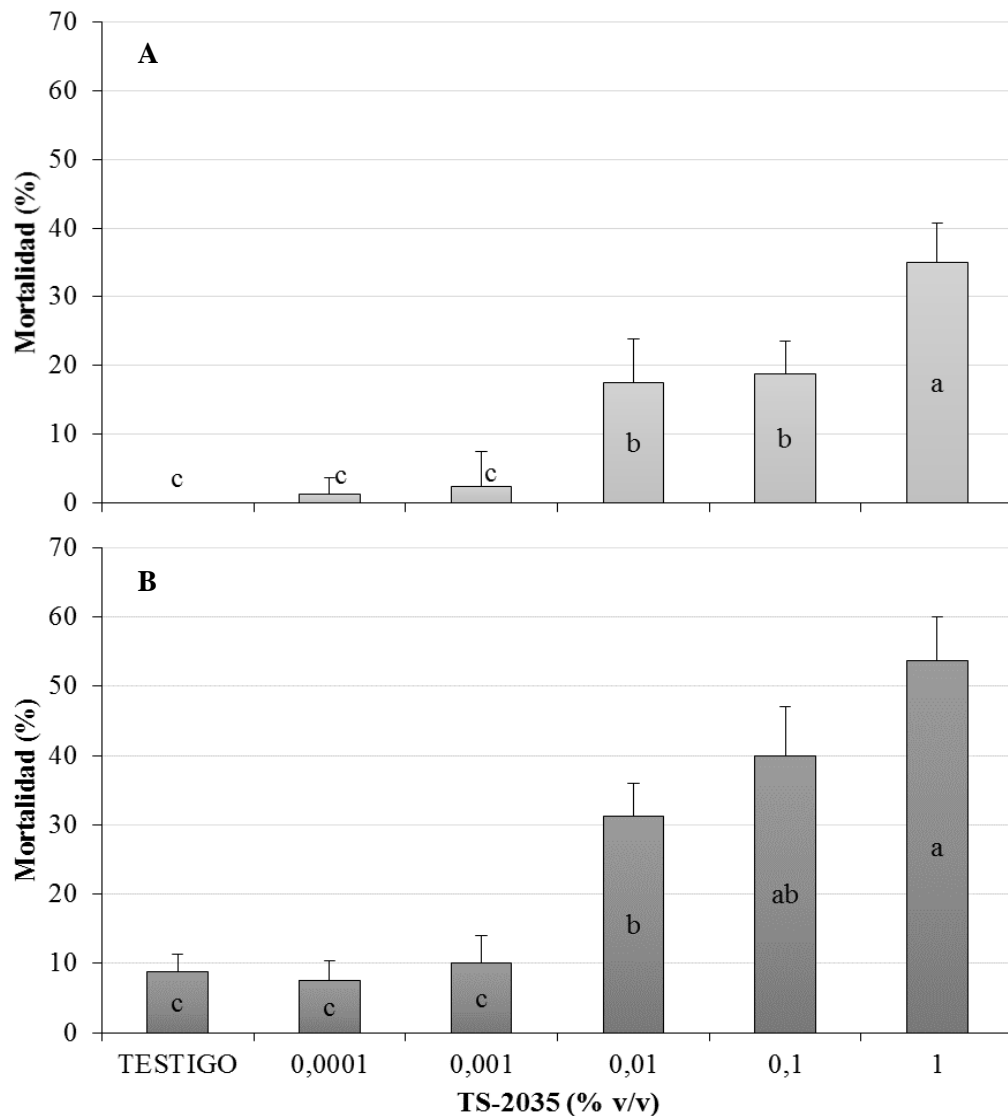


Figura 3. Mortalidad (%) de hembras adultas de *P. viburni* expuestas a distintas concentraciones de detergente agrícola TS-2035, registrada a las 24 h (A) y 72 h (B). Letras distintas en columnas de cada tiempo evaluado indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$).

1.1. Evaluación de pH según concentraciones de TS-2035

Según los valores de pH de la solución para las distintas concentraciones de TS-2035, sólo el tratamiento con la concentración mayor (1% v/v) fue superior a los demás (Figura 4).

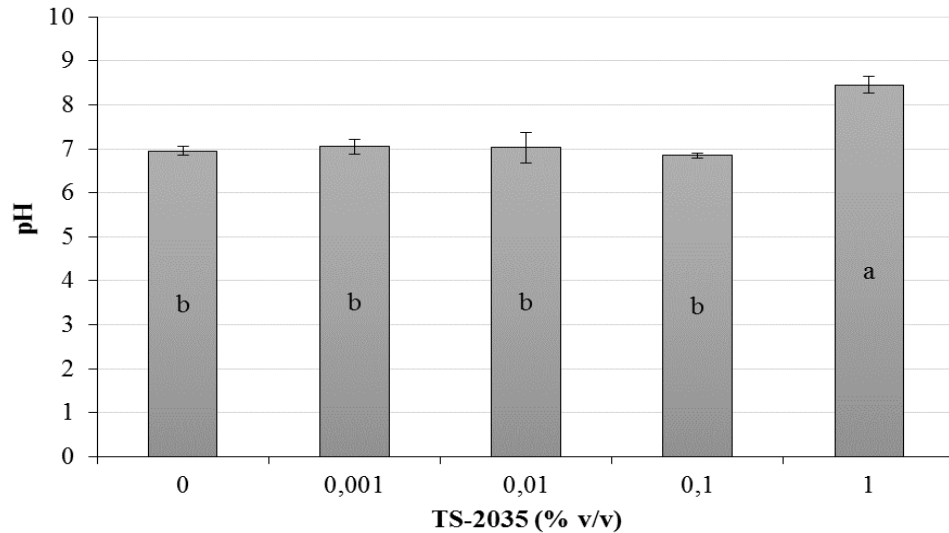


Figura 4. Promedio de pH para las distintas concentraciones utilizadas de TS-2035 (% v/v). Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica de Friedman ($p < 0,05$).

Este aumento del pH se explica porque el producto comercial es ligeramente alcalino ($8,5 \pm 3,0$), debido a sus componentes aniónicos y no iónicos. Por lo tanto, desde 1% v/v, este carácter alcalino se comienza a manifestar significativamente en la solución.

1.2 Análisis de remoción de cera

En la Figura 5, el porcentaje de cera remanente en los individuos expuestos a la concentración crítica de TS-2035 no varía significativamente comparado con el control. No así a una concentración de 1% v/v, que provoca una remoción significativa de ceras.

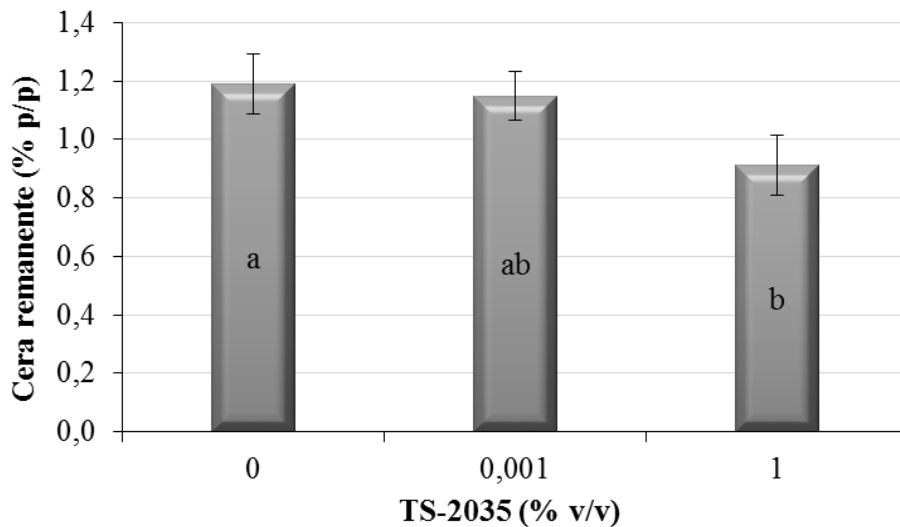


Figura 5. Cera remanente (% p/p) de hembras adultas de *P. viburni* expuestas a TS-2035 (% v/v). Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$).

Es decir, el efecto de remoción de ceras no sería detectable mediante espectrofotometría si no a partir de la concentración al 1% v/v. Además, se observa que ésta concentración es capaz de remover 0,3% p/p de los individuos, equivalente a 6 µg de cera por cada insecto.

2. Efecto de Mycotrol en la mortalidad de *P. viburni*

2.1. Mortalidad de *P. viburni* según concentración de Mycotrol:

A medida que aumenta la concentración del insecticida, la mortalidad se ve incrementada significativamente, en ambos tiempos evaluados (Figura 6).

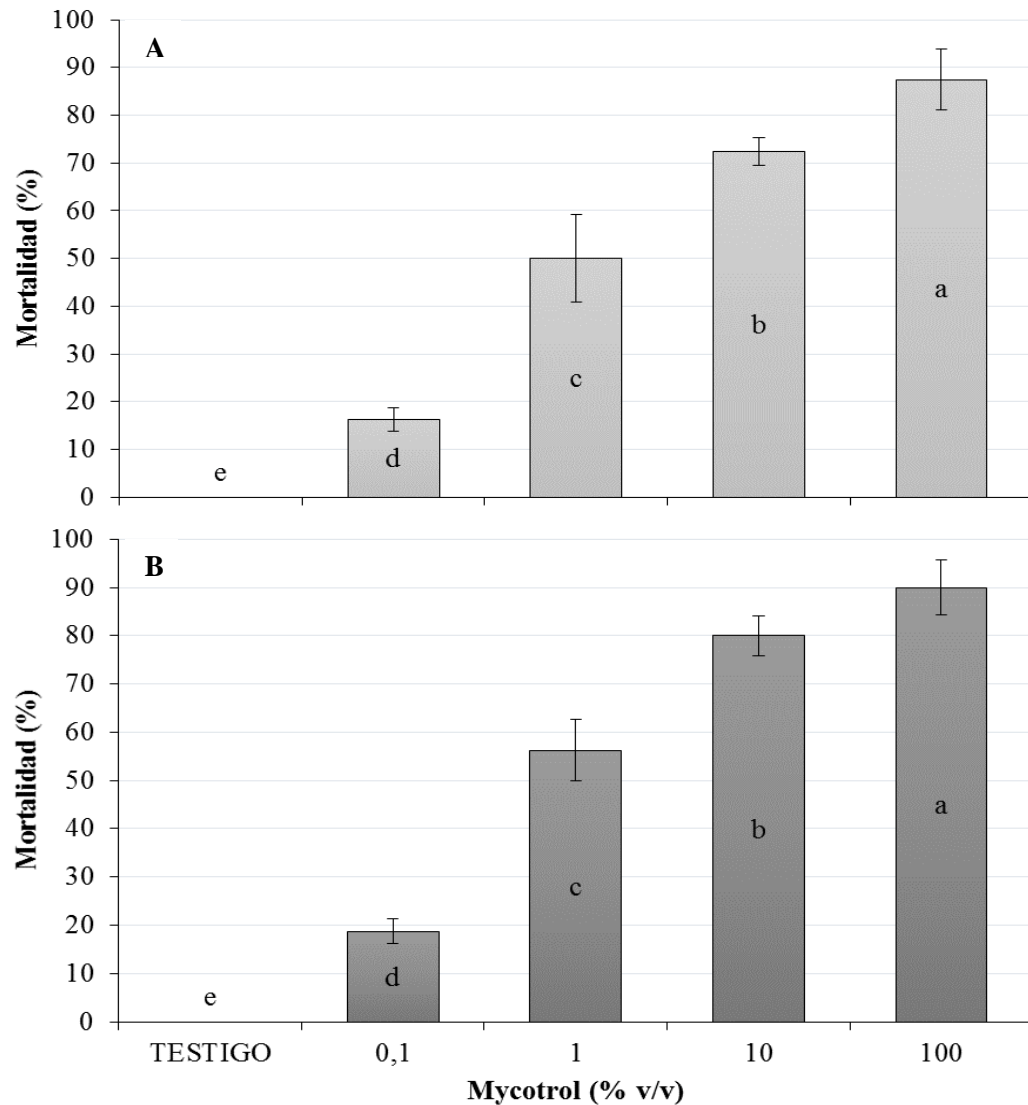


Figura 6. Mortalidad (%) de hembras adultas de *P. viburni* expuestas a diferentes concentraciones de Mycotrol (% v/v), registrada a las 24 h (A) y 72 h (B). 100% equivale a $1,7 \times 10^6$ UFC (viables) mL⁻¹. Letras distintas en columnas de cada tiempo evaluado indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba no paramétrica de Friedman ($p < 0,05$).

Los coeficientes de variación fueron de 11,25% (Figura 6A) y 9,01% (Figura 6B).

2.1.1. Análisis Probit

Con los resultados anteriores, se realizó el análisis Probit de ambas curvas de mortalidad (Figura 7).

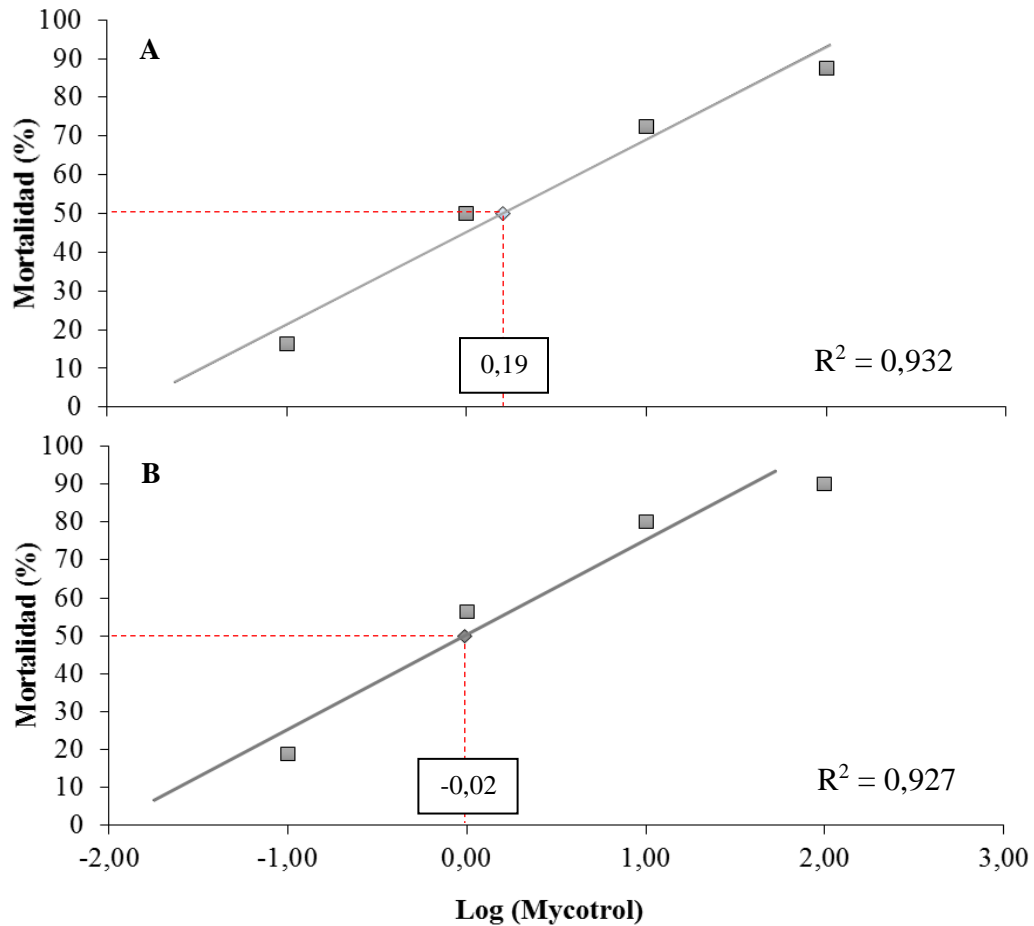


Figura 7. Probit de la mortalidad en hembras adultas de *P. viburni* a diferentes concentraciones de Mycotrol (% v/v), registrado a las 24 h (A) y 72 h (B), con un 5% de significancia.

Los valores del análisis Probit del logaritmo de las concentraciones de insecticida que causan una mortalidad de 50% fueron de 0,19 (A) y -0,02 (B). Es decir, a las 24 h la CL₅₀ se alcanza con una concentración de Mycotrol de 1,55% (v/v), equivalente a $2,6 \times 10^4$ UFC mL⁻¹. Por otra parte, a las 72 h la concentración requerida corresponde al 0,96% v/v, equivalente a $1,6 \times 10^4$ UFC mL⁻¹.

2.1.2. Prueba de esporulación en cámara húmeda

Para verificar que esta mortalidad fue provocada por efecto del entomopatógeno presente en Mycotrol, se registró el porcentaje de individuos con esporulación observada en cámara húmeda, que fue desde un 3,8% (concentración 0,1% v/v) hasta un 47,5% (concentración 100% v/v). El mayor porcentaje de esporulación se observó con las dos concentraciones más altas, el cual se redujo con la disminución de la concentración usada (Figura 8).

A partir de estos resultados se observa que existe una relación directa entre las variables.

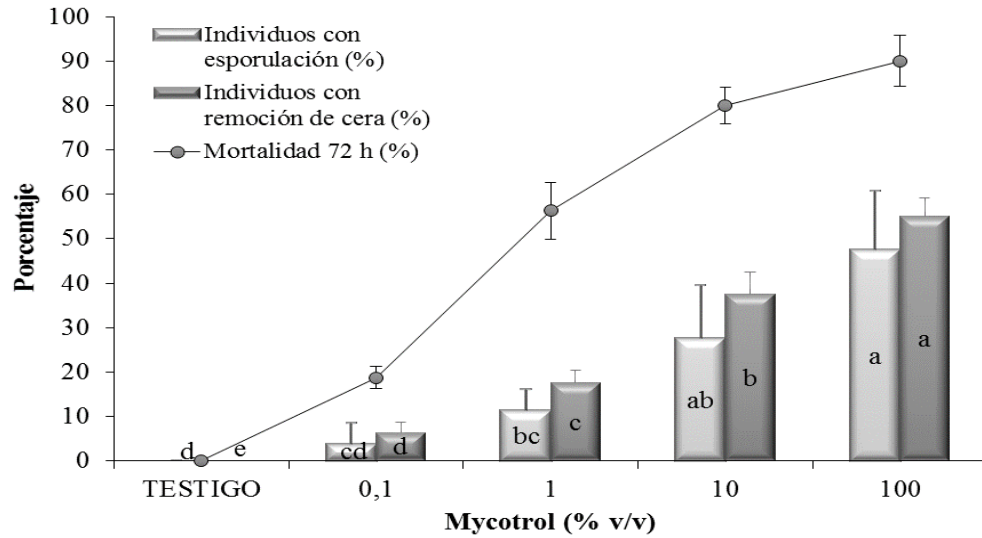


Figura 8. Esporulaci3n de *B. bassiana* y remoci3n de cera en hembras adultas de *P. viburni*, registradas luego de 144 h en c3mara h3meda, en contraste con la mortalidad registrada a las 72 h, al ser expuestas a los tratamientos con Mycotrol (% v/v). Letras distintas en columnas del mismo color indican diferencias estadisticamente significativas, seg3n la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

El an3lisis de correlaci3n de Pearson ($p < 0,01$) arroj3 valores de $r = 0,82$ para la esporulaci3n, y $0,97$, para la remoci3n de cera, al correlacionarlas con la mortalidad a 72 h. Mientras que, al comparar las dos primeras entre s3, el valor es $r = 0,90$. Es decir, a medida que se incrementa la mortalidad de estos insectos, tambi3n aumenta proporcionalmente el porcentaje de individuos con esporulaci3n de *B. bassiana* y con remoci3n de cera.

2.1.3. Evaluaci3n de pH de concentraciones de Mycotrol

De acuerdo a estos resultados, la concentraci3n al 100% de la recomendaci3n produjo un pH de la suspensi3n significativamente menor al de la concentraci3n 10% y ambos, a su vez, menores al resto de los tratamientos, que no se diferencian entre ellos (Figura 9).

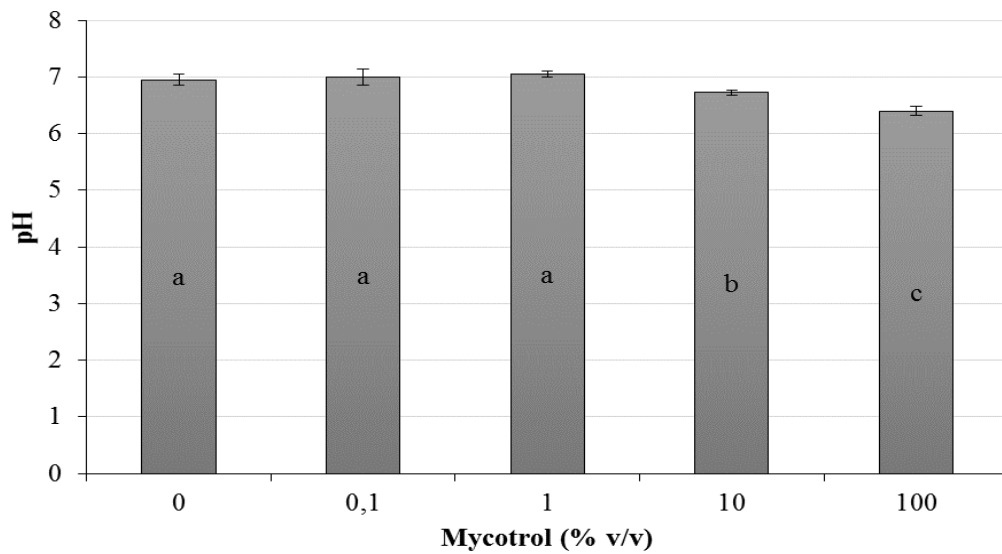


Figura 9. pH de las concentraciones de Mycotrol (% v/v). Letras distintas indican diferencias significativas seg3n la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$).

Esta disminución del pH de la concentración 100% v/v se explica por el alto contenido (88,7%) de componentes inertes (agentes de anti-endurecimiento y anti-sedimentación, residuos de cultivo, portador y emulsificantes) que mantienen la eficacia del producto comercial, para mantener la solución ligeramente ácida. Lógicamente, al disminuir la concentración de Mycotrol, el pH de los tratamientos se acerca al pH del agua destilada utilizada (6,95). El coeficiente de variación de este experimento fue de 1,28%.

2.2. Efecto de la adición de TS-2035 a Mycotrol en la mortalidad de *P. viburni*

En la Figura 10, se observa que la mortalidad de hembras adultas de *P. viburni*, provocada por la aspersion de estos nuevos tratamientos, mantiene la tendencia anterior (Figura 6), con un incremento significativo a medida que aumentan las concentraciones de Mycotrol. Sin embargo, a las 72 h, con la concentración al 10% v/v se alcanza una mortalidad estadísticamente igual al tratamiento con la concentración mayor (100% v/v).

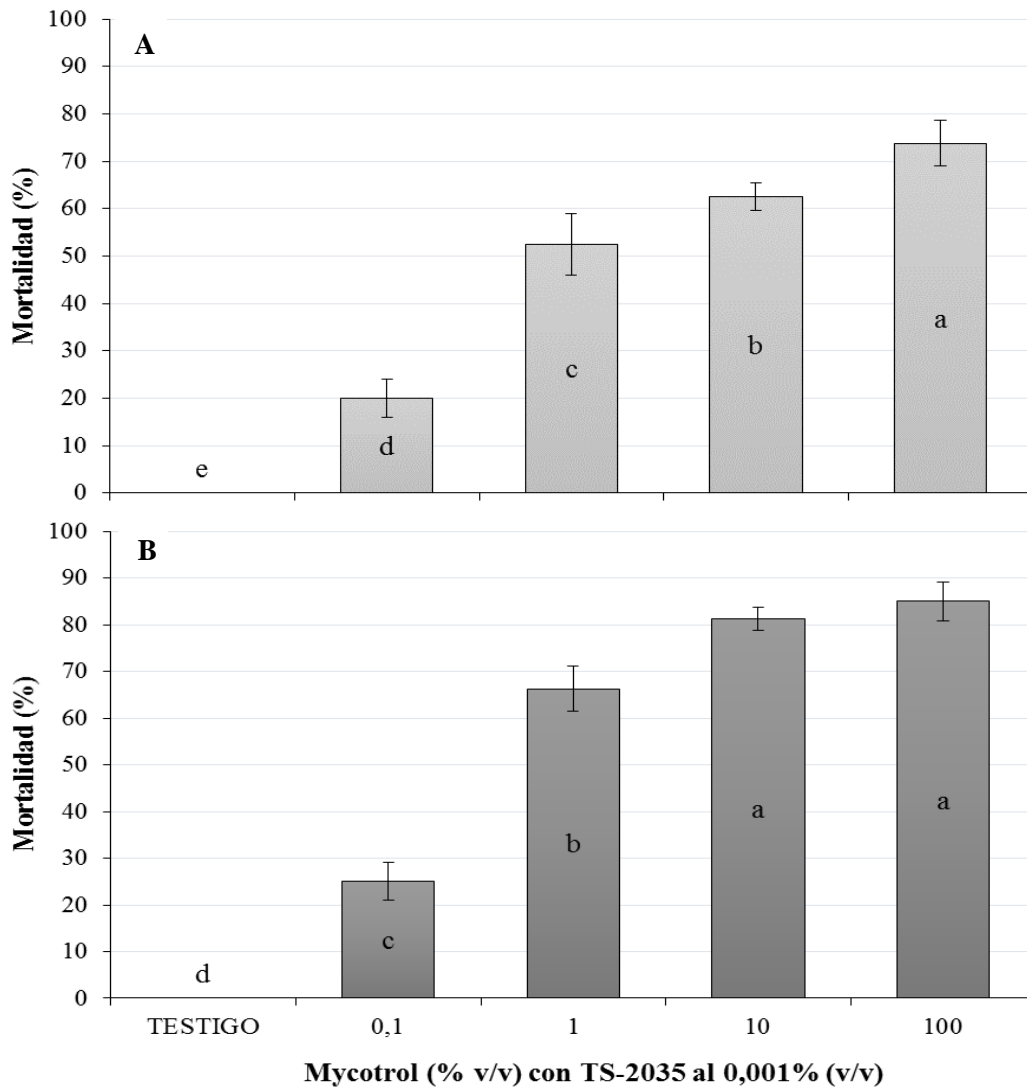


Figura 10. Mortalidad (%) de hembras adultas de *P. viburni* expuestas a diferentes concentraciones de Mycotrol (% v/v) con TS-2035 al 0,001% (v/v), registrada a las 24 h (A) y 72 h (B). 100% equivale a $1,7 \times 10^6$ UFC (viables) mL^{-1} . Letras distintas en columnas de cada tiempo evaluado indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Friedman ($p < 0,05$).

Los coeficientes de variación fueron de 10,95% (Figura 10A) y 7,86% (Figura 10B).

2.2.1. Análisis Probit

Para comparar los resultados anteriores de manera estandarizada con los del ensayo 2, se procedió a realizar un análisis Probit con estos nuevos porcentajes de mortalidad (Figura 11) y calcular las CL_{50} .

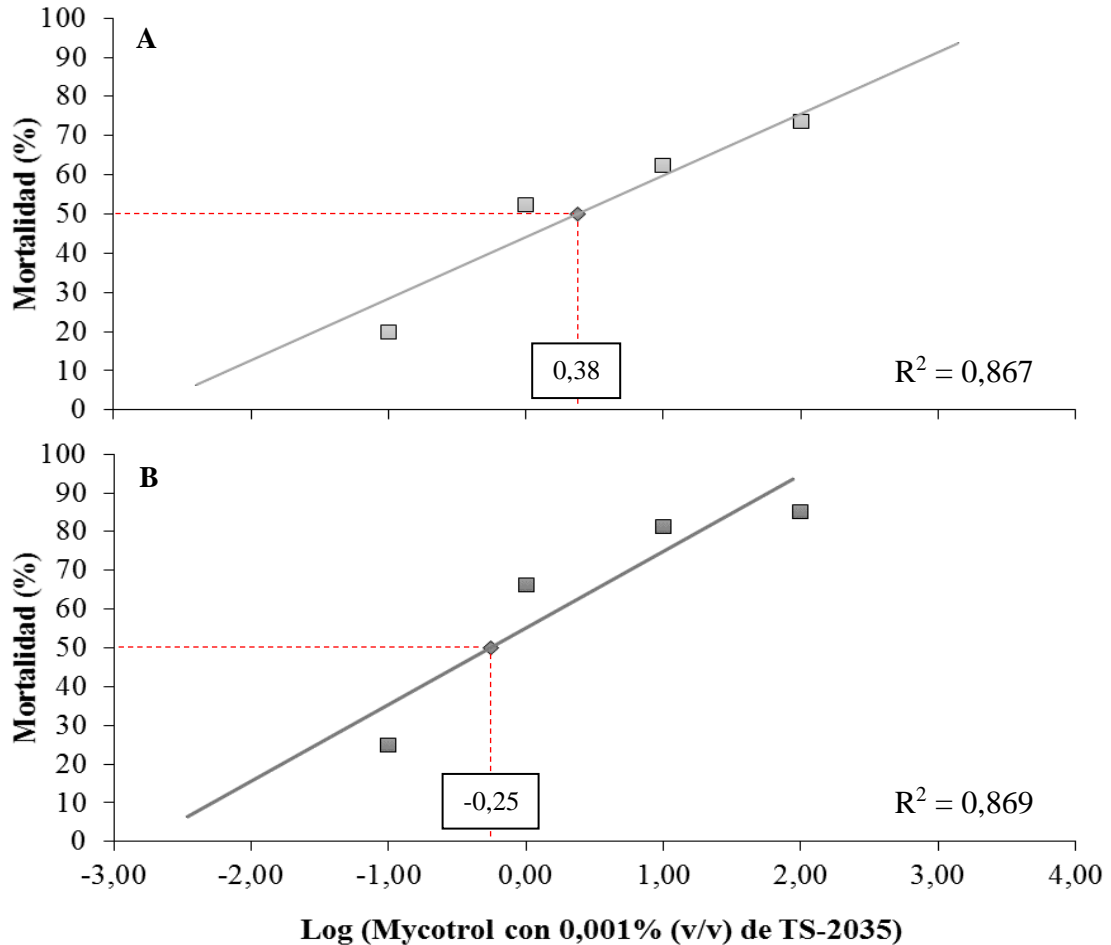


Figura 11. Probit de la mortalidad en hembras adultas de *P. viburni* a diferentes concentraciones de Mycotrol (% v/v) con 0,001% (v/v) de TS-2035, registrada a las 24 h (A) y 72 h (B), con un 5% de significancia.

Los valores exactos del logaritmo de las concentraciones de insecticida más detergente que causan una mortalidad de 50% fueron de 0,38 (A) y -0,25 (B), es decir, a las 24 h, la CL_{50} se alcanza con una concentración de 2,40% v/v, equivalente a $4,1 \times 10^4$ UFC mL^{-1} . Y a las 72 h, la concentración corresponde al 0,56% v/v, equivalente a $9,5 \times 10^3$ UFC mL^{-1} .

2.2.2. Prueba de esporulación en cámara húmeda

Se registró el porcentaje de individuos con esporulación de *B. bassiana* y de individuos con remoción de cera observable, que variaron respectivamente desde un 3,8% (concentración 0,1% v/v) hasta un 15% (concentración 100% v/v), y desde un 0% hasta un 33,8% en estos mismos tratamientos (Figura 12).

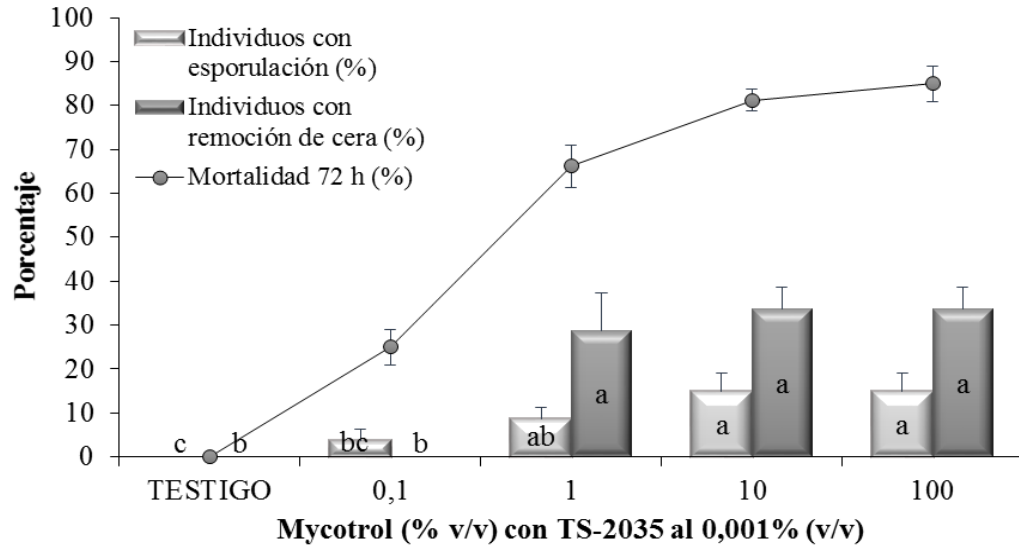


Figura 12. Esporulaci3n de *B. bassiana* y remoci3n de cera en hembras adultas de *P. viburni* a diferentes concentraciones de Mycotrol (% v/v) con 0,001% (v/v) de TS-2035, registradas luego de 144 h en c3mara h3meda, y contrastadas con la mortalidad a las 72 h. Letras distintas, en columnas del mismo color, indican diferencias significativas seg3n la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$).

Un an3lisis de correlaci3n de Pearson ($p < 0,01$) indic3 que una fuerte relaci3n lineal positiva contrastando los individuos con esporulaci3n y con remoci3n de cera ($r = 0,83$), y tambi3n al contrastar ambas variables con la mortalidad a 72 h ($r = 0,91$ y $0,94$, respectivamente).

2.2.3 An3lisis de viabilidad de esporas (prueba de germinaci3n)

Los porcentajes de germinaci3n de este an3lisis se detallan a continuaci3n (Figura 13).

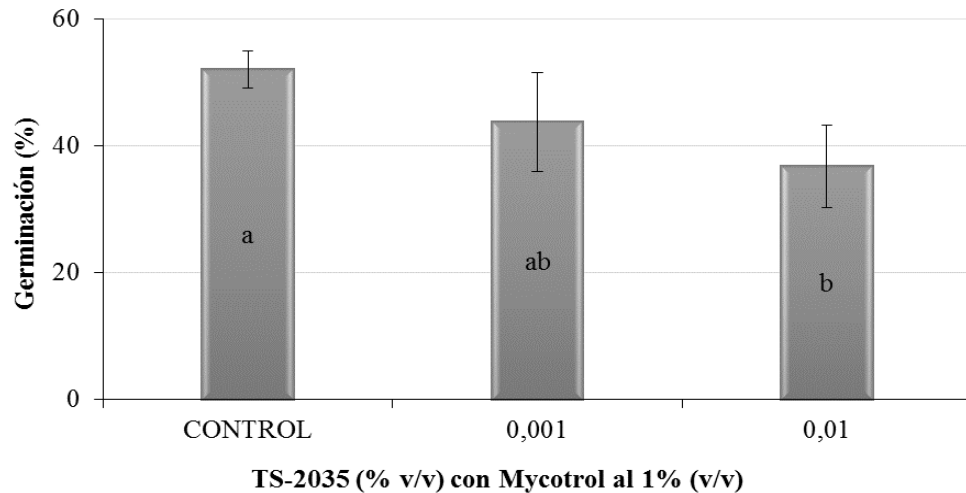


Figura 13. Germinaci3n de *B. bassiana* en Agar Papa Dextrosa (PDA) a 20 °C, registrada a las 36 h. Letras distintas indican diferencias estad3sticamente significativas seg3n la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$).

Seg3n estos resultados, a pesar de que se aprecia una tendencia, la adici3n de la concentraci3n cr3tica (0,001% v/v) de TS-2035 no disminuy3 la germinaci3n de conidias de *B. bassiana*. Sin embargo, una concentraci3n diez veces superior s3 tuvo un efecto negativo, respecto del control. El coeficiente de variaci3n en este ensayo fue de 13,78%.

2.3. Comparación de pH de Mycotrol en presencia de TS-2035

El pH de la solución de Mycotrol al 100% v/v es, en promedio, significativamente menor al de la solución al 0,1% v/v. Sin embargo, la adición de la concentración crítica de TS-2035, en ambas concentraciones, no tiene un efecto significativo sobre su pH (cuadro 1).

Cuadro 1. Valores de pH de Mycotrol (% v/v) con y sin TS-2035 al 0,001% (v/v).

Mycotrol (% v/v)	TS-2035 (% v/v)	pH (\pm D.E.)*
0,1	0	7,0 \pm 0,1 a
0,1	0,001	6,9 \pm 0,1 a
100	0	6,4 \pm 0,1 b
100	0,001	6,4 \pm 0,1 b

* = Valores de pH seguidos por letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$).

Cabe destacar que, para descartar un posible efecto en el pH de las soluciones, se agregaron los productos (Mycotrol y TS-2035) en distinto orden, sin obtener variaciones significativas (apéndice 1).

2.4. Comparación de CL₅₀

Para verificar si existieron diferencias significativas en las concentraciones letales medias (CL₅₀) obtenidas con Mycotrol y las respectivas mezclas con detergente, se procedió a compararlos en los dos períodos registrados de mortalidad (cuadro 2).

Cuadro 2. Concentraciones letales medias (CL₅₀) en UFC (viables) mL⁻¹ del insecticida Mycotrol (% v/v) con y sin TS-2035 al 0,001% (v/v), registradas a las 24 y 72 h.

Tratamiento	Tiempo (h)	Log (CL ₅₀)	CL ₅₀ (UFC mL ⁻¹)*
Mycotrol	24	0,19	2,6 x 10 ⁴ c
Mycotrol + TS-2035	24	0,38	4,1 x 10 ⁴ c
Mycotrol	72	-0,02	1,6 x 10 ⁴ b
Mycotrol + TS-2035	72	-0,25	9,5 x 10 ³ a

* = Los valores de concentración letal media (CL₅₀) seguidos por letras distintas indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica de Friedman ($p < 0,05$).

Es decir, sólo a las 72 h, la adición de TS-2035 al 0,001% v/v potencia significativamente la mortalidad de *P. viburni* provocada por Mycotrol (% v/v). Además, en este tiempo de evaluación, la mortalidad con o sin TS-2035 es superior a lo registrado a las 24 h.

3. Efecto de clorpirifós (48% p/v) en la mortalidad de *P. viburni*

3.1. Mortalidad de *P. viburni* vs concentración de clorpirifós:

Según la Figura 14, se puede observar que, a medida que aumenta la concentración del insecticida, la mortalidad también se ve incrementada, en ambos tiempos evaluados.

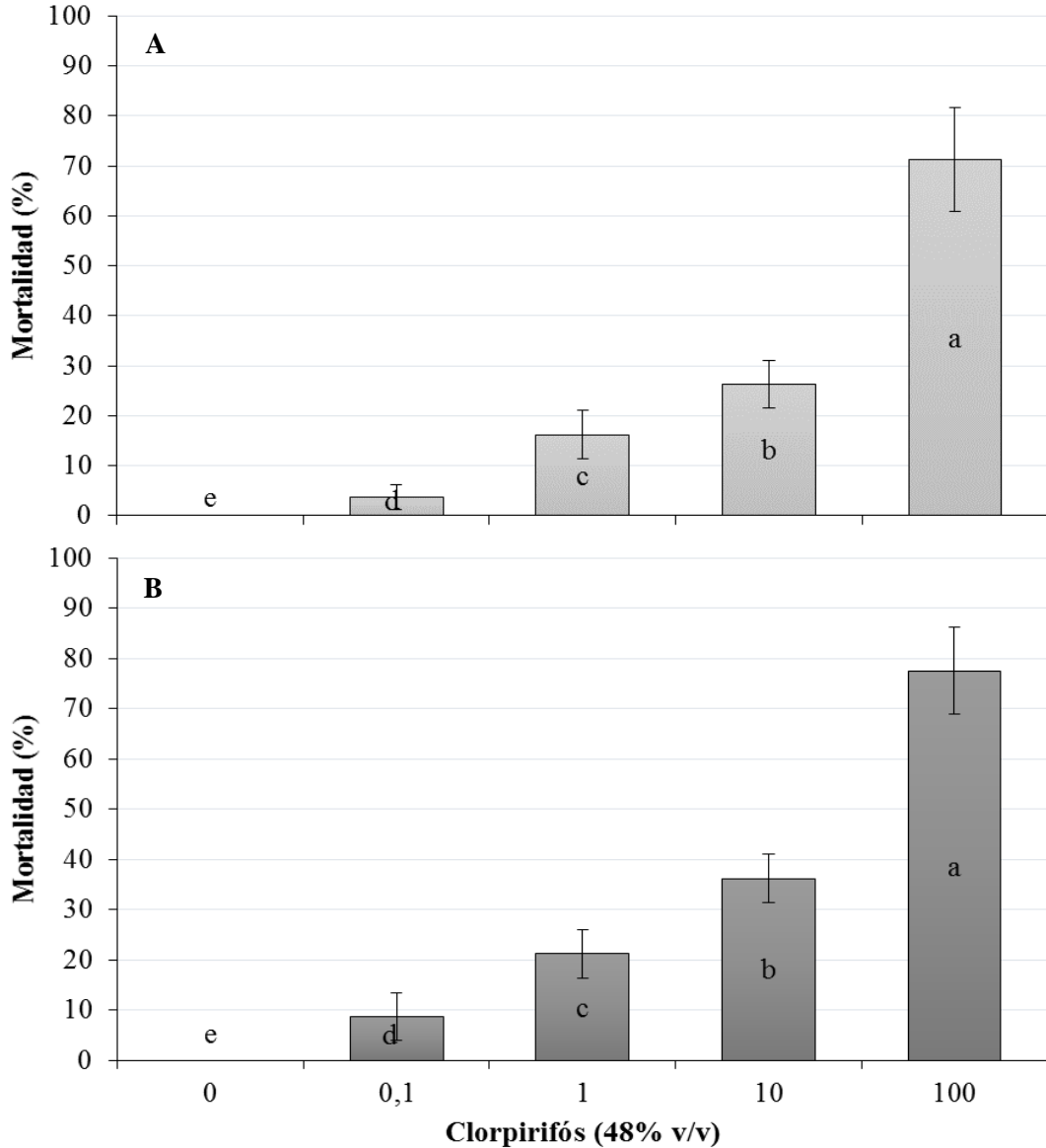


Figura 14. Mortalidad (%) de hembras adultas de *P. viburni* expuestas a diferentes concentraciones de clorpirifós (48% p/v), registrado a las 24 h (A) y 72 h (B). 100% = 1,2 mL p.c./L agua. Letras distintas en columnas de cada tiempo evaluado indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba no paramétrica de Friedman ($p < 0,05$).

3.1.1. Análisis Probit

Para verificar si existe una diferencia en las CL_{50} de cada período, se procedió a realizar el análisis Probit de ambas curvas de mortalidad (Figura 15).

Los valores exactos del logaritmo de las concentraciones de insecticida que causan una mortalidad de 50% fueron de 1,47 (Figura 15A) y 1,17 (Figura 15B), es decir, a las 24 h la CL_{50} se alcanza con una concentración de 29,51%, equivalente a 0,35 mL p.c./L agua (169,98 ppm). Por otra parte, a las 72 h, la concentración requerida de clorpirifós corresponde al 14,79%, equivalente a 0,18 mL p.c./L agua (85,19 ppm).

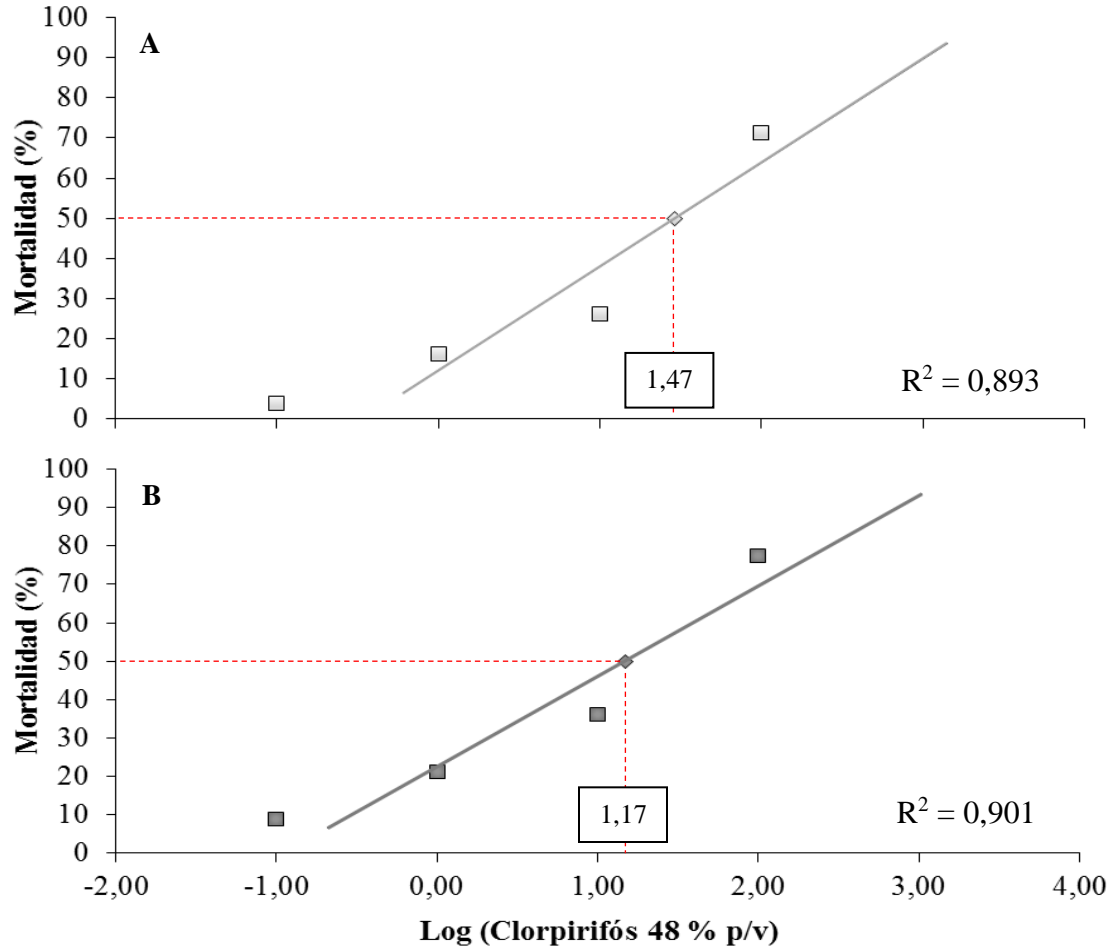


Figura 15. Probit de la mortalidad hembras adultas de *P. viburni* a diferentes concentraciones de clorpirifós (48% p/v), registrada a las 24 h (A) y 72 h (B), con un 5% de significancia.

3.1.2 Evaluación de pH de concentraciones de Lorsban 4E (clorpirifós 48% p/v)

Los resultados de pH de este insecticida convencional se observan en la Figura 16.

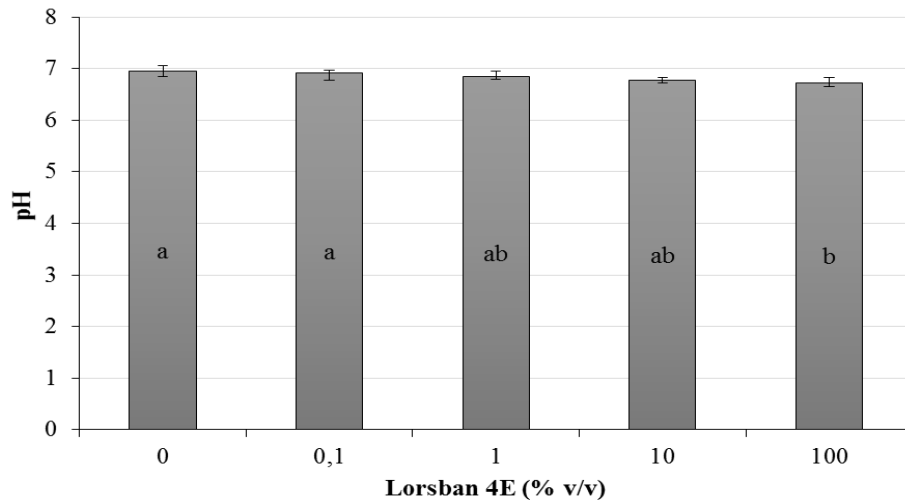


Figura 16. Promedio de pH para las distintas concentraciones de Lorsban 4E (100% v/v = 1,2 mL p.c./L agua). Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$).

Es decir, sólo la concentración máxima (100% v/v) disminuye significativamente el pH. Esto se explica por la acidez del producto comercial (5,19) (Anexo 2), que hace disminuir significativamente el pH de la solución a partir de la dosis recomendada (576 ppm).

3.2. Efecto de la adición de TS-2035 a clorpirifós en la mortalidad de *P. viburni*

En este caso, se mantiene la tendencia anterior de que existe un incremento significativo de la mortalidad a medida que aumentan las concentraciones de clorpirifós (Figura 17).

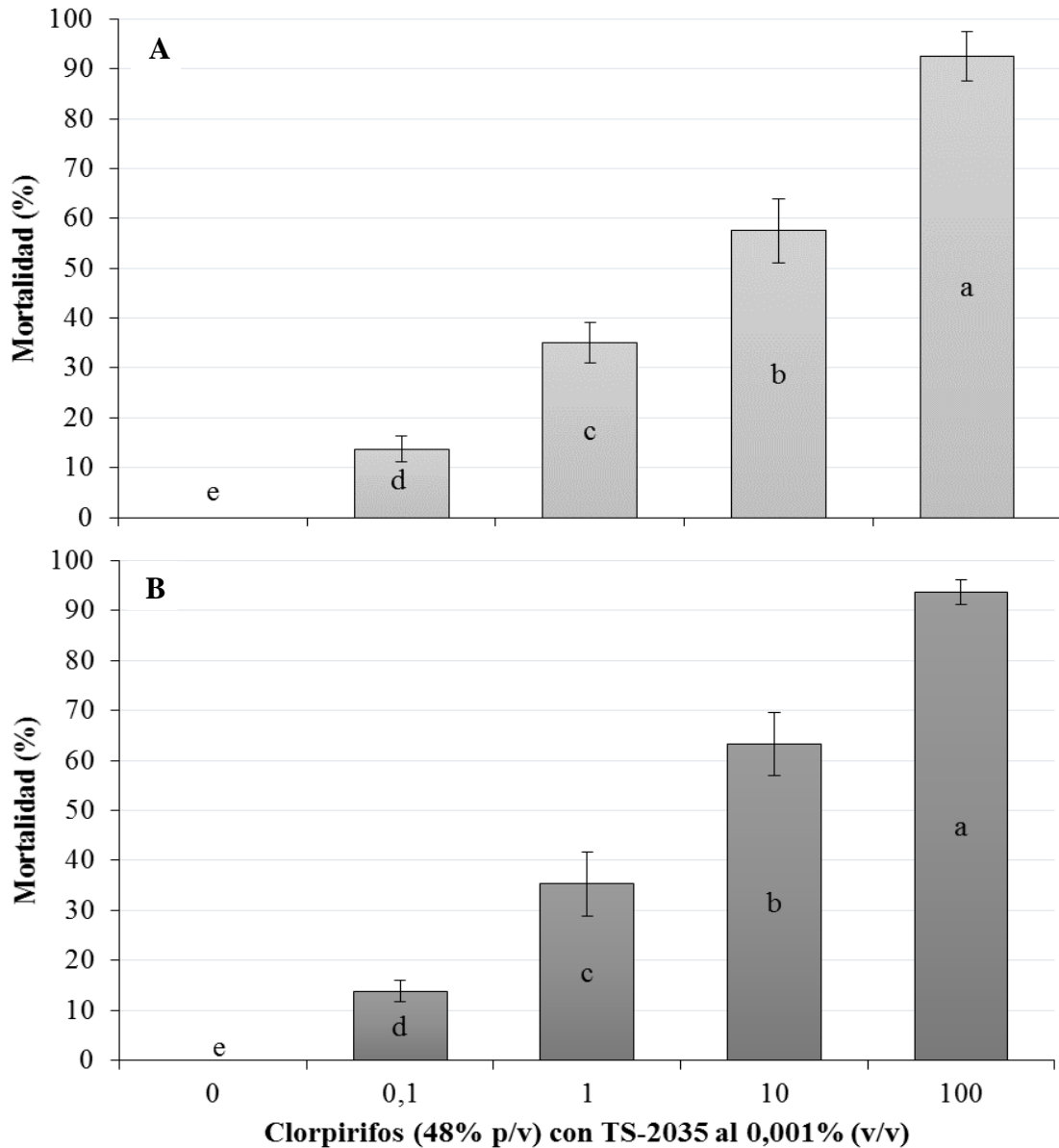


Figura 17. Mortalidad (%) de hembras adultas de *P. viburni* expuestas a diferentes concentraciones de clorpirifós (48% v/v) con 0,001% v/v de TS-2035, registrado a las 24 h (A) y 72 h (B). 100% = dosis recomendada de 1,2 mL p.c./L agua). Letras distintas en columnas de cada tiempo de evaluación indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Tukey (p < 0,05).

El tratamiento con la concentración más alta (100% v/v, equivalente a 576 ppm i.a.) causó una mayor mortalidad de alrededor de 95% y fue significativamente diferente, en ambos

tiempos evaluados. Los coeficientes de variación para este ensayo fueron de 11,62% (Figura 17A) y 11,72% (Figura 17B).

3.2.1. Análisis Probit

Para comparar estos resultados de manera estandarizada con el Ensayo 1, se procedió a realizar un análisis Probit con estos nuevos porcentajes de mortalidad y así verificar si existió una variación de la CL_{50} (Figura 18).

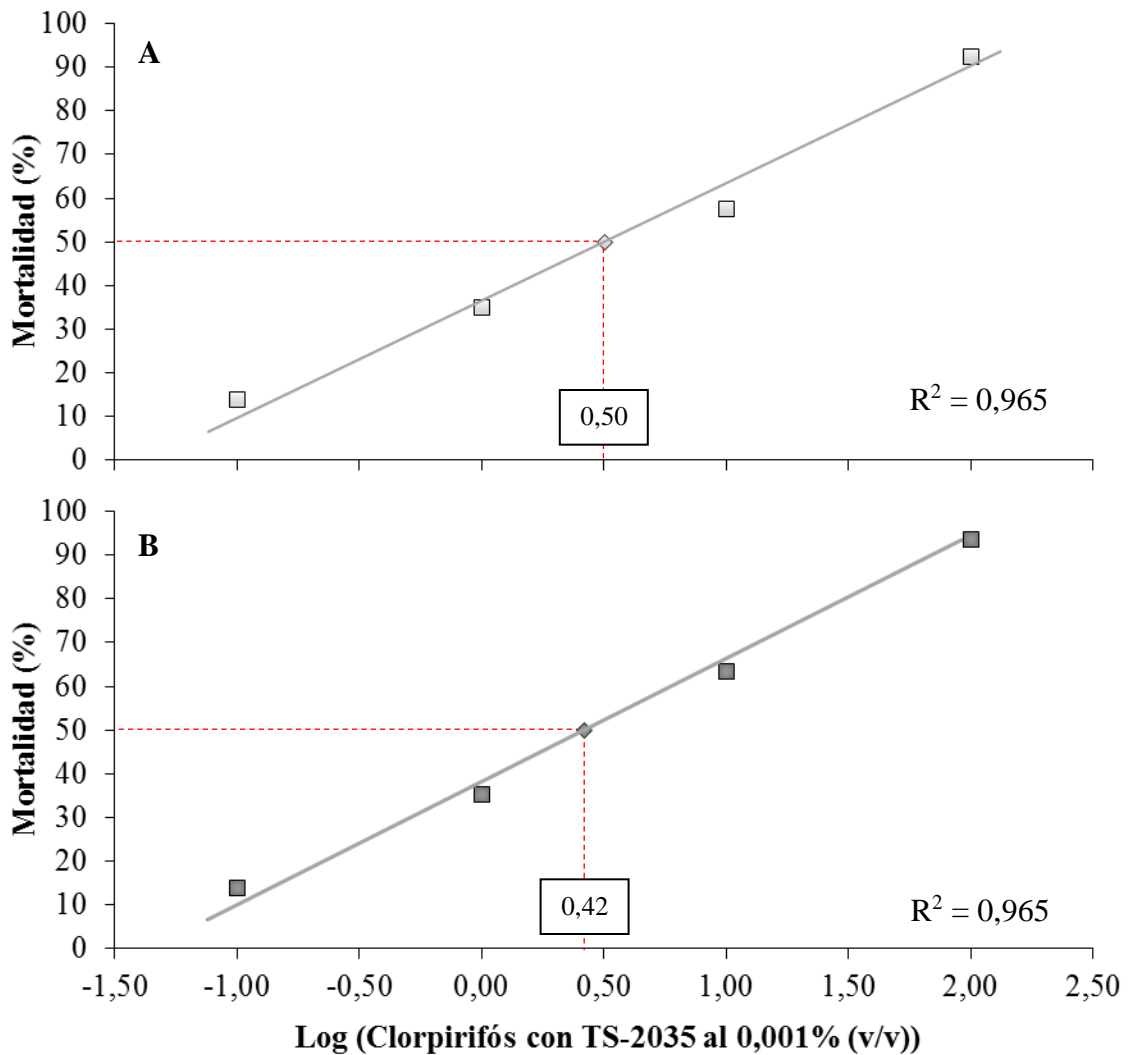


Figura 18. Probit de la mortalidad de hembras adultas de *P. viburni* a diferentes concentraciones de clorpirifós (48% p/v) con 0,001% v/v de TS-2035, registrada a las 24 h (A) y 72 h (B), con un 5% de significancia.

Los valores exactos del logaritmo de las concentraciones de insecticida más detergente que causan una mortalidad de 50% fueron de 0,50 (Figura 18A) y 0,42 (Figura 18B), es decir, a las 24 h, la CL_{50} se alcanza con una concentración de 3,16% v/v, equivalente a 0,04 mL p.c./L agua (18,20 ppm), y a las 72 h, la concentración corresponde al 2,63% v/v, equivalente a 0,03 mL p.c./L agua (15,15 ppm) aproximadamente.

3.3. Comparación de pH de clorpirifós con y sin detergente TS-2035

En el caso de clorpirifós, solamente la concentración al 100% de la dosis recomendada, sin adición de detergente, es significativamente menor a los demás tratamientos (cuadro 3). Es decir, esta adición de detergente incrementa significativamente el pH de clorpirifós en esta concentración, igualando lo alcanzado en la concentración mínima (0,1% v/v) o en la respectiva mezcla. Cabe destacar que, se presumió un posible efecto sobre el pH de las soluciones según el orden en que se agregaran los productos, pero en la práctica no hubo variación significativa al contrastar los resultados con un análisis estadístico (apéndice 1).

Cuadro 3. Valores de pH de clorpirifós (48% p/v) con y sin TS-2035 (0,001% v/v).

Clorpirifós (% v/v)	TS-2035 (% v/v)	pH (\pm D.E.) [*]
0,1	0	7,1 \pm 0,1 a
0,1	0,001	7,0 \pm 0,0 a
100	0	6,7 \pm 0,0 b
100	0,001	6,9 \pm 0,1 a

^{*} Los valores de pH seguidos por letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$).

3.4. Comparación de CL₅₀

Para verificar si existieron diferencias estadísticamente significativas en las CL₅₀ obtenidas anteriormente versus las CL₅₀ obtenidas para clorpirifós en mezcla con el detergente, se procedió a compararlos en los dos tiempos registrados de mortalidad (cuadro 4).

Cuadro 4. Concentraciones letales medias, para cada repetición, de clorpirifós (48% p/v) con y sin TS-2035 (0,001% v/v).

Tratamiento	Tiempo (h)	Log (CL ₅₀)	CL ₅₀ (μ g/insecto)	CL ₅₀ ¹ (ppm)
Clorpirifós	24	1,47	0,20	169,98 c
Clorpirifós + TS-2035	24	0,50	0,02	18,20 a
Clorpirifós	72	1,17	0,10	85,19 b
Clorpirifós + TS-2035	72	0,42	0,02	15,15 a

¹ = Los valores de concentración letal media (CL₅₀) seguidas por letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Según el análisis estadístico, todas las concentraciones letales medias calculadas (insecticida con y sin detergente y registradas en ambos tiempos) fueron significativamente distintas entre sí. Es decir, en promedio, la adición de la concentración crítica del detergente TS-2035 a las distintas concentraciones de clorpirifós provoca un aumento significativo en la mortalidad de chanchitos blancos, en ambos tiempos evaluados post aspersiones, bajo las condiciones del presente estudio.

4. Efecto de *M. anisopliae* en la mortalidad de *P. viburni*

4.1. Mortalidad de *P. viburni* vs concentración de *M. anisopliae*

Los resultados de mortalidad se pueden observar en la Figura 19.

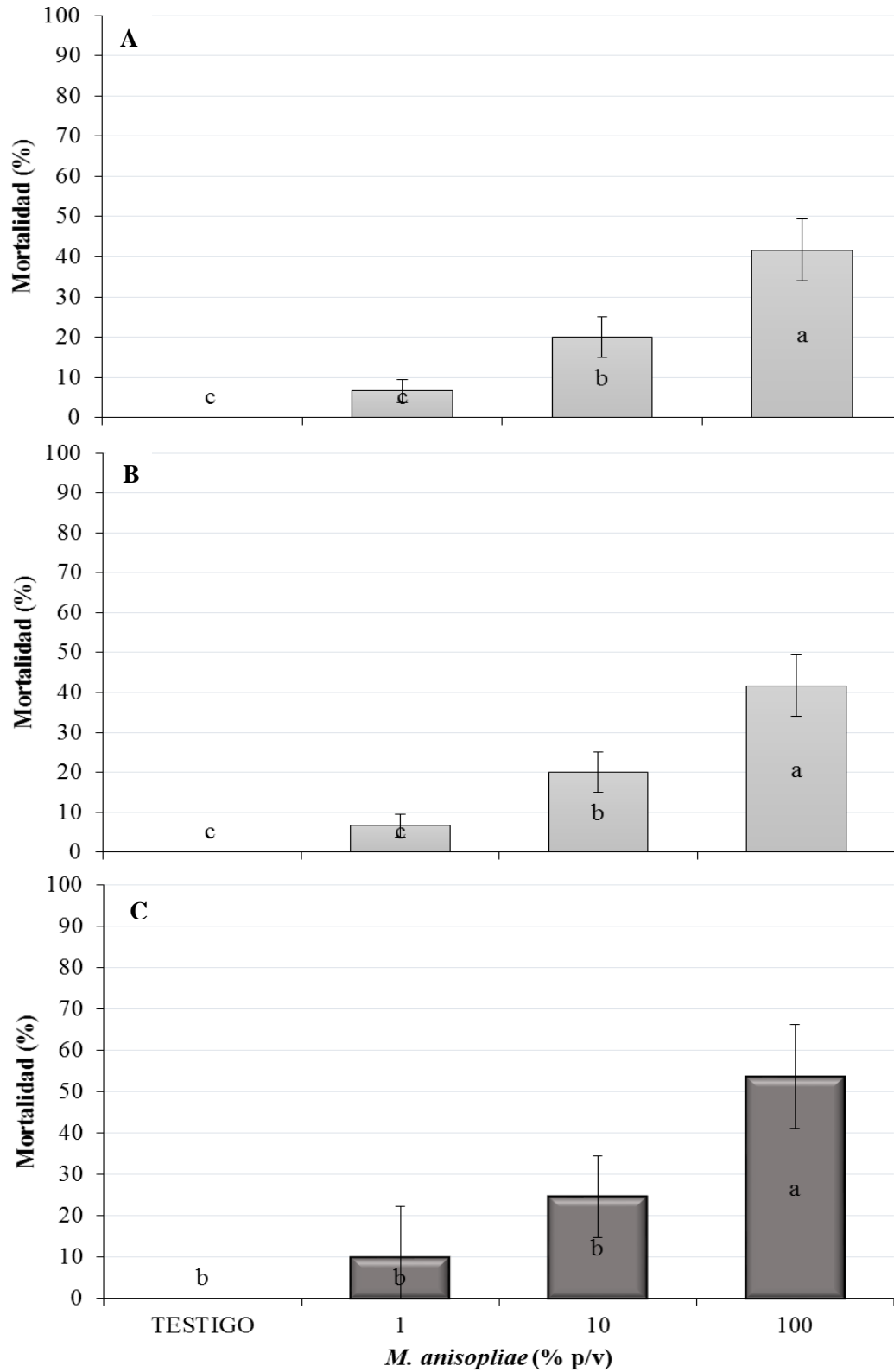


Figura 19. Mortalidad (%) de hembras adultas de *P. viburni* expuestas a diferentes concentraciones de *M. anisopliae* (% p/v), registrado a las 24 (A), 72 (B) y 144 h (C). 100% = $3,7 \times 10^7$ UFC (viables) mL⁻¹. Letras distintas en columnas de cada período de evaluación indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$).

Se aprecia que, a medida que aumenta la concentración del insecticida, la mortalidad se ve incrementada significativamente, en los tres tiempos evaluados. Los coeficientes de variación fueron de 28,88% (Figura 19A), 34,93% (Figura 19B) y 17,17% (Figura 19C).

4.1.1. Análisis Probit

Con los resultados anteriores, se realizó el análisis Probit de las curvas de mortalidad (Figura 20).

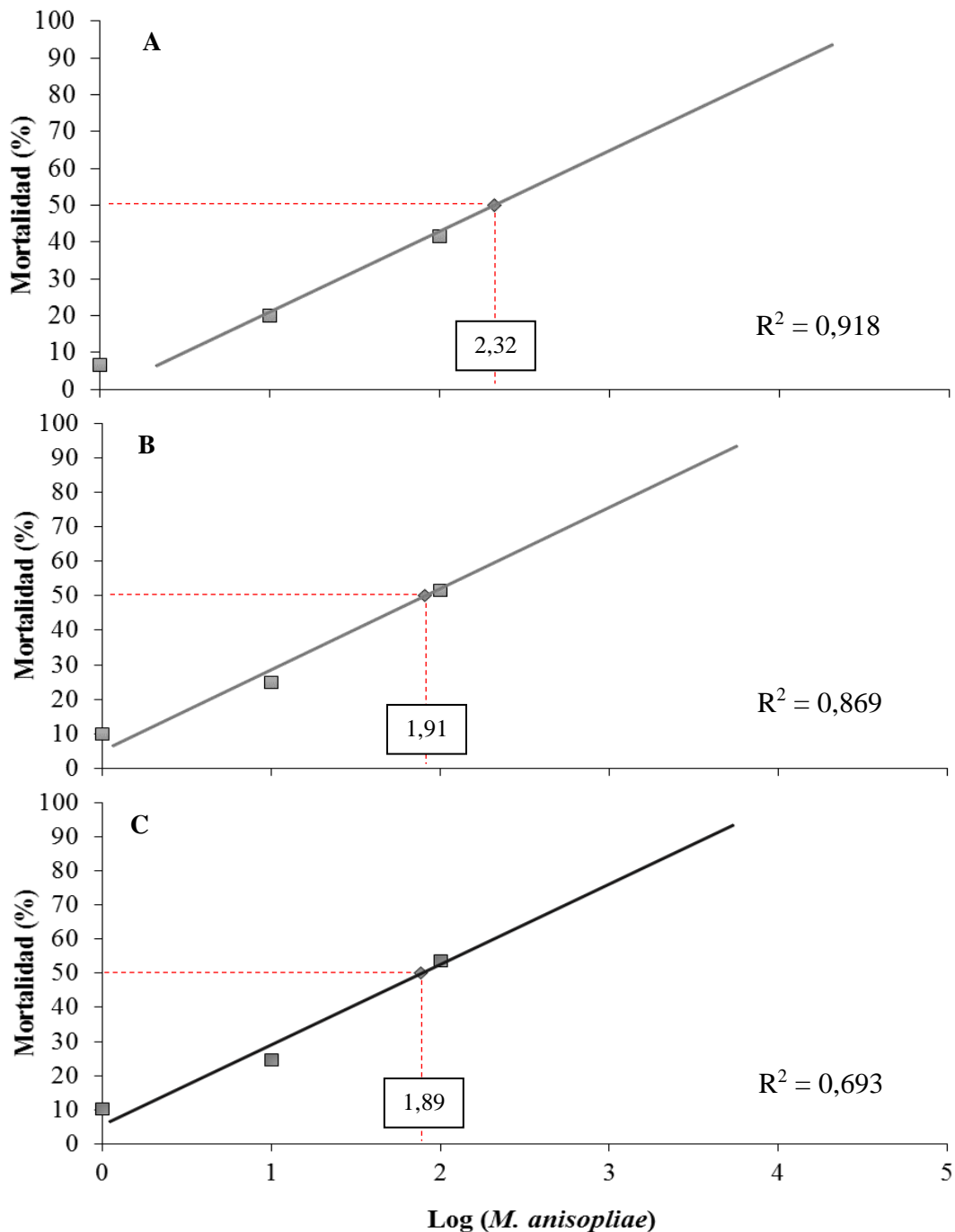


Figura 20. Probit de la mortalidad hembras adultas de *P. viburni* a diferentes concentraciones de *M. anisopliae* (% p/v), registrada a las 24 (A), 72 (B) y 144 h (C) con un 5% de significancia.

Los valores del análisis Probit del logaritmo de las concentraciones de insecticida que causan una mortalidad de 50% fueron de 2,32 (Figura 20A), 1,91 (Figura 20B) y 1,89 (Figura 20C). Es decir, a las 24 h la CL_{50} se alcanza con una concentración de conidias viables de *M. anisopliae* de $7,8 \times 10^7$ UFC mL⁻¹. Por otra parte, a las 72 h la concentración requerida corresponde a $3,0 \times 10^7$ UFC mL⁻¹. Finalmente, a las 144 h esta concentración es muy similar a la anterior, $2,9 \times 10^7$ UFC mL⁻¹.

4.1.2. Prueba de esporulación en cámara húmeda

En este caso, fue menor el porcentaje de individuos con esporulación de *M. anisopliae* observada en cámara húmeda, comparado con los resultados de *B. bassiana*. Los valores fueron desde 0,83% (concentración 1% p/v) hasta 2,5% (concentración 100% p/v). El mayor porcentaje de esporulación se observó con la concentración más alta, y disminuyó a menores concentraciones (Figura 21).

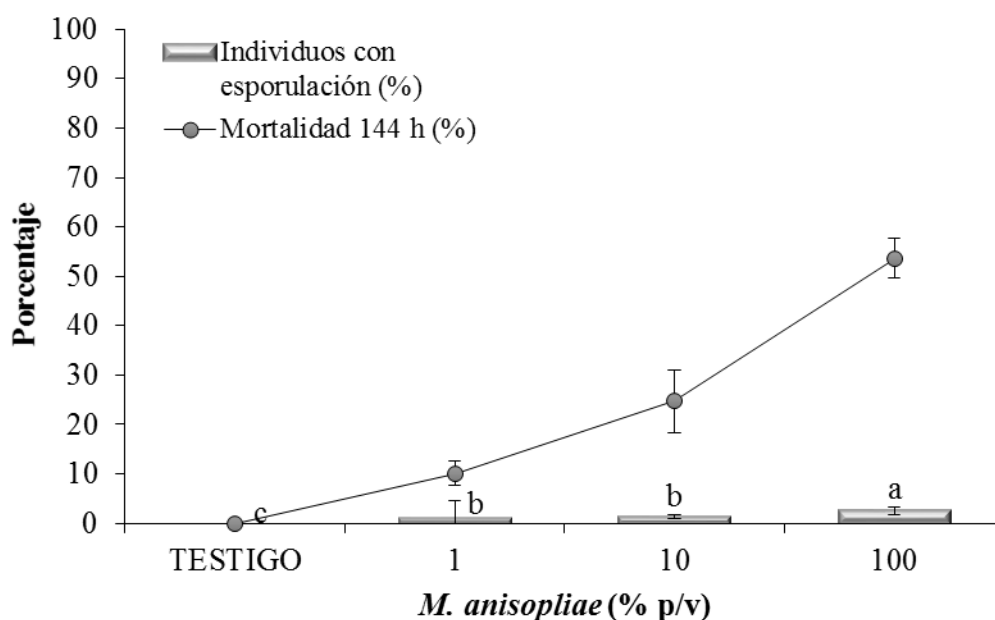


Figura 21. Esporulación de *M. anisopliae* en hembras adultas de *P. viburni*, registrada en cámara húmeda 13 días post exposición, en contraste con la mortalidad registrada a las 144 h. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

A pesar de esto, se aprecia que existiría una relación lineal directa entre ambas variables, lo que se comprobó luego de realizar un análisis de correlación de Pearson ($p < 0,01$) que arrojó un valor de $r = 0,89$. Es decir, a medida que se incrementó el porcentaje de mortalidad de estos insectos, también aumentó proporcionalmente el porcentaje de individuos con esporulación de *M. anisopliae*. Cabe destacar que, en estos individuos evaluados no se observó remoción total de cera.

4.1.3. Evaluación de pH en las suspensiones de *M. anisopliae*

De acuerdo a estos resultados, la concentración al 100% produjo un pH de la suspensión significativamente menor al de la concentración 10% y ambos, a su vez, menores al resto de los tratamientos, que no se diferenciaron entre ellos (Figura 22).

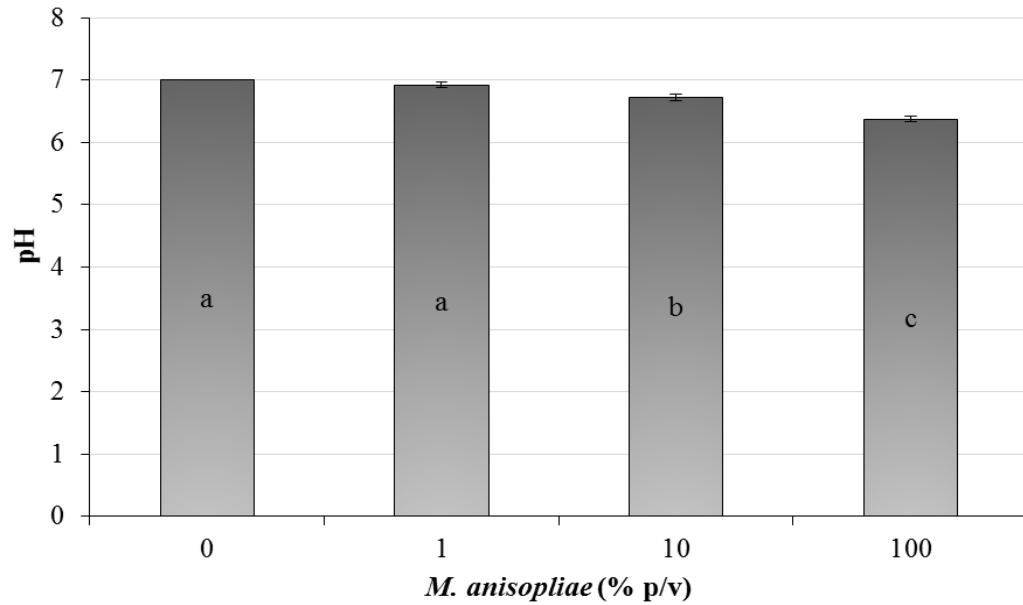


Figura 22. PH para las concentraciones de *M. anisopliae* (% p/v). 100% = $3,7 \times 10^7$ UFC (viables) mL⁻¹. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$).

En este caso, al igual que lo observado con Mycotrol, al incrementar la concentración de *M. anisopliae*, se disminuyó el pH de los tratamientos a partir de un 10% p/v. El coeficiente de variación de este experimento fue de 56%.

4.2. Efecto de la adición de TS-2035 a *M. anisopliae* en la mortalidad de *P. viburni*

En la Figura 23, se observa que la mortalidad de hembras adultas de *P. viburni*, provocada por la aspersión de estos nuevos tratamientos, mantuvo la tendencia de los anteriores resultados hacia un incremento significativo a medida que aumentan las concentraciones de *M. anisopliae*. La mortalidad promedio alcanzó el 80% aproximadamente, con la concentración más alta (100% p/v). Los coeficientes de variación fueron 17,17% (Figura 23A), 17,43% (Figura 23B) y 8,43% (Figura 23C).

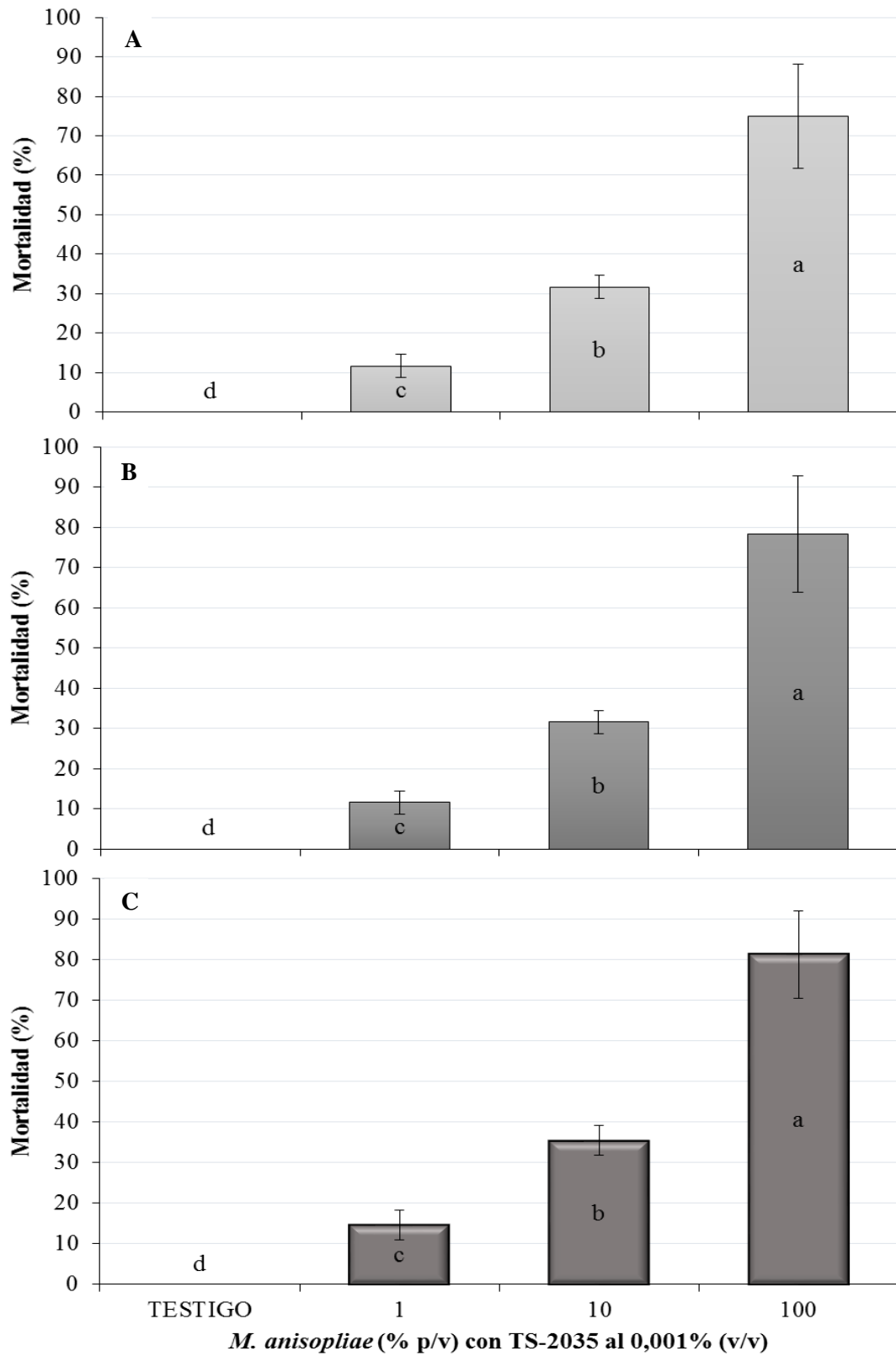


Figura 23. Mortalidad (%) de hembras adultas de *P. viburni* expuestas a distintas concentraciones de *M. anisopliae* (% p/v) con TS-2035 al 0,001% (v/v), registrada a las 24 h (A), 72 h (B) y 144 h (C). 100% = $3,7 \times 10^7$ UFC (viables) mL⁻¹. Letras distintas en columnas de cada tiempo evaluado indican diferencias significativas, según la prueba de Friedman ($p < 0,05$).

4.2.1. Análisis Probit

Para verificar si existió una variación de la CL_{50} comparando los resultados anteriores de manera estandarizada con los del Ensayo 2 de *M. anisopliae*, se procedió a realizar un análisis Probit con estos nuevos porcentajes de mortalidad (Figura 24).

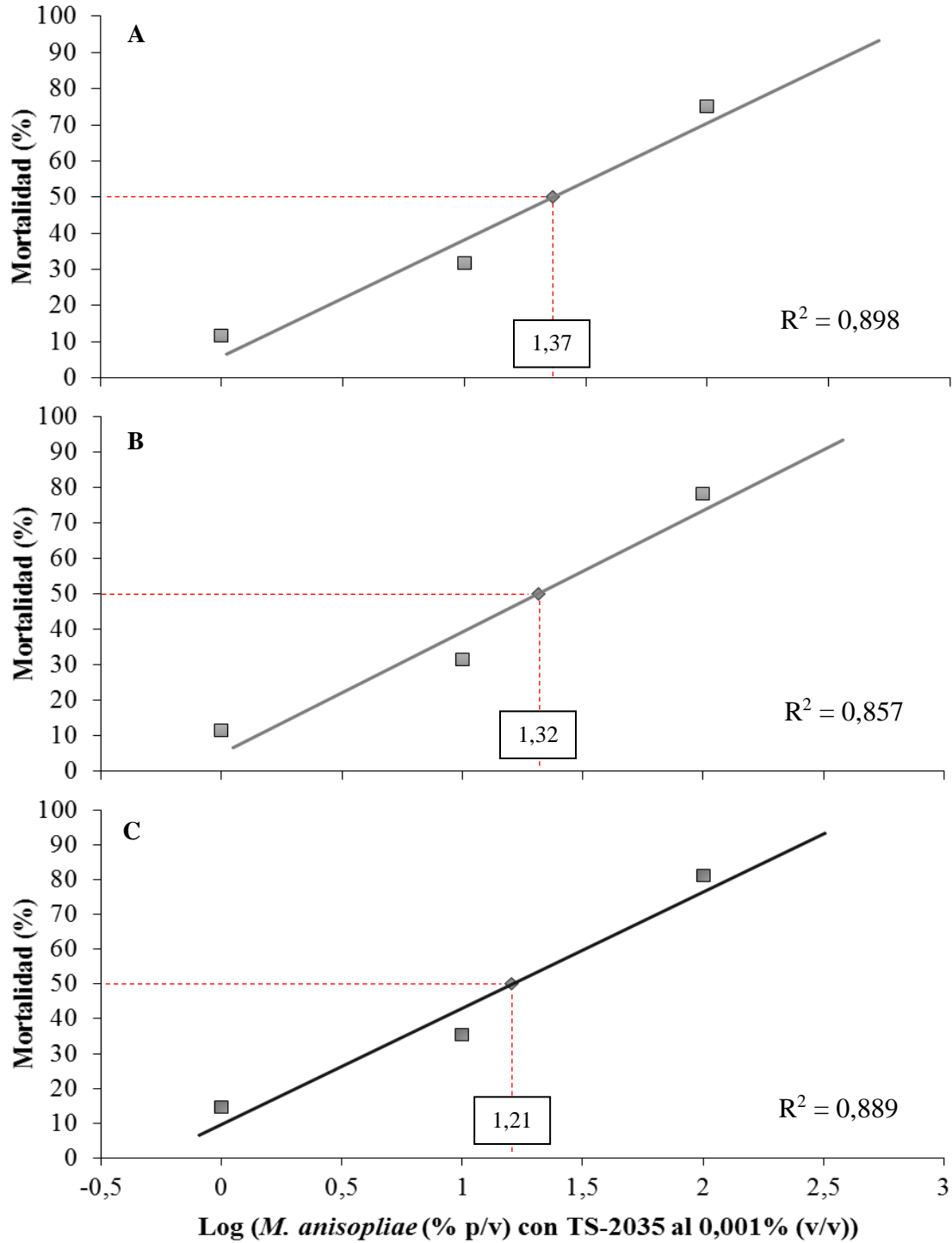


Figura 24. Probit de la mortalidad de hembras adultas de *P. viburni* a diferentes concentraciones de *M. anisopliae* (% p/v) con 0,001% (v/v) de TS-2035, registrada a las 24 (A), 72 (B) y 144 h (C), con un 5% de significancia.

Los valores exactos del logaritmo de las concentraciones de este hongo entomopatógeno (en presencia de detergente) que causan una mortalidad de 50% fueron de 1,37 (Figura 24A), 1,32 (Figura 24B) y 1,21 (Figura 24C), es decir, a las 24 h, la CL_{50} se alcanzó con una concentración de $8,6 \times 10^6$ UFC mL^{-1} . Por otra parte, a las 72 h, la concentración equivale a $7,6 \times 10^6$ UFC mL^{-1} . Finalmente, a las 144 h, esta concentración equivale a $6,0 \times 10^6$ UFC mL^{-1} .

4.2.2. Prueba de esporulación en cámara húmeda

Se registró el porcentaje de individuos con esporulación de *M. anisopliae* y de individuos con remoción de cera total, que variaron respectivamente desde un 1,7% (concentración 1% p/v) hasta un 11,7% (concentración 100% p/v), y desde un 3,9% hasta un 15,6% en estos mismos tratamientos (Figura 25). Es decir, el porcentaje de esporulación se incrementó en el tratamiento con la concentración 100% p/v comparado con lo obtenido sin detergente. Por lo tanto, así como aumentó el porcentaje de mortalidad a las 144 h, también aumentó el porcentaje de individuos con esporulación y con remoción de cera.

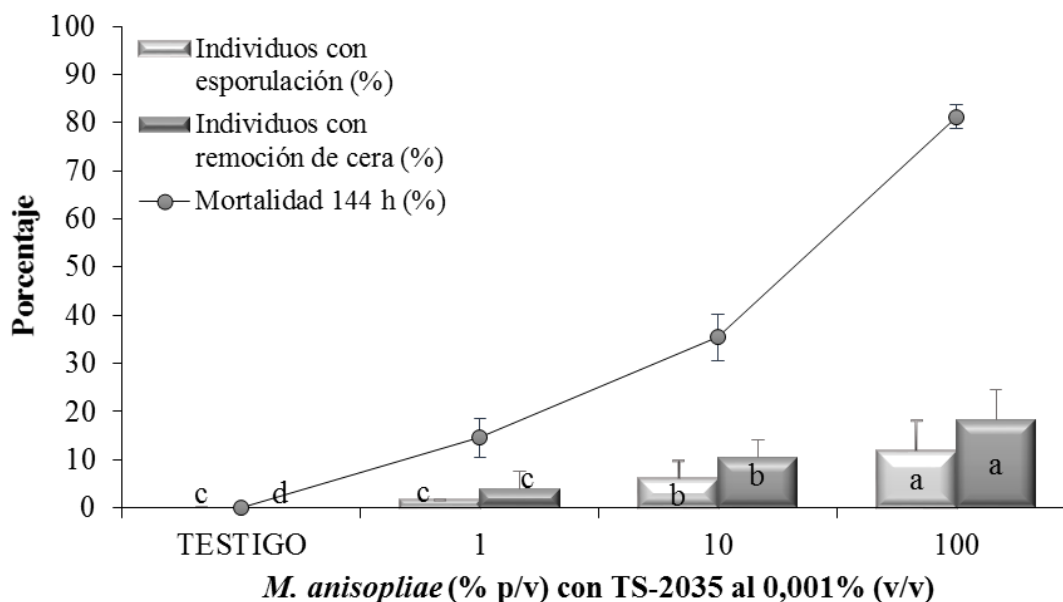


Figura 25. Esporulación de *M. anisopliae* y remoción de cera en hembras adultas de *P. viburni* a diferentes concentraciones (% p/v) con 0,001% v/v de TS-2035, registradas en cámara húmeda 13 días post exposición, y contrastadas con la mortalidad a las 144 h. 100% = $3,7 \times 10^7$ UFC (viables) mL^{-1} . Letras distintas, en columnas de un mismo color, indican diferencias significativas según la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$).

Un análisis de correlación de Pearson ($p < 0,01$) indicó una fuerte relación lineal positiva contrastando los individuos con esporulación y con remoción de cera ($r = 0,97$), y también al contrastar ambas variables con la mortalidad a 72 h ($r = 0,98$, en ambos casos).

4.2.3 Análisis de viabilidad de esporas (prueba de germinación)

Los porcentajes de germinación de este análisis se detallan a continuación (Figura 26).

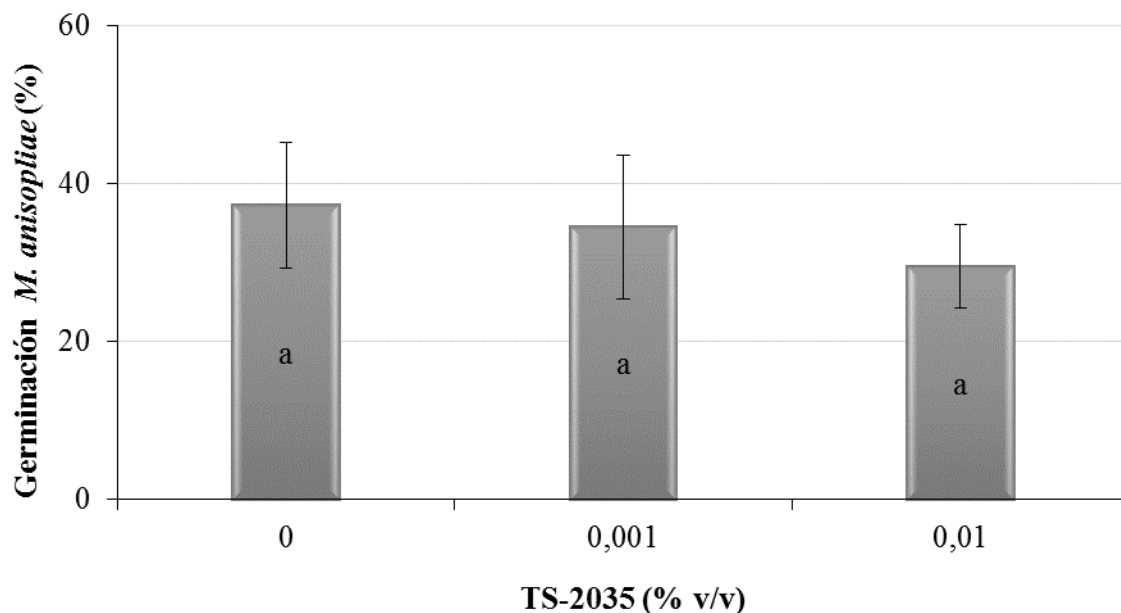


Figura 26. Germinación de *M. anisopliae* (%), registrada a los 6 días de incubación en PDA a 20° C. Letras iguales indican diferencias no significativas según el ANDEVA ($p < 0,05$).

Según estos resultados, la germinación de conidias de *M. anisopliae* no se vió afectada significativamente con la adición de TS-2035, inclusive en la concentración diez veces superior a la concentración crítica, a diferencia de lo observado en la germinación de *B. bassiana*. El coeficiente de variación en este ensayo fue de 21,95%.

4.3. Comparación de pH de suspensiones de *M. anisopliae* en presencia de TS-2035

El pH de la solución de *M. anisopliae* al 100% p/v fue, en promedio, significativamente menor al de la solución al 1% p/v. Sin embargo, la adición de la concentración crítica de TS-2035 a la concentración menor del entomopatógeno, tuvo un efecto alcalinizante sobre el pH de la solución (Cuadro 5). En cambio, con la concentración mayor de *M. anisopliae*, esta adición de detergente no influyó en el pH de la solución.

Cuadro 5. Valores de pH de *M. anisopliae* (% p/v) con y sin TS-2035 al 0,001% (v/v).

<i>M. anisopliae</i> (% p/v)	TS-2035 (% v/v)	pH (\pm D.E.) [*]
1	0	6,9 \pm 0,0 b
1	0,001	7,4 \pm 0,1 a
100	0	6,4 \pm 0,0 c
100	0,001	6,4 \pm 0,1 c

* = Valores de pH seguidos por letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$).

4.4. Comparación de CL₅₀

Para verificar si existieron diferencias significativas en las concentraciones letales medias (CL₅₀) obtenidas con *M. anisopliae* y las respectivas mezclas con detergente, se procedió a compararlos en todos los períodos registrados de mortalidad (cuadro 6).

Cuadro 6. Concentraciones letales medias (CL₅₀) en UFC (viables) mL⁻¹ de *M. anisopliae* con y sin TS-2035 al 0,001% v/v.

Tratamiento	Tiempo (h)	Log (CL ₅₀)	CL ₅₀ (UFC mL ⁻¹)*
<i>M. anisopliae</i>	24	2,36	8,6 x 10 ⁷ c
<i>M. anisopliae</i> + TS-2035	24	1,38	8,8 x 10 ⁶ ab
<i>M. anisopliae</i>	72	1,95	3,3 x 10 ⁷ c
<i>M. anisopliae</i> + TS-2035	72	1,32	7,8 x 10 ⁶ a
<i>M. anisopliae</i>	144	1,91	3,0 x 10 ⁷ bc
<i>M. anisopliae</i> + TS-2035	144	1,22	6,1 x 10 ⁶ a

* = Los valores de concentración letal media (CL₅₀) seguidos por letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (p < 0,05).

Es decir, la adición de TS-2035 al 0,001% v/v potencia significativamente la mortalidad de *P. viburni* provocada por *M. anisopliae*, en todos los tiempos evaluados.

Discusión

Características de patogenicidad de *B. bassiana* y *M. anisopliae*

Actualmente, existen escasos estudios en estas especies de hongos entomopatógenos sobre *P. viburni*. Además, hay discrepancia con respecto al tiempo que demoran en causar la muerte en ésta y otras especies de chanchitos blancos. Amnuaykanjanasin *et al.* (2013) señalan que la cepa BCC2660 (distinta a la usada en el presente estudio) de *B. bassiana* tardó 6 a 7 días en causar mortalidad total a *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero (Hemiptera: Pseudococcidae) asperjados con una concentración de 10^8 conidias mL^{-1} , superior a lo observado en *P. viburni* en concentraciones dos órdenes de magnitud menores (por lo que la cepa de *B. bassiana* presente en Mycotrol sería más eficaz para *P. viburni*) y disuelta en una solución de agua destilada y 0,1% v/v de Tween 80 (2 veces la concentración utilizada para las pruebas de germinación del presente estudio).

Barbarin *et al.* (2012) indican que la cepa I93-825 de *B. bassiana* causó mortalidad total entre 3 a 5 días después de aplicación sobre *Cimex lectularius* Linnaeus (Hemiptera: Cimicidae) en concentraciones de $1,6 \times 10^9$ conidias mL^{-1} . Similar al tiempo máximo evaluado con *B. bassiana* en este estudio (72 h) y con mayor concentración de inóculo.

En cuanto a *M. anisopliae*, en estudios de laboratorio, se reporta que la cepa CeMa9326 es eficaz controlador de *Aeneolamia varia* (F.) (Hemiptera: Cercopidae), con mortalidades entre 76 y 90% y al cabo de 3 a 4 días se observaron los primeros signos del hongo sobre el hospedero a una concentración de 1×10^7 UFC mL^{-1} (Bustillo y Castro, 2012; citados por Matabonchoy *et al.*, 2012), menor a lo observado en *P. viburni* en el presente estudio.

Pereira *et al.* (2011) reportan que la misma cepa de *M. anisopliae* utilizada en este estudio (Qu-M984) alcanzó un tiempo letal medio de entre 7,7 y 10,0 días, sobre *P. viburni*, en concentraciones desde $7,3 \times 10^5$ y $4,9 \times 10^9$ conidias mL^{-1} , mayores tiempos a los observados en el presente estudio. Pereira (2009), previamente reportó concentraciones letales medias de $3,2 \times 10^4$ conidias mL^{-1} , en 7,4 días como tiempo letal medio, asperjadas con esta cepa de *M. anisopliae* sobre hembras adultas de *P. viburni*, siendo este estadio el más vulnerable.

Por otra parte, se han reportado algunos estudios con estos HEP en otras especies menos emparentadas. Según Lezama (1993), *B. bassiana* y *M. anisopliae* causan mortalidad a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en TL_{50} de 4 y 3 días, respectivamente, a una concentración de 10^8 UFC mL^{-1} , 100 veces superior a la del presente estudio. Martínez (2010) señala que un aislado específico de *B. bassiana* para *Demotispa neivai* Bondar (Coleoptera: Chrysomelidae) alcanzó una mortalidad media a los 11 días, pero esto disminuyó significativamente luego de utilizar un formulado de esta cepa con diversos coadyuvantes (adherentes y fotoprotectores). Ello, a su vez, realza la importancia de utilizar formulaciones adecuadas para hongos entomopatógenos, y podría explicar las diferencias observadas en la mortalidad y esporulación de los hongos entomopatógenos evaluados en este estudio, ya que, en el caso de *M. anisopliae*, tan sólo con la adición de la concentración crítica de TS-2035 y de Tween 80 al 0,05% v/v, se incrementó la mortalidad y la

esporulación sobre *P. viburni*. En cambio, *B. bassiana*, al ser parte de una formulación comercial, fue más eficaz en el control de estos insectos y su esporulación en cámara húmeda se comenzó a observar en la mitad del tiempo que para el caso de *M. anisopliae*.

Sin embargo, no todos los surfactantes son adecuados para utilizar como coadyuvantes. Gran parte de su efectividad se centra en el pH y la presencia de componentes catiónicos o aniónicos en la solución. Según Holder (2005), se comienza a perjudicar la adherencia de las conidias de *B. bassiana* a superficies hidrofóbicas (30% menor) en suspensiones con pH inferiores a 4,0, con un rango óptimo entre 7,0 y 8,0, ligeramente superior a los pH evaluados con Mycotrol de este estudio (6,4-7,0 ± 0,1). Raja *et al.* (2010) señalan que la actividad enzimática (proteolítica) de *B. bassiana* se mantiene en un rango de pH desde 5,5 hasta 10,0, con un óptimo de 6,5-8,0, similar a los resultados del presente trabajo para las distintas concentraciones de Mycotrol. Con respecto a la presencia de componentes catiónicos o aniónicos, los mismos autores señalan que estos últimos afectan mayoritariamente el proceso patogénico de este hongo.

Beauveria bassiana, además, produce varios metabolitos alcaloides, principalmente bassianinas (Vining *et al.*, 1962; Suzuki *et al.*, 1978; Roberts, 1981; Jeffs and Khachatourians, 1997; Strasser *et al.*, 2000; Quesada-Moraga and Vey, 2004; Vega *et al.*, 2008), con propiedades antimicrobiales como parte del proceso de colonización del hospedero, las cuales son necesarias para contrarrestar el efecto antagónico de las bacterias intestinales (Vega *et al.*, 2008) y para eliminar a otros microorganismos competidores (Lezama, 1993; Holder, 2005), pero estas sustancias son inactivadas por los detergentes que incluyen compuestos del tipo aniónicos (Holder, 2005), como los presentes en TS-2035 (Santibáñez, 2010; Soto, 2013), y también por los catiónicos y no-iónicos, sólo en concentraciones superiores al 0,1% (Holder, 2005).

Raja *et al.* (2010), además, señalan que al analizar la actividad proteolítica de *B. bassiana* en presencia de detergentes comerciales comunes de lavandería, se ve perjudicada, excepto con el detergente Ariel[®], que posee componentes aniónicos y que en concentraciones superiores a 10% la inhibió totalmente.

Saiz (2006), determinó que el detergente agrícola Neofrut KB-L2[®], que también contiene componentes aniónicos en su formulación, disminuyó la germinación de *B. bassiana* hasta en un 45% con respecto al tratamiento testigo, a una concentración de 100 mL / 200 L (50 veces mayor a la concentración utilizada de TS-2035), pero no así con *M. anisopliae*, que sólo se observó un efecto perjudicial de su germinación (cercano al 20%) con una concentración de 150 mL / 200 L. En cambio, Tween 80, reconocido surfactante utilizado para homogeneizar suspensiones conidiales, se compone de sustancias no-iónicas que no tienen efecto sobre la germinación de *B. bassiana* y *M. anisopliae* (Jin *et al.*, 2008).

Mishra *et al.* (2013) observaron que la germinación de *B. bassiana* disminuye significativamente en presencia de los surfactantes SDS y CTAB (aniónicos), no así con Tween 20 y Tween 80. Además, Holder (2005) también señala que los surfactantes SDS[®], Triton-X[®], Tween 20[®] y CTAB[®], en concentraciones del 0,2%, inhiben la adhesión de las conidias de *B. bassiana* a superficies hidrofóbicas (como las ceras epicuticulares de *P. viburni*) hasta en un 90%.

Por otra parte, Santos *et al.* (2011), observaron que el detergente Unitol® redujo significativamente la germinación conidial de *B. bassiana* evaluada a 120 min, pero, al analizar la esporulación de colonias en placas Petri, los valores observados fueron aproximadamente 80% de aquellos en el tratamiento control, lo que sugiere que estas conidias fueron capaces de recuperarse de los efectos negativos causados por este detergente, retrasando su germinación por un período de más de 16 horas, semejante a lo sucedido en el presente trabajo. Esto da relevancia al efecto adverso que algunos surfactantes provocan en las esporas de diferentes cepas y especies de hongos entomopatógenos, posiblemente debido a la distinta naturaleza de sus membranas celulares, afectando su permeabilidad y provocando pérdida de aminoácidos (Luz and Batagin, 2005; Mishra *et al.*, 2013), o a que, en algunos casos, estos productos tienden a agregarse a su alrededor impidiendo su germinación (Mishra *et al.*, 2013).

Un estudio del balance hidrofílico-lipofílico (Griffin, 1954; Jin *et al.*, 2008; Gadhav, 2014) de los tratamientos que incorporaron TS-2035 sería necesario para predecir su comportamiento al adicionarse a Mycotrol o a otras suspensiones con hongos entomopatógenos. Este balance permite acercarse a una predicción de la solubilidad de surfactantes en aceites o en agua (Gadhav, 2014), y así, poder explicar de manera más precisa su posible efecto en la patogenicidad de estos hongos (Jin *et al.*, 2008).

Tamerler *et al.* (1998), reportan que *M. anisopliae* necesita pH ligeramente ácidos (5,7-6,2) para la producción de sus metabolitos secundarios y para su óptimo desarrollo, y que además, es capaz de alterar el pH del medio externo al secretar sustancias orgánicas, para mantener esta condición ácida. Ello podría explicar lo observado en el presente estudio, donde la concentración más alta mantiene el pH de la solución en 6,4 y no se incrementa al adicionarle la concentración crítica de TS-2035, pero en la concentración menor de *M. anisopliae* el pH de la suspensión es superior ($7,0 \pm 0,1$) pudiendo afectar su desarrollo.

En los ensayos no fue detectada esporulación en todos los insectos muertos tratados con *B. bassiana* y *M. anisopliae*, lo que no implica necesariamente que la mortalidad observada haya sido por causas distintas a la infección por estos HEP. La esporulación no siempre ocurre en los cuerpos de los insectos muertos a causa del hongo, ya que ello depende del aislamiento del mismo, la concentración de conidias aplicada y, especialmente, si el insecto tratado es de tamaño pequeño y/o de cuerpo blando, en que tiende a observarse un rápido desecamiento, entre otras causas (Poprawski *et al.*, 1999; citados por Chirinos *et al.*, 2007), ésta última característica coincide con la descripción de las hembras adultas de *P. viburni* luego de la exposición, efecto que puede potenciarse por la adición de TS-2035, según lo observado por Santibáñez (2010).

Todo lo anterior explicaría lo observado con las aspersiones de HEP en mezcla con la concentración crítica de TS-2035, que en el caso de *B. bassiana*, no perjudicó significativamente su germinación, y donde su efecto de mortalidad sobre *P. viburni* solamente aumentó luego de 72 h, y su esporulación observada fue menor, respecto del tratamiento sin detergente. Y en cuanto a *M. anisopliae*, la adición de la concentración crítica del detergente también favoreció significativamente su actividad patogénica, pero en todos los tiempos evaluados.

Efecto de clorpirifós en la mortalidad de *Pseudococcus* spp.

En cuanto al efecto de clorpirifós, Saeed *et al.* (2007), utilizando el producto comercial Lorsban 40EC, evaluó la mortalidad ninfas de tercer estadio de *Phenacoccus gossypiphilous* (Hemiptera: Pseudococcidae) al exponerlas sobre hojas de algodón sumergidas en este insecticida, alcanzó una mortalidad promedio de 82,5 y 100%, con CL_{50} de 40,2 y 31,7 ppm a 24 y 48 h, respectivamente, menores a lo registrado en el presente trabajo con exposición tópica del insecticida (169,98 y 85,19 ppm, a 24 y 72 h, respectivamente), pero superior a lo alcanzado con la adición de la concentración crítica de TS-2035 (18,20 y 15,15 ppm) en hembras adultas de *P. viburni*.

Utilizando una torre de aspersión, Marcano *et al.* (2006), reportan una mortalidad del 100% en ninfas de tercer estadio de *Maconellicoccus hirsutus* (Green) (Hemiptera: Pseudococcidae) a las 24 h de exponerlos a clorpirifós (Clanker 360), superior a lo observado en hembras adultas de *P. viburni*. Con éste mismo método, Cataldo (2004) alcanzó mortalidad de 98,6% sobre individuos de esta familia tan sólo a la primera hora después de aspersión, utilizando el mismo producto comercial del presente estudio a 0,8 mL p.c./L.

En trabajos de campo, se han encontrado resultados de mortalidad similares a los conseguidos en el presente trabajo. Cataldo (2004) señala que aplicaciones sobre Pseudocócidos, en naranjos, alcanzaron una mortalidad promedio cercana al 70% evaluada a cosecha, tratados con el mismo producto comercial a una concentración de 1 mL L⁻¹, similar a la concentración máxima del presente estudio, y fue estadísticamente igual a lo alcanzado con Confidor Forte® (i. a. imidacloprid) en distintas concentraciones.

Vergara (2007), indica que clorpirifós alcanzó mortalidades del 86% promedio, en parronales, a una concentración de 0,8 g L⁻¹, cerca de 40% superior a la concentración del presente estudio, pero disminuyó significativamente las poblaciones de enemigos naturales.

Saeed *et al.* (2007), con una dosis de 2500 mL ha⁻¹, alcanzó mortalidades de 68,0 y 85,2 de *P. gossypiphilous* en cultivos de *Hibiscus* a las 24 y 72 h, respectivamente, similar a lo registrado en el presente trabajo con exposición tópica del insecticida (71,3 y 77,5%, en los mismos tiempos), pero menor a lo alcanzado con la adición de la concentración crítica de TS-2035 (93% aproximadamente, en ambos tiempos) en hembras adultas de *P. viburni*.

Por otra parte, desde hace ya más de dos décadas que los investigadores y productores nacionales han notado la creciente resistencia que está presentando este insecto al clorpirifós (Charles *et al.*, 1993; Walker *et al.*, 1993; González, 2003a), insecticida que ha sido la base para el control de chanchitos blancos en este cultivo y que hoy está siendo reemplazado por productos a base de imidacloprid. En países como Nueva Zelanda, en atención al incremento de resistencia de *P. viburni* y *P. longispinus*, el insecticida clorpirifós ha sido reemplazado por alternativas como buprofezin, un insecticida inhibidor de la síntesis de quitina, que actúa durante el proceso de muda (González, 2003b; Ulloa, 2010). Autores como Saddiq *et al.* (2014) señalan que, a pesar de alcanzar importantes mortalidades utilizando clorpirifós (Lorsban 400 EC) (CL_{50} a 7,0 ppm, alrededor de 50% menor a la CL_{50} obtenida inclusive con la mezcla con detergente en el presente estudio)

sobre *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae) en cultivos de algodón, existe resistencia baja a moderada para este producto. Esta situación puede explicar lo observado en este estudio con *P. viburni*, en las aspersiones sin detergente, considerando que la población usada proviene originalmente de campos comerciales.

Efecto de coadyuvantes en la mortalidad causada por insecticidas

Sieburth *et. al* (1998), en condiciones de laboratorio, estudiaron el efecto de 3 coadyuvantes (Silwet[®] 560, Tegoprene[®] 3130 y Tegoprene 6814) al 0,5%, en combinación con aceite mineral (1%), para el control de la mosquita blanca (*Bemisia argentifolii* Bellows & Perring) (Hemiptera: Aleyrodidae) sobre plantas de repollo, obteniendo resultados significativos sólo contra estadios ninfales.

Utilizando una pulverizadora manual y una torre de Potter ST-4, González *et al.* (1996), evaluaron la mortalidad de *P. affinis* (Hemiptera: Pseudococcidae) en laboratorio, asperjados con Makthion[®] (100 y 150 mL p.c. hL⁻¹) solo, en mezcla con el adherente Nu Film[®] (80 mL p.c. hL⁻¹), y a una concentración de 150 mL p.c. hL⁻¹ en mezcla con detergente Quix[®] (250 mL p.c. hL⁻¹). Alcanzando mortalidades del 100% por efecto de contacto, a 48 h post exposición, pero sin diferencias significativas entre los tratamientos solos y en presencia de estos coadyuvantes.

En otro estudio de laboratorio, Chirinos *et al.* (2007), mediante aspersión con atomizadores manuales, alcanzaron mortalidades de entre 65 y 75% a las 24 h, en ninfas de *Capulinia* sp. (Hemiptera: Pseudococcidae) en plantas de guayabo, asperjándolas directamente con clorpirifós (Lorsban 4E), al 0,06% p/v de ingrediente activo, en mezcla con el surfactante-adherente Nonilfenoxi-Polietilenglicol (Extravon 200[®]), al 0,006% p/v, aunque la mortalidad en el tratamiento testigo (sin aspersión) varió desde 6 a 25% aprox.

En ensayos de campo, se han utilizado coadyuvantes para insecticidas tradicionales sin obtener resultados concluyentes en la mayoría de los casos. De la Cerda (2007) analizó el coadyuvante Break[®] en concentraciones de 0,05, 0,075 y 0,1% v/v en mezcla con clorpirifós (Cyren[®] 48 EC, 120 mL hL⁻¹) sobre *P. viburni* en dos viñedos de la Región Metropolitana, sin encontrar diferencias significativas con respecto al insecticida solo.

En especies menos emparentadas tampoco se han logrado resultados promisorios. French *et. al.* (1992) probaron el efecto de tres surfactantes en la eficacia de clorpirifós sobre *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) en algodón, sin conseguir resultados significativamente distintos del tratamiento sólo con el insecticida.

Vargas *et al.* (2002), en ensayos de campo, evaluaron el efecto acaricida de thuringiensin solo y en conjunto con el adyuvante Silwet L-77 a 0,1%, sobre *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), pero tampoco obtuvieron resultados significativamente distintos.

Por otra parte, se destaca la importancia que tiene la adición de la concentración de TS-2035 utilizada en este trabajo al no incrementar el pH de las soluciones con clorpirifós a niveles alcalinos, incluso en la concentración más alta (dosis recomendada) del insecticida,

cuyo valor fue de $6,9 \pm 0,1$, debido a que elevados pH influyen su hidrólisis en agua. Como se reporta en literatura, vidas medias de hidrólisis de clorpirifós disminuyen de 77 a 16 días con pH 7 y 9, respectivamente (PMRA, 2000; CCME, 2008), y de 68 a 23 días con pH 5 y 8, respectivamente, a una temperatura de 25 °C (PPDB, 2012).

Todo lo anterior realza la importancia de los resultados conseguidos con clorpirifós (una disminución significativa de la concentración letal media tan sólo con la adición equivalente a 1 mL hL⁻¹ de TS-2035), y reafirma la idea de buscar alternativas para programas de MIP, como las utilizadas en el presente estudio, para un control total de *P. viburni* en nuestro país.

Conclusiones

Bajo las condiciones del presente estudio y de la metodología utilizada, se concluye que:

- La máxima concentración de detergente TS-2035 que no causó mortalidad significativamente superior al tratamiento testigo (concentración crítica) fue de 0,001% v/v. Sin embargo, luego de ser asperjada sobre hembras adultas de *P. viburni*, no presentó un efecto significativo de remoción de cera, evaluado mediante espectrofotometría UV visible.
- La adición de la concentración crítica de detergente TS-2035 (0,001% v/v) incrementó la mortalidad de hembras adultas de *P. viburni* alcanzada con Mycotrol a las 72 h post tratamientos tópicos, no así a las 24 h, cuyo efecto no varió con respecto al tratamiento sin detergente. Sin embargo, aunque esta concentración crítica no afectó significativamente la germinación de *B. bassiana*, provocaría un efecto fungistático en su esporulación sobre *P. viburni* en la concentración más alta ($1,7 \times 10^6$ UFC mL⁻¹).
- Por su parte, la mortalidad de hembras adultas de *P. viburni* alcanzada con clorpirifós (p.c. Lorsban 4E), se estabilizó a las 24 h post aplicación tópica y se incrementó en presencia de la señalada concentración de detergente.
- En el caso del hongo entomopatógeno *M. anisopliae*, la mortalidad de hembras adultas de *P. viburni* y la esporulación sobre éstas en cámara húmeda también se incrementaron con la adición de esta concentración crítica de TS-2035, en todos los tiempos evaluados, aunque los valores de CL₅₀ sin detergente no fueron obtenidos en condiciones suficientes para obtener conclusiones más definitivas.
- Finalmente, según estos resultados, resulta promisorio evaluar el efecto de estos tratamientos bajo condiciones de campo sobre la mortalidad de *P. viburni* y otras especies de plagas.

Literatura Citada

- Amnuaykanjanasin, A.; J. Jirakkakul; C. Panyasiri; P. Panyarakkit; P. Nounurai; D. Chantasingh; L. Eurwilaichitr; S. Cheevadhanarak and M. Tanticharoen. 2013. Infection and colonization of tissues of the aphid *Myzus persicae* and cassava mealybug *Phenacoccus manihoti* by the fungus *Beauveria bassiana*. *Biocontrol* 58(3): 379-391.
- Barbarin, A.; N. Jenkins; E. Rajotte and M. Thomas. 2012. A preliminary evaluation of the potential of *Beauveria bassiana* for bed bug control. *Journal of Invertebrate Pathology* 111: 82–85.
- Buckner, J.; M. Hagen and D. Nelson. 1999. The composition of the cuticular lipids from nymphs and exuviae of the silverleaf whitefly *Bemisia argentifolii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 124: 201-207.
- Burett, G. 2005. Evaluación de dos detergentes agrícolas sobre ninfas de segundo estado y hembras de *Pseudococcus longispinus* (Targioni & Tozzetti) en laboratorio. Memoria de Título Ing. Agr. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Santiago. 33p.
- Bustillo, A. y U. Castro. 2012. El salivazo de la caña de azúcar, *Aeneolamia varia* (F.) (Hemiptera: Cercopidae). Cenicaña, Colombia. Disponible en: <http://www.cenicaña.org>. Consultado el 30 de julio del 2015.
- Cataldo, L. 2004. Efecto de imidacloprid aplicado al follaje y al tronco para el control de *Pseudococcidae* en naranjos. Memoria de Título Ing. Agr. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Santiago. 52p.
- CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment). 2008. Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: Chlorpyrifos. In: Canadian environmental quality guidelines, 1999, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg. Available at <http://ceqg-rcqe.ccme.ca/download/en/164>. Consultado el 20 de Julio del 2015.
- Charles, J.; J. Walker and V. White. 1993. Resistance to chlorpyrifos in the mealybugs *Pseudococcus affinis* and *P. longispinus* in Hawkes Bay and Waika to pipfruit orchards. Proceedings of the 46th New Zealand Plant Protection Conference (10-12 august, 1993). pp 120-125.
- Charnley, A. 1997. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: Wicklow DT, Soderstorm BE. (eds) *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships*, Springer, Heidelberg. pp 185-201.
- Chirinos, D.; F. Geraud-Pouey; L. Bastidas; M. García e Y. Sánchez. 2007. Efecto de algunos insecticidas sobre la mota blanca del guayabo, *Capulinia* sp. (Hemiptera: Eriococcidae). *Interciencia* 32 (8): 547-553.
- Cloyd, R. 2006. No lave su cultivo usando jabones. *Grower Talks* 67(12): 56-58.

Cloyd, R. 2007. Soaps and detergents: should they be used on roses? 4p. Available at: <http://www.rose.org/soaps-and-detergents-should-they-be-used-on-roses/>. Consultado el 30 de agosto del 2014.

Corral, G.; A. Romero; C. Radrigán y T. Zaviezo. 2006. Las virtudes de los hongos entomopatógenos. *Revista de Agronomía y Forestal* 30: Chile. pp 12-15. Disponible en línea: http://www.puc.cl/agronomia/c_extension/Revista/Ediciones/30/hongos.pdf.

Cox, J. and M. Pearse. 1983. Wax produced by dermal pores in three species of mealybugs (Homoptera: Pseudococcidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 12(4): 235-248.

Cranshaw, W. 2006. Insect control: soap and detergents. Available at: www.ext.colostate.edu/PUBS/insect/05547.html. Consultado el 30 de agosto del 2014.

Curkovic, T. 2003. Control de plagas de frutales con detergentes. *Aconex* 81: 18-23.

Curkovic, T.; G. Burett and J. Araya. 2007. Evaluation of the insecticide activity of two agricultural detergents against the long-tailed mealybug, *Pseudococcus longispinus* (Hemiptera: Pseudococcidae), in the laboratory. *Agricultura Técnica* 67(4): 422-430.

De la Cerda, J. 2007. Efecto del uso de break (coadyuvante siliconado) en el control del chanchito blanco de la vid (*Pseudococcus viburni* Signoret) en vid vinífera. Memoria de Título Ing. Agr. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Santiago. 30p.

French, N.; M. Ramaswamy; B. Smith and D. Paroonagian. 1992. Effect of three adjuvants on coverage, persistence, and efficacy of ground-applied chlorpyrifos for suppression of cotton aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 85(4): 1347-1355.

Gadhve, A. 2014. Determination of Hydrophilic-Lipophilic Balance Value. Institute of Chemical Technology, Nathalal Parekh Road, Matunga East, Mumbai-400081, Maharashtra, India. *International Journal of Science and Research* 3(4): 573-575.

González, R.; T. Curkovic y G. Barría. 1996. Evaluación de eficacia de insecticidas sobre chanchitos blancos en ciruelos y uva de mesa (Homoptera: Pseudococcidae). *Revista Frutícola* 17(2): 45-57.

González, R. 2003a. Manejo cuarentenario de chanchito blanco de pomáceas en Chile (Hemiptera: Pseudococcidae). *Revista Frutícola* 24(3): 89-98.

González, R. 2003b. Chanchitos blancos de importancia agrícola y cuarentenaria, en huertos frutales de Chile (Hemiptera: Pseudococcidae). *Revista Frutícola* 24(1): 5 - 17.

González, R. 2011. Pseudocóccidos de importancia frutícola en Chile. Publicaciones en Ciencias Agrícolas N° 18. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile.

Griffin, W. 1954. Calculation of HLB values of non-ionic surfactants, *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 5: 249–256.

Hadley, N. 1981. Cuticular lipids of terrestrial plants and arthropods: a comparison of their structure, composition, and waterproofing function. *Biological reviews* 56(1): 23-47.

Holder, D. 2005. Adhesion properties and cell surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: a link between morphology and virulence. A dissertation presented to the Graduate School of the University of Florida in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy. University of Florida. 117 p. Available at: http://ufdcimages.uflib.ufl.edu/UF/E0/01/12/21/00001/holder_d.pdf

Jeffs, L. and G. Khachatourians. 1997. Toxic properties of *Beauveria* pigments on erythrocyte membranes. *Toxicon* 35: 1351–1356.

Jin, X.; D. Street; C. Dunlap and M. Lyn. 2008. Application of hydrophilic–lipophilic balance (HLB) number to optimize a compatible non-ionic surfactant for dried aerial conidia of *Beauveria bassiana*. *Biological Control* 46: 226–23.

Lezama, R. 1993. Patogenicidad de hongos (hyphomycetes) y del nemátodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias (especialidad en Biotecnología). Universidad de Colima Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. México. 153 p.

Luz, C. and I. Batagin. 2005. Potential of oil-based formulations of *Beauveria bassiana* to control *Triatoma infestans*. *Mycopathologia* 160(1): 51-62.

Marcano, R.; T. Malpica y L. Sequera. 2006. Evaluación de insecticidas para el control de la cochinilla rosada *Maconellicoccus hirsutus* (Green) (Hemiptera:Pseudococcidae) en el laboratorio. *Entomotropica* 21(2): 125-128.

Marer, P.; M. Flint and M. Stimmann. 1988. The safe and effective use of pesticides. Univ. California, Statewide IPM Project, Division of Agriculture & Natural Resources, Oakland, California, Publication 3324. 90: 114-115.

Martínez, L. 2010. Desarrollo de un prototipo de formulación con hongos entomopatógenos para el manejo de *Demotispa neivai* Bondar (Coleoptera: Chrysomelidae). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Escuela de Posgrado. Maestría en Ciencias Agrarias, Énfasis Entomología. Bogotá. 121p.

Matabonchoy, J.; A. Bustillo; U. Castro; N. Mesa y C. Moreno. 2012. Eficacia de *Metarhizium anisopliae* para controlar *Aeneolamia varia* (Hemiptera: Cercopidae), en caña de azúcar. *Revista Colombiana de Entomología* 38 (2): 177-181.

Mishra, S.; P. Kumar and A. Malik. 2013. Evaluation of *Beauveria Bassiana* Spore Compatibility with Surfactants. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* 7(1): 7-11.

Mohammadbeigi, A and G. Port. 2013. Efficacy of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Uvarovistia zebra* (Orthoptera: Tettigoniidae) via contact and ingestion. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 5(2): 138-146.

Nelson, D. and L. Charlet. 2003. Cuticular hydrocarbons of the sunflower beetle, *Zygogramma exclamationis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 135: 273 – 284.

Pedrini, N.; R. Crespo y M. Juárez. 2007. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology* 146(1-2): 124-137.

Pereira A. 2009. Efecto de *Metarhizium anisopliae* var. *Anisopliae* (Metsch.) Sorokin en la fertilidad, fecundidad y longevidad de *Pseudococcus viburni* Signoret (Hemiptera: Pseudococcidae). Memoria presentada a la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción para optar al título de Ingeniero Agrónomo. 24p

Pereira A.; P. Casals; A. Salazar y M. Gerding. 2011. Virulence and pre-lethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* on *Pseudococcus viburni* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Chilean Journal of Agricultural Research* 71(4): 554-559.

PMRA (Pest Management Regulatory Agency). 2000. Environmental Assessment of Chlorpyrifos (unpublished). Environmental Assessment Division, Pest Management Regulatory Agency, Ottawa, Ontario (REV2007-01).

Posada, R. y L. Forigua. 2011. Eficacia de dos hongos entomopatógenos para el control de *Pseudococcus* spp. Ed. Bogotá: Jardín Botánico José Celestino Mutis. pp 141-151.

PPDB. 2012. Pesticide Properties DataBase, University of Hertfordshire. Available at <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/154.htm>. Consultado el 20 de Julio del 2015.

Quesada-Moraga, E. and A. Vey. 2004. Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycology Research* 108: 441–452.

Raja, S.; S. Sivasubramanian and G. Kumar. 2010. Influence of media on protease production by *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. and stability towards commercially available detergents, surfactants and enzyme inhibitors. *International Journal of Biological Technology* 1(1): 78-83.

Ripa, R. y F. Rodríguez. 1999. Plagas de cítricos, sus enemigos naturales y manejo. Colección Libros INIA N°3, Santiago, Chile, 151p.

Roberts, D. 1981. Toxins of entomopathogenic fungi. In: Burges, H.D. (Ed.), *Microbial Control of Pests and Plant Disease 1970–1980*. Academic Press, London, pp. 441–463.

Rustom, A.; B. Latorre y M. Lolas. 1989: Método para una correcta comparación de la efectividad de nuevos fungicidas, p. 149-164. In: Latorre, B. A. (ed.), *Fungicidas y Nematicidas. Avances y Aplicabilidad*, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile, 216 p.

Saddiq, B; S. Ali Shad; H. Ali Khan; M. Aslam; M. Ejaz and M. Shahzad. 2014. Resistance in the mealybug *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Homoptera: Pseudococcidae) in Pakistan to selected organophosphate and pyrethroid insecticides. *Crop Protection* 66: 29-33.

Saeed, S.; M. Ahmad; M. Ahmad and Y. Kwon. 2007. Insecticidal control of the mealybug *Phenacoccus gossypiphilous* (Green) (Hemiptera: Pseudococcidae), a new pest of cotton in Pakistan. *Entomological Research* 37: 76–80.

Saiz, F. 2006. Trabajos de Tesis para el Proyecto “Desarrollo de un Manejo Integrado de Plagas en cítricos de Perú y Chile para el cumplimiento de la normativa internacional de Buenas Prácticas Agrícolas”. Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Valparaíso, Chile. Disponible en: http://www.fontagro.org/sites/default/files/tecnico/pp_IST_03_32.pdf

Salazar, A.; M. Gerding; P. Luppichini; R. Ripa; P. Larraín; T. Zaviezo y P. Larral. 2010. Biología, manejo y control de chanchitos blancos. Boletín INIA N° 204. Instituto de Investigaciones Agropecuarias Quilamapu. Chillán, Chile. 62 p.

Santibáñez, D. 2010. Evaluación de la deshidratación y la remoción de ceras epicuticulares como factores asociados a la mortalidad de hembras de *Pseudococcus viburni* Signoret (Hemiptera: Pseudococcidae) tratadas con detergentes de uso agrícola. Tesis de Título Ing. Agr. y Ms. Sc. Mención Sanidad Vegetal. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Santiago, Chile. 56p.

Santos, P.; A. Monteiro and C. Gava, 2011. Enhancing dispersion of *Beauveria bassiana* LCB63 conidia using surfactants for biological control of the cactus pest *Dactylopius opuntiae* in the semiarid region of Brazil. *Biocontrol Science & Technology* 22(3): 281-2920.

Sieburth, P.; J. Schroeder and R. Mayer. 1998. Effects of oil and oilsurfactant combinations on silverleaf whitefly nymphs (Homoptera: Aleyrodidae) on collards. *Florida Entomologist* 81 (3): 446-450.

Soto, F. 2013. Control de la conchuela café europea *Parthenolecanium corni* (Bouché) en vid vinífera con insecticidas alternativos. Memoria de Ing. Agrónomo. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 39p.

- Strasser, H.; A. Vey and T. Butt. 2000. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Science and Technology* 10: 717–735.
- Suzuki, A.; M. Kanaoka; A. Isogai; S. Murakoshi; M. Ichinoe and S. Tamura. 1978. Bassianolide, a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Agricultural and Biological Chemistry* 42 (3): 629-635.
- Tamerler, C.; M. Ullah; M. Adlard and T. Keshavarz. 1998. Effect of pH on physiology of *Metarhizium anisopliae* for production of swainsonine. Fungal Biotechnology Group, Department of Biotechnology, University of Westminster, 115 New Cavendish Street, London. *FEMS Microbiology Letters* 168(1):17-23.
- Toro, H.; E. Chiappa y C. Tobar. 2003. Biología de insectos. Ediciones Universitarias de Valparaíso, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile. 42p.
- Ulloa, F. 2010. Efectividad de insecticidas para el control de *Pseudococcus viburni* (Hemiptera: Pseudococcidae) en arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) “Brigitta”. Tesis para obtener el grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Chile. 25p.
- Vargas, R.; B. Chapman y D. Penman. 2002. Factores que influyen en la respuesta de *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae) a thuringiensin. *Agricultura Técnica* 62 (1): 3-14.
- Vega, F.; F. Posada; M. Aime; M. Pava-Ripoll and F. Infante. 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. Publications from USDA-ARS / UNL Faculty. Paper 385. University of Nebraska – Lincoln. USA. 13p.
- Vergara, A. 2007. Efecto del control biológico aumentativo sobre la población de *Pseudococcus viburni* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae) en parronales de uva de mesa. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía, Quillota, Chile. 40 p.
- Vining, L.; W. Kelleher and A. Schwarting. 1962. Oosporein production by a strain of *Beauveria bassiana* originally identified as *Amanita muscaria*. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 931–933.
- Walker, J.; V. White and J. Charles. 1993. Field control of chlorpyrifos-resistant mealybugs (*Pseudococcus affinis*) in Hawkes Bay Orchard. Proceedings of the 46th New Zealand Plant Protection Conference (10-12 august, 1993). pp 126-128.

ANEXO 1**Viabilidad de *B. bassiana* S. (prueba de pureza)**

Realizado por el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Sanidad Vegetal de la Universidad de Chile.

Procedimiento

Se evaluó la viabilidad de las unidades formadoras de colonia (UFC) de *Beauveria bassiana* cepa GHA de dos muestras del producto Mycotrol® ES formuladas en 2010 y 2012. La determinación de la viabilidad de UFC se realizó sembrando homogéneamente 100 µL de cada muestra a una dilución de 10^6 esporas/mL en agua destilada y Tween 80 al 0,05% sobre placas Petri con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (APD) a pH 6,0. Los cultivos fueron incubados en oscuridad por 4 días a 25°C dentro de una cámara de cultivo, contando con 4 repeticiones. Se contabilizó UFC por superficie de placa. Según los resultados, la muestra de Mycotrol® ES formulada en el año 2012 tiene **$1,7 \times 10^6$ UFC/mL**.

ANEXO 2**Fichas técnicas de materiales químicos y biológicos utilizados****2.1. Mycotrol**

Ficha Técnica proporcionada por el proveedor, Bioamerica

Mycotrol ES^{MR}

- La alta concentración de esporas resulta en una rápida y completa colonización de insectos
- Las esporas están microencapsuladas lo que las aísla térmicamente del entorno, prolongando su viabilidad
- Bioinsecticida que entra por la cutícula del insecto
- No es necesario que entre vía oral
- No es tóxico para el usuario, el medio ambiente o el consumidor de los productos agrícolas

El producto no debe ser mezclado con fungicidas, productos químicos o coadyuvantes que alteren el rango de pH entre 5.5-7.0. En cualquier mezcla debe probarse previamente su compatibilidad.

Agite perfectamente la suspensión antes de abrir el envase. Premezcle con una pequeña cantidad de agua y vacíe al tanque del equipo aspersor. Se recomienda mezclar con aguas de pH entre 5.5-7.0 para lograr una mayor eficacia en la aplicación, sugiriéndose el uso de un corrector en caso necesario. Use la mezcla el mismo día en que se realizó.

Mycotrol^{MR}ES puede aplicarse por aspersión o en riego por goteo cuando se trate de plagas del suelo. Las aplicaciones deben realizarse preferiblemente entre 6:00 y 10:00a.m. y después de las 4:00p.m. O a cualquier hora en días nublados. El producto puede ser usado hasta el momento de la cosecha.

- Mantenga el producto en un lugar fresco y seco
- No lo exponga a la luz directa del sol
- El producto tiene una vida máxima de estante de 10 meses

Beauveria bassiana (cepa GHA): 2.1×10^{13} (21,000,000,000,000) esporas por ml.

Ingredientes inertes: agentes de antiendurecimiento y antisedimentación, residuos de cultivo, portador y emulsificantes: 88.7%

2.2. *Metarhizium anisopliae*

Cepa Qu-M984 proporcionada por INIA Quilamapu, Chillán, Chile.

Año: 2014

Preparación: cultivo en medio líquido sacarosa + levadura, sembrado en arroz. Secado y cosecha de esporas. Período 5 semanas aprox.

Presentación: bolsa de 5g de esporas secas y tamizadas.

Efectos en hospederos: las esporas, al entrar en contacto con la cutícula de su hospedero, liberan enzimas, principalmente lipasas, proteasas y quitinasas, para luego ingresar, multiplicarse y producir toxinas que actúan como metabolitos neurotóxicos, provocando cambios en el comportamiento, sistema muscular, descoordinación, y finalmente la muerte del insecto*.

Riesgos: parásito facultativo, riesgo para la salud humana, utilizar protección respiratoria (mascarillas).

Dosis recomendada 10^{12} UFC mL⁻¹ ha⁻¹; 200-500 L ha⁻¹

Incompatibilidad: no aplicar con fertilizantes ni *Trichoderma* spp.

* Sepúlveda, M. 2014, jul. Capacitación en uso de *M. anisopliae*. [Entrevista personal]. INIA Quilamapu, Chillán. Chile.

2.3. Lorsban 4E

Nombre del Producto: Lorsban® 4E

Proveedor: Dow AgroSciences Chile S.A

Nombre químico ingrediente activo: O,O-dietil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil) fosforotioato

Composición: Clorpirifos:480 g

N° CAS: 002921-88-2.

Solventes y emulsionantes c.s.p. 1 litro

APARIENCIA Y COLOR: Líquido ámbar.

ESTADO FISICO: Líquido concentrado emulsionable.

OLOR: A mercaptan, típico del solvente.

DENSIDAD RELATIVA: 1,076 g/mL (a 20 °C).

ACIDEZ / ALCALINIDAD: pH=5,19 (a 25°C).

PRESION DE VAPOR:< 10 mm de mercurio a 25°C

SOLUBILIDAD EN AGUA: Emulsiona en agua.

PUNTO DE EBULLICIÓN: 143 °C.

CORROSIVIDAD: No corrosivo para los materiales de envases aprobados.

VISCOSIDAD: 3,0 centistokes.

ESTABILIDAD QUIMICA: Descompone exotérmicamente a altas temperaturas (más de 130°C). No calentar por encima de 50 °C. Evitar el contacto con materiales alcalinos.

ESTABILIDAD EN ALMACENAMIENTO: Evitar altas temperaturas. Almacenar por debajo de los 38°C. Descompone exotérmicamente a altas temperaturas, lo que puede elevar aún más la temperatura y producir descomposiciones violentas si la fuente de calor no es eliminada. Contiene solventes derivados del petróleo que arderán.

INCOMPATIBILIDAD CON OTROS PRODUCTOS: Evitar el contacto con materiales alcalinos. Consultar con el fabricante para casos específicos.

PRODUCTOS PELIGROSOS POR DESCOMPOSICION: Bajo condiciones de fuego, se producirán cloruro de hidrógeno, etil y dietil sulfuros y óxidos de nitrógeno.

PELIGRO DE POLIMERIZACION: No ocurrirá

ECOTOXICOLOGÍA:

- Organismos acuáticos y peces: Moderadamente tóxico. CL50 (pez cebra) 96 horas = 2.96 mg/l.
- Aves: Moderadamente tóxico. DL50 oral aguda (codorniz) = 170 mg/kg.
- Abejas: Altamente tóxico. DL50 por contacto = 0.31 µg/abeja.

Persistencia en el suelo: baja, la degradación se produce en el término de días a semanas. En condiciones aeróbicas, vida media = 30-60 días.

Fotólisis en agua: Vida media = 3-4 semanas.

2.4. TS-2035

Ficha técnica proporcionada por Pace International LLC. Ltda., Santiago, Chile.

Descripción:

TS-2035 posee pH neutro, excelente poder limpiador y humectante por su alto contenido de activos detergentes, es compatible con otros agroquímicos, no es fitotóxico, y es altamente resistente a las aguas duras.

TS-2035 ha sido especialmente formulado para el lavado de árboles y frutos, cumpliendo con los requerimientos de la FDA (Food and Drug Administration) en Estados Unidos, para los productos detergentes de frutos y vegetales.

NO APLICAR EN PALTOS

Dilución: 200 a 300 cc de TS-2035 en 100 litros de agua.

Mojamiento: 2000 a 4000 litros por hectárea.

Almacenamiento: almacenar el producto en su envase sellado en un lugar seco y fresco. Evitar temperaturas sobre 40° C y el congelamiento del producto.

ANEXO 3

Curva de calibración de ceras de hembras adultas de *P. viburni*, determinada mediante espectrofotometría UV/VIS

En la Figura 1, se observa la curva de calibración de las absorbancias (λ) de la dilución seriada de cera extraída de hembras de *P. viburni*, utilizada en el presente estudio.

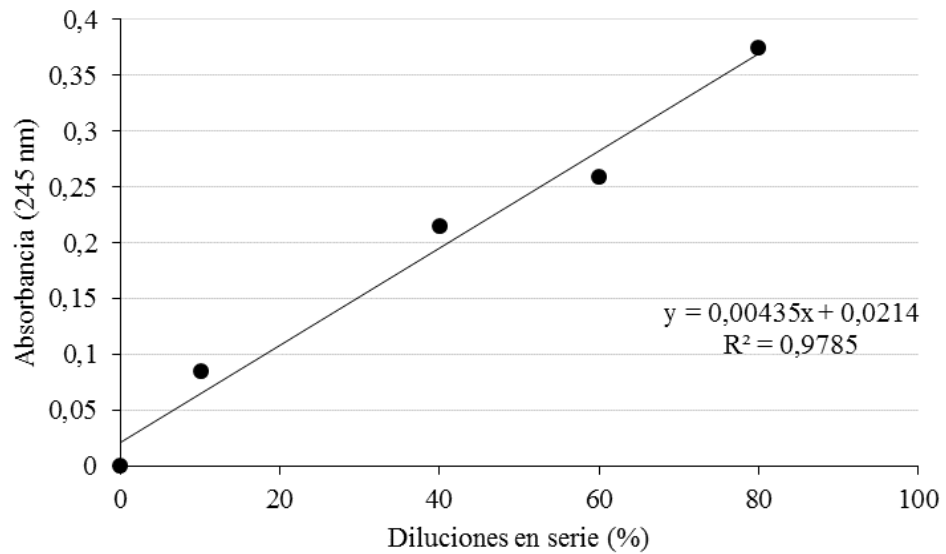


Figura 1. Curva de calibración de absorbancia de ceras de hembras adultas de *P. viburni*. 100% equivale a 0,6 mg de cera por cada 20 insectos. Adaptada de Santibáñez (2010).

APÉNDICE 1

Resultados de análisis estadísticos

1.1. Mortalidad por efecto de TS-2035

Cuadro 1. Mortalidad de hembras adultas de *P. viburni* provocada por la exposición a TS-2035, registrada a 24 y 72 h, y contrastadas con un Modelo Lineal General (MLG) ($p < 0,05$):

TS-2035 (% v/v)	Mortalidad 24 h (%) \pm D.E.	Mortalidad 72 h (%) \pm D.E.
TESTIGO	0,00 \pm 0,00	8,75 \pm 2,50
0,0001	1,25 \pm 2,50	7,50 \pm 2,89
0,001	2,50 \pm 5,00	10,00 \pm 4,08
0,01	17,50 \pm 6,45	31,25 \pm 4,79
0,1	18,75 \pm 4,79	40,00 \pm 7,07
1	35,00 \pm 5,77	53,75 \pm 6,29
<i>p-value</i>	0,0156	0,0000
R ²	0,760	0,950

1.2. Mortalidad por efecto de Mycotrol

Cuadro 2. Mortalidad de hembras adultas de *P. viburni* provocada por la exposición a Mycotrol, registrada a 24 y 72 h, contrastados con la prueba de Friedman ($p < 0,05$):

Mycotrol (% v/v)	Mortalidad 24 h (%) \pm D.E.	Mortalidad 72 h (%) \pm D.E.
TESTIGO	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
0,1	16,25 \pm 2,50	18,75 \pm 2,50
1	50,00 \pm 9,13	56,25 \pm 6,29
10	72,50 \pm 2,89	80,00 \pm 4,08
100	87,50 \pm 6,45	90,00 \pm 5,77
<i>p-value</i>	0,0030	0,0030
χ^2	16,0	16,0

Cuadro 3. Mortalidad de hembras adultas de *P. viburni* provocada por la exposición a Mycotrol en presencia de TS-2035 al 0,001% (v/v), registrada a 24 y 72 h, y contrastadas con un Modelo Lineal General (MLG) ($p < 0,05$) y la prueba de Friedman ($p < 0,05$), respectivamente:

Mycotrol (% v/v) + TS-2035 al 0,001% (v/v)	Mortalidad 24 h (%) \pm D.E.	Mortalidad 72 h (%) \pm D.E.
TESTIGO	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
0,1	20,00 \pm 4,08	25,00 \pm 4,08
1	52,50 \pm 6,45	66,25 \pm 4,79
10	62,50 \pm 2,89	81,25 \pm 2,50
100	73,75 \pm 4,79	85,00 \pm 4,08
<i>p-value</i>	<0,0001	0,0039
R ²	0,985	0,992

1.3. Mortalidad por efecto de Lorsban 4E (clorpirifós 48% p/v)

Cuadro 4. Mortalidad de hembras adultas de *P. viburni* provocada por la exposición a Lorsban 4E, registrada a 24 y 72 h, contrastados con la prueba de Friedman ($p < 0,05$):

Lorsban (% v/v)	Mortalidad 24 h (%) \pm D.E.	Mortalidad 72 h (%) \pm D.E.
TESTIGO	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
0,1	3,75 \pm 2,50	8,75 \pm 4,79
1	16,25 \pm 4,79	21,25 \pm 4,79
10	26,25 \pm 4,79	36,25 \pm 4,79
100	71,25 \pm 10,31	77,50 \pm 8,66
<i>p-value</i>	0,0032	0,0030
χ^2	15,9	16,0

Cuadro 5. Mortalidad de hembras adultas de *P. viburni* provocada por la exposición a Lorsban 4E en presencia de TS-2035 al 0,001% (v/v), registrada a 24 y 72 h, contrastados con un Modelo Lineal General (MLG) ($p < 0,05$):

Lorsban (dosis recomendada % v/v) + TS-2035 al 0,001% (v/v)	Mortalidad 24 h (%) \pm D.E.	Mortalidad 72 h (%) \pm D.E.
TESTIGO	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
0,1	13,75 \pm 2,50	13,88 \pm 2,24
1	35,00 \pm 4,08	35,33 \pm 6,45
10	57,50 \pm 6,45	63,29 \pm 6,24
100	92,50 \pm 5,00	93,68 \pm 2,46
<i>p-value</i>	<0,0001	<0,0001
R ²	0,989	0,988

1.4. Mortalidad por efecto de *M. anisopliae*

Cuadro 6. Mortalidad de hembras adultas de *P. viburni* provocada por la exposición a *M. anisopliae* (% p/v) en presencia de TS-2035 al 0,001% (v/v), registrada a 24 y 72 h, contrastados mediante Modelo Lineal General (MLG) ($p < 0,05$):

<i>M. anisopliae</i> (% p/v)	Mortalidad 24 h (%) ± D.E.	Mortalidad 72 h (%) ± D.E.	Mortalidad 144 h (%) ± D.E.
TESTIGO	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	6,67 ± 2,89	10,00 ± 5,00	10,07 ± 12,13
10	20,00 ± 5,00	25,00 ± 8,66	24,67 ± 9,86
100	41,67 ± 7,64	51,67 ± 10,41	53,65 ± 12,56
<i>p-value</i>	<0,0001	<0,0001	0,0014
R ²	0,968	0,981	0,921

Cuadro 7. Mortalidad de hembras adultas de *P. viburni* provocada por la exposición a *M. anisopliae* (% p/v) en presencia de TS-2035 al 0,001% (v/v), registrada a 24 y 72 h, contrastados mediante la prueba de Friedman (n = 3) ($p < 0,05$):

<i>M. anisopliae</i> (% p/v)	Mortalidad 24 h (%) ± D.E.	Mortalidad 72 h (%) ± D.E.	Mortalidad 144 h (%) ± D.E.
TESTIGO	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	11,67 ± 2,89	11,67 ± 2,89	14,58 ± 3,61
10	31,67 ± 2,89	31,67 ± 2,89	35,42 ± 3,61
100	75,00 ± 13,23	78,33 ± 14,43	81,25 ± 10,83
<i>p-value</i>	0,0293	0,0293	0,0293
χ^2	9	9	9

1.5. Pruebas de germinación y esporulación

Cuadro 8. Porcentaje de germinación sobre PDA de Mycotrol al 1% (v/v) equivalente a 10^6 UFC mL⁻¹ de *B. bassiana* en presencia de TS-2035 (% v/v), registrada a 36 h, y contrastados con la prueba de ANDEVA a una vía ($p < 0,05$):

TS-2035 (% v/v)	Germinación de <i>B. bassiana</i> (%) ± D.E.
CONTROL	52,00 ± 2,94
0,001	43,75 ± 7,80
0,010	36,75 ± 6,55
<i>p-value</i>	<0,0001
R ²	0,580
P	0,759

Cuadro 9. Porcentaje de germinación sobre PDA de *M. anisopliae* al 1% (p/v) en presencia de TS-2035 (% v/v), registrada a 36 h, y contrastados con la prueba de ANDEVA a una vía ($p < 0,05$):

TS-2035 (% v/v)	Germinación de <i>M. anisopliae</i> (%) \pm D.E.
CONTROL	37,25 \pm 7,93
0,001	34,50 \pm 9,15
0,010	29,50 \pm 5,32
<i>p-value</i>	0,3863
R ²	0,191
P	0,181

Cuadro 10. Porcentaje de individuos con esporulación de *B. bassiana* sobre hembras adultas de *P. viburni* luego de exposición a Mycotrol (% v/v), registrada a 10 días post tratamientos, contrastados con un Modelo Lineal General (MLG) ($p < 0,05$):

Mycotrol (% v/v) con TS-2035 al 0,001% (v/v)	UFC de <i>B. bassiana</i>	Individuos con esporulación (%) \pm D.E.	Individuos con remoción de cera (%) \pm D.E.
TESTIGO	0,0	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
0,1	3,4 x 10 ³	3,75 \pm 4,79	6,25 \pm 2,50
1	3,4 x 10 ⁴	11,25 \pm 4,79	17,50 \pm 2,89
10	3,4 x 10 ⁵	27,50 \pm 11,90	37,50 \pm 5,00
100	3,4 x 10 ⁶	47,50 \pm 13,23	55,00 \pm 4,08
<i>p-value</i>		<0,0001	<0,0001
R ²		0,925	0,989

Cuadro 11. Esporulación de *B. bassiana* y remoción de cera en hembras adultas de *P. viburni* a diferentes concentraciones de Mycotrol (% v/v) con 0,001% (v/v) de TS-2035, contrastadas con MLG ($p < 0,05$) y la prueba de Friedman ($p < 0,05$), respectivamente:

Mycotrol (% v/v) con TS-2035 al 0,001% (v/v)	UFC de <i>B. bassiana</i>	Individuos con esporulación (%) \pm D.E.	Individuos con remoción de cera (%) \pm D.E.
TESTIGO	0,0	0 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
0,1	3,4 x 10 ³	3,75 \pm 2,50	0,00 \pm 0,00
1	3,4 x 10 ⁴	8,75 \pm 2,50	28,75 \pm 8,54
10	3,4 x 10 ⁵	15,00 \pm 4,08	33,75 \pm 4,79
100	3,4 x 10 ⁶	15,00 \pm 4,08	33,75 \pm 4,79
<i>p-value</i>		<0,0001	0,0073
R ²		0,868	-
χ^2		-	14

Cuadro 12. Porcentaje de individuos con esporulación de *M. anisopliae* sobre hembras adultas de *P. viburni*, registrada a 13 días post tratamientos, contrastados con la prueba de Friedman ($p < 0,05$):

Tratamiento (% p/v)	UFC de <i>M. anisopliae</i>	Individuos con esporulación (%) \pm D.E.
TESTIGO	0,0	0,00 \pm 0,00
1	6,4 x 10 ⁵	0,83 \pm 3,64
10	6,4 x 10 ⁶	1,25 \pm 0,39
100	6,4 x 10 ⁷	2,50 \pm 0,78
<i>p-value</i>		0,0396
χ^2		8,3

Cuadro 13. Porcentaje de individuos con esporulación de *M. anisopliae* sobre hembras adultas de *P. viburni*, registrada a 13 días post tratamientos, contrastados con un Modelo Lineal General (MLG) ($p < 0,05$):

<i>M. anisopliae</i> (% p/v) con TS-2035 al 0,001% (v/v)	UFC de <i>M. anisopliae</i>	Individuos con esporulación (%) \pm D.E.	Individuos con remoción de cera (%) \pm D.E.
TESTIGO	0,0	0 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
1	6,4 x 10 ⁵	1,67 \pm 0,00	3,89 \pm 3,60
10	6,4 x 10 ⁶	6,11 \pm 3,60	10,56 \pm 3,60
100	6,4 x 10 ⁷	11,67 \pm 6,30	18,33 \pm 6,30
<i>p-value</i>		0,0001	<0,0001
R ²		0,973	0,985

1.6. Cálculos de CL₅₀ de Mycotrol

Cuadro 14. Concentración letal media (CL₅₀) de Mycotrol (% v/v) a 24 y 72 h, obtenidas mediante análisis Probit (n = 16):

Tiempo	CL ₅₀	Intervalos de Confianza	χ^2	<i>p-value</i>
24	2,37	1,08 - 4,91	7,657	0,906
72	0,55	0,25 - 1,04	12,035	0,604

Cuadro 15. Concentración letal media (CL₅₀) de Mycotrol (% v/v) con TS-2035 al 0,001% (v/v) a 24 y 72 h, obtenidas mediante análisis Probit (n = 16):

Tiempo	CL ₅₀	Intervalos de Confianza	χ^2	<i>p-value</i>
24	2,37	0,91 - 2,61	7,384	0,919
72	0,97	0,56 - 1,59	8,420	0,867

Cuadro 16. Log (CL₅₀) de Mycotrol en cada bloque con y sin TS-2035, y registrados a 24 y 72 h, contrastados mediante la prueba de Friedman ($p < 0,05$):

TS-2035 (% v/v)	Tiempo (h)	Log (CL ₅₀) (Bloques)			
		1	2	3	4
0,001	24	0,266	0,425	0,657	0,152
0,001	72	-0,262	-0,192	-0,261	-0,283
0	24	0,035	0,276	0,111	0,329
0	72	-0,120	0,029	-0,007	0,017
<i>p-value</i>		0,0100			
χ^2		11,10			

1.7. Cálculos de CL₅₀ de Lorsban 4E (clorpirifós 48% p/v)

Cuadro 17. Concentración letal media (CL₅₀) de clorpirifós (48% p/v) a 24 y 72 h, obtenidas mediante análisis Probit (n = 16):

Tiempo	CL ₅₀ (% v/v)	Intervalos de Confianza	χ^2	<i>p-value</i>
24	29,16	17,22 - 56,52	11,128	0,676
72	14,73	8,67 - 27,69	10,381	0,734

Cuadro 18. Concentración letal media (CL₅₀) de clorpirifós (48% p/v) con TS-2035 al 0,001% (v/v) a 24 y 72 h, obtenidas mediante análisis Probit (n = 16):

Tiempo	CL ₅₀ (% v/v)	Intervalos de Confianza	χ^2	<i>p-value</i>
24	3,18	2,00 - 5,08	7,238	0,925
72	2,31	1,47 - 3,61	5,930	0,968

Cuadro 19. Log (CL₅₀) de clorpirifós (48% p/v) en cada bloque con y sin TS-2035, y registrados a 24 y 72 h, contrastados mediante la prueba de Tukey ($p < 0,05$):

TS-2035 (% v/v)	Tiempo (h)	Log (CL ₅₀) (Bloques)			
		1	2	3	4
0,001	24	0,604	0,437	0,468	0,5
0,001	72	0,430	0,384	0,540	0,328
0	24	1,384	1,616	1,656	1,226
0	72	1,091	1,243	1,388	0,948
<i>p-value</i>		<0,0001			
R^2		0,962			

1.8. Cálculos de CL₅₀ de *M. anisopliae*

Cuadro 20. Concentración letal media (CL₅₀) de *M. anisopliae* a 24, 72 y 144 h, obtenidas mediante análisis Probit (n = 9):

Tiempo	CL ₅₀ (% p/v)	Intervalos de Confianza	χ^2	<i>p-value</i>
24	209,89	77,29 – 1829,96	2,123	0,950
72	80,89	37,77 - 304,63	3,769	0,806
144	77,00	33,60 – 359,08	9,296	0,232

Cuadro 21. Concentración letal media (CL₅₀) de *M. anisopliae* con TS-2035 al 0,001% (v/v) a 24, 72 y 144 h, obtenidas mediante análisis Probit (n = 9):

Tiempo	CL ₅₀ (% p/v)	Intervalos de Confianza	χ^2	<i>p-value</i>
24	23,19	14,06 - 41,98	5,059	0,653
72	20,63	12,81 - 35,63	6,608	0,471
144	16,08	9,33 – 29,58	4,233	0,753

Cuadro 22. Log (CL₅₀) de *M. anisopliae* en cada bloque con y sin TS-2035, y registrados a 24, 72 y 144 h, contrastados mediante la prueba de Tukey (p < 0,05):

TS-2035 (% v/v)	Tiempo (h)	Log (CL ₅₀) (Bloques)		
		1	2	3
0,001	24	1,477	1,139	1,511
0,001	72	1,477	1,074	1,422
0,001	144	1,363	1,045	1,238
0	24	2,521	1,956	2,615
0	72	1,799	1,673	2,381
0	144	1,731	1,535	2,460
<i>p-value</i>			0,0002	
R ²			0,913	

1.9. Cálculo de remoción de ceras mediante espectrofotometría

Cuadro 23. Cera remanente (% p/p) de 20 hembras adultas de *P. viburni*, en función de su peso (mg), luego de aspersión con TS-2035, contrastados mediante la prueba de Duncan ($p < 0,05$):

TS-2035 (% v/v)	Peso insectos (mg) \pm D.E.	Absorbancia (245,0 nm)	Cera remanente (mg/mL)	Cera remanente (% p/p)
0	42,20 \pm 2,20	0,3662	0,48	1,19 \pm 0,10
0,001	40,00 \pm 0,00	0,3545	0,46	1,15 \pm 0,08
1	37,35 \pm 2,55	0,2858	0,36	0,91 \pm 0,10
<i>p-value</i>			0,0002	
R^2			0,913	

2.0. Evaluaciones de pH

Cuadro 24. Valores promedios de pH de las distintas soluciones de TS-2035 (% v/v), contrastados mediante la prueba de Friedman ($p < 0,05$):

TS-2035 (% v/v)	pH \pm D.E.
0	6,95 \pm 0,10
0,001	7,05 \pm 0,17
0,01	7,03 \pm 0,34
0,1	6,85 \pm 0,06
1	8,45 \pm 0,19
<i>p-value</i>	0,0238
χ^2	11,258

Cuadro 25. Valores promedios de pH de las distintas soluciones de Mycotrol (% v/v), contrastados mediante la prueba de MLG ($p < 0,05$):

Mycotrol (% v/v)	pH \pm D.E.
0	6,95 \pm 0,10
0,1	7,00 \pm 0,14
1	7,05 \pm 0,06
10	6,73 \pm 0,05
100	6,40 \pm 0,08
<i>p-value</i>	<0,0001
R^2	0,908

Cuadro 26. Valores promedios de pH de las distintas soluciones de Mycotrol con y sin TS-2035 (0,001% v/v), contrastados mediante la prueba de MLG ($p < 0,05$):

Mycotrol (% v/v)	TS-2035 (% v/v)	pH \pm D.E.
0,1	0,001	6,90 \pm 0,08
100	0,001	6,43 \pm 0,10
0,1	0	7,00 \pm 0,14
100	0	6,40 \pm 0,08
<i>p-value</i>		0,0002
R^2		0,919

Cuadro 27. Valores promedios de pH de las distintas soluciones de Lorsban 4E (% v/v), contrastados mediante la prueba de MLG ($p < 0,05$):

Lorsban 4E (% v/v)	pH \pm D.E.
0	6,95 \pm 0,10
0,1	6,93 \pm 0,05
1	6,85 \pm 0,10
10	6,78 \pm 0,05
100	6,73 \pm 0,10
<i>p-value</i>	0,0136
R^2	0,643

Cuadro 28. Valores promedios de pH de las distintas soluciones de Lorsban 4E con y sin TS-2035 (0,001% v/v), contrastados mediante la prueba de MLG ($p < 0,05$):

Lorsban 4E (% v/v)	TS-2035 (% v/v)	pH \pm D.E.
0,1	0,001	7,05 \pm 0,06
100	0,001	6,98 \pm 0,05
0,1	0	6,93 \pm 0,05
100	0	6,73 \pm 0,10
<i>p-value</i>		0,0003
R^2		0,875

Cuadro 29. Valores promedios de pH de las distintas soluciones de *M. anisopliae* (% p/v), contrastados mediante la prueba de MLG ($p < 0,05$):

<i>M. anisopliae</i> (% p/v)	pH \pm D.E.
0	6,95 \pm 0,10
1	7,05 \pm 0,06
10	6,73 \pm 0,05
100	6,40 \pm 0,08
<i>p-value</i>	<0,0001
R^2	0,908

Cuadro 30. Valores promedios de pH de las distintas soluciones de *M. anisopliae* (% p/v) con y sin TS-2035 (0,001% v/v), contrastados mediante la prueba de MLG ($p < 0,05$):

<i>M. anisopliae</i> (% p/v)	TS-2035 (% v/v)	pH \pm D.E.
1	0,001	7,05 \pm 0,06
100	0,001	6,98 \pm 0,05
1	0	6,93 \pm 0,05
100	0	6,73 \pm 0,10
<i>p-value</i>		0,0003
R^2		0,875

APÉNDICE 2

Registro gráfico del espectro UV contra muestra de cera removida en 1 mL de cloroformo (CHCl₃)

En la Figura 1, se observa que el espectrofotómetro determinó la máxima lectura de absorbancia de la muestra de ceras remanente, extraída de 20 hembras de *P. viburni*, ocurre exactamente a los 245.0 nm (λ).



Figura 1. Análisis del espectro de absorbancia de ceras de hembras adultas de *P. viburni*.