

# ESTUDIOS DE PATOGENICIDAD DE UN HONGO ASOCIADO A *Mononychellus tanajoa* (Bondar), ACARO PLAGA DE LA YUCA (*Manihot esculenta* Crantz)

Juan Manuel Alvarez A.<sup>1</sup>  
Alfredo Acosta<sup>2</sup>  
Anthony C. Bellotti<sup>1</sup>  
Ann R. Braun<sup>1</sup>

## RESUMEN

Con el propósito de estudiar la viabilidad de un hongo encontrado en el CIAT-Palmira sobre poblaciones de *Mononychellus tanajoa*, (Bondar), dentro de un manejo integrado de plagas, se fijaron los siguientes objetivos: demostrar la patogenicidad del hongo u hongos asociados con los ácaros enfermos mediante pruebas de inoculación del patógeno a individuos sanos; determinar la biología del patógeno e identificar el o los hongos asociados con los ácaros enfermos. El trabajo se realizó bajo condiciones controladas adecuadas para reproducir los síntomas, cuatro temperaturas: 20, 24, 28 y 32°C y dos rangos de H.R. >65% y <65%. Se consiguió provocar reinfección de individuos sanos, obteniendo la completa expresión de síntomas y se estableció el modelo de reinfección. Se determinó que el contagio ocurría más rápidamente a la mayor temperatura probada (32°C), pero el mayor número de individuos infectados se obtuvo a las temperaturas de 24 y 28°C. Se determinó que la muerte del ácaro ocurre por la acción mecánica del patógeno al invadir el hemocelo. Se determinó la biología del patógeno; la conidiogénesis sólo ocurre con humedades relativas superiores al 65%, mientras que la producción de conidias adhesivas ocurre únicamente con humedades relativas inferiores al 65%. La infección es irreversible y aparentemente no se transmite transovariamente; el contagio de la infección lo provocan las conidias adhesivas. De acuerdo con la medición y comparación de las estructuras del patógeno, se determinó que el hongo

pertenece al género *Neozygites*, pero se recomienda reevaluar el concepto de identificación de especies de este género sobre la medición de estructuras. No se registró patogenicidad sobre un ácaro Phytoseiidae de la especie *Typhlodromalus limonicus* sens. lat.

## SUMMARY

In the cassava crop (*Manihot esculenta* Crantz), tetranychid mites cause considerable losses. Fungal epizootics which affect *Mononychellus tanajoa* (Bondar) populations have been detected under field conditions. Healthy mites were infected under controlled conditions in the laboratory. Daily observations were made with a dissecting microscope, in order to identify disease symptoms progression. Mites were mounted on slide and examined with a phase contrast microscope in order to confirm the presence of a fungal pathogen and to determine its identity. Reinfection occurred when a healthy and an infected mite were placed together at 70% R.H. and 20°-30°C. Symptoms of infection progressed from changes in body color, swelling and sluggish movements, to death and mummification. Invasion by secondary pathogens was common. Each symptom was related to a developmental stage of the fungus, which was identified as a species of the genus *Neozygites*. *Neozygites* sp. is pathogenic to all mobile stages of *M. tanajoa*. Conidiogenesis was inhibited at relative humidities below 65%; however, the formation of an adhesive conidia responsible for propagation of the infection occurred only below 65% H.R. No evidence was found for pathogenicity of this fungus to phytoseiid mites

## INTRODUCCION

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es una de las plantas cultivadas de mayor importancia para el hombre, ya sea para su alimentación como

fuelle de calorías o para consumo animal e industrial. La planta es atacada por numerosas plagas, entre las cuales los ácaros se consideran como serios en todo el mundo (Bellotti y Schoonhoven 1978). El ácaro verde de la yuca, *Mononychellus tanajoa* (Bondar) (Acari: Tetranychidae), es la mayor plaga del cultivo en algunas áreas del Neotrópico. Fue accidentalmente introducido al Africa desde América en 1971 (Nyiira 1982), convirtiéndose en un grave problema y diseminándose rápidamente por 27 países, debido entre otros factores a la carencia de enemigos naturales efectivos (Yanineky y Herren 1988), hasta el punto de ser considerada hoy como la plaga más destructiva. El *M. tanajoa* es una plaga seria en el Nordeste de Brasil, donde las pérdidas en el rendimiento del cultivo varían entre 10 y 50%, dependiendo de algunos factores como la variedad, el sistema y la época de siembra (Veiga 1985). En Venezuela se reconocen pérdidas similares a las que se han registrado en Brasil (Doreste y Aponte 1979). En Colombia, las pérdidas ocasionadas por el complejo *Mononychellus* spp. han sido esporádicas y se considera que un efectivo control biológico natural ya existente, evita que las pérdidas alcancen el orden del 73 y 67% en la producción de raíces y estacas, respectivamente, como se obtuvo a nivel experimental en variedades susceptibles (Byrne 1980).

1. I.A. Asistente de Investigación y Entomólogos. Programa Entomología Yuca. CIAT. Apartado Aéreo 6713. Cali, Colombia.

2. I.A. Profesor. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. Apartado Aéreo 14490. Santafé de Bogotá, D.C., Colombia.

El control del ácaro verde de la yuca es un desafío importante hoy en día. De hecho, con el propósito de implementar su control biológico, el IITA (International Institute of Tropical Agriculture) organizó un proyecto colaborativo y multi-institucional. El CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) y EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria) se comprometieron en la búsqueda de ácaros depredadores de la familia Phytoseiidae, considerados como los más importantes enemigos naturales del *M. tanajoa* en Sur América, mientras que IITA implementó la liberación de depredadores y la capacitación de técnicos en África. Otras instituciones, incluyendo universidades en países desarrollados y varios programas nacionales africanos, también fueron involucradas en el proyecto. La estrategia del proyecto consistía en explorar aquellas áreas en el Neotrópico que correspondieran ecológicamente a áreas en África donde el ácaro fuera un grave problema y luego seleccionar los posibles enemigos naturales para ser introducidos al África. Para dar prioridades a las exploraciones se usaron criterios agroecológicos. Se le dio una alta prioridad a las regiones áridas y semi-áridas. Entre 1983 y 1990 se evaluaron 1.261 campos de yuca en Colombia, Venezuela, Ecuador, Nordeste del Brasil, Trinidad y Tobago, Guyana, Perú, Paraguay, México, Cuba, Panamá y Nicaragua. Un trabajo similar realizó EMBRAPA en el Nordeste de Brasil entre 1988 y 1990, cubriendo 427 campos de yuca (CIAT 1991).

Cuarenta y cinco especies de ácaros fitoseiidos fueron identificadas asociadas con la yuca en el Neotrópico. En Colombia se obtuvo la mayor diversidad de especies de fitoseiidos, con 40 especies identificadas.

Desde 1984 se han enviado a África 10 especies de enemigos naturales del ácaro verde de la yuca. Con el propósito de mantener e incrementar una cantidad suficiente de los ácaros fitoseiidos para dichos envíos, se desarrollaron métodos de cría para su multiplicación. Para esto se mantuvieron permanentemente, en el CIAT, colonias del ácaro confinadas dentro de casas de malla, y fue allí donde se comenzó a detectar la presencia masiva de cadáveres del ácaro en el envés de las hojas de yuca. En 1985, el agente causal de dichas mortalidades fue identificado provisionalmente como una especie de *Neozygites* (Humber com. pers<sup>1</sup>.). Posteriormente, en zonas subhúmedas del Nordeste brasileiro, se observaron epizootias en el campo debidas a *Neozygites* sp. (Delalibera et al., en prensa). Las mortalidades se caracterizaron por presentar momificación. Para emplear eficientemente una enfermedad como una medida de control microbial es de gran importancia determinar su naturaleza y causa, por lo tanto, en el presente trabajo los objetivos fueron:

1. Demostrar la relación existente entre la presencia bajo condiciones de campo de ácaros enfermos de la especie *M. tanajoa* y hongos asociados con este artrópodo.
2. Identificar los hongos asociados con los ácaros enfermos y seleccionar el que ofrezca mayor grado de patogenidad, estudiar su biología y probar su efectividad bajo condiciones de laboratorio adecuadas y controladas.

## REVISION DE LITERATURA

Una de las primeras observaciones de un hongo infectando ácaros de la familia Tetranychidae fue hecha por Fisher (1951) en la Florida, donde una especie de *Entomophthora* causó mortalidades entre el 32 y el

95% en una población del ácaro rojo de los cítricos, *Panonychus citri* (McGregor). Weiser (1968) describió la especie *Triplosporium tetranynchi* establecido sobre *Tetranychus althaeae* Hanstein. El hongo causó alta mortalidad (80-85%) sobre poblaciones naturales del ácaro rojo en un huerto frutal de Checoeslovaquia. El *Entomophthora* sp. es probablemente uno de los mejores agentes para el control natural de poblaciones de *T. urticae* Koch sobre algodón en Alabama (Estados Unidos), en donde en algunas parcelas experimentales alcanza un máximo de infección del 100% (Carner y Canerday 1970).

En un trabajo realizado bajo invernadero en la U.R.S.S. se produjo infección sobre una población de *T. urticae*; todos los ácaros murieron por "Entomophthorosis" durante los siguientes 15 días después de introducido el hongo, y la plaga no volvió a aparecer en el invernadero durante los siguientes 5,5 meses (Tsintsadze et al. 1976).

Es muy reducido el conocimiento a cerca del complejo de enemigos naturales del *M. tanajoa* (Alvarez 1990). Agudelo (1986), durante un conteo de rutina de las poblaciones de *M. progresivus* Doreste (= *M. tanajoa*) al comienzo del período de lluvias en Venezuela, en una parcela experimental para evaluar la resistencia de plantas de yuca a los ácaros, encontró algunos ácaros muertos sobre el envés de las hojas. Al montar y examinar los cadáveres con el microscopio de contraste, se observaron estructuras típicas de un hongo de la familia Entomophthoraceae.

Estudios y registros anteriores demuestran que los hongos acaropatógenos juegan un papel importante en la regulación natural de las poblaciones de estos artrópodos. El interés creciente se debe a que su aplicación no es puramente de naturale-

1. HUMBER, R.H. 1989. Boyce Thompson Institute. Cornell University, Ithaca, N.Y. U.S.A.

za académica, sino también aplicada. El control biológico natural de hongos sobre poblaciones de ácaros puede causar mortalidades superiores a un 80% (Weiser y Numa 1966; Saba 1971; Smith y Furr 1975; Tsintzade et al. 1976; Carner 1976; Gardner et al. 1982; Smitley et al. 1986; Carrera et al. 1987).

Van der Geest et al. (1990) afirman que los hongos acaropatógenos tienen probablemente un gran potencial para aplicación en el trópico, donde la humedad relativa y la temperatura son altas, cuando las poblaciones de plaga están en su máximo nivel.

En cuanto a la identificación de los hongos patógenos de ácaros, los taxónomos que han trabajado con ellos no han dilucidado hasta el momento claves claras que permitan diferenciar las especies. Hasta la fecha hace falta mucho trabajo sistemático como guía para la determinación de hongos patógenos de ácaros y también son casi inexistentes los esquemas y ayudas visuales que ilustren su morfología, estructura y la sintomatología correspondiente a la infección que causan sobre los huéspedes (Alvarez 1990).

## MATERIALES Y METODOS

### Ubicación y Recolección de Muestras

El trabajo se realizó durante los años 1989 y 1990 en las instalaciones del CIAT (Palmira, Valle, Colombia), situado a 965 msnm, con una humedad relativa promedio de 70%, una precipitación promedio de 938 mm/año, una temperatura máxima promedio de 29,21°C, mínima promedio de 19,1°C y media promedio de 24,2°C.

El proceso de investigación se inició con la recolección de ácaros en el campo y en las casas de malla destinadas a la cría masiva de ácaros

fitófagos, sitios donde se encontraron especímenes de **M. tanajoa** muertos y con apariencia diferente a los cadáveres ocurridos por causas naturales o mecánicas. Durante las recolecciones se registraron la temperatura y la humedad relativa. En sitios donde se detectaron epizootias con muchos individuos se colectaron las hojas con pecíolo y se llevaron al laboratorio en cajas plásticas con la mayor asepsia posible, con el fin de aprovechar al máximo todo el material, extrayendo los individuos que presentaban signos de infección, con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Los ácaros que no se emplearon inmediatamente, permanecieron en tubos de recolección, los cuales contenían en su parte inferior un algodón embebido en glicerol y encima de este un papel de filtro, sobre el que se colocaron los ácaros colectados. Todo esto con el fin de mantener las muestras en condiciones de total sequedad. Este método fue recomendado por Richard Humber del Boyce Thompson Institute (Comunicación personal, 1989).

La muestra se dividió en tres grupos: El primer grupo se destinó para comprobar la presencia del patógeno; el segundo para realizar las pruebas de patogenicidad o reinfección efectuando los estudios de sintomatología, y el último grupo para la identificación del patógeno.

### Comprobación de Infección

Para comprobar la presencia del hongo en las muestras, los ácaros del primer y tercer grupo se aclararon con una solución de lactofenol y se tiñeron con azul de algodón, en una caja plástica de las utilizadas para las pruebas de ELISA, con el fin de llevar un registro individual.

### Pruebas de Patogenicidad

Los especímenes del segundo grupo se dividieron en dos, así: una parte de ellos se colocó individual-

mente sobre círculos de hoja de yuca de 2 cm de diámetro, en cajas petri con espuma saturada de agua para proporcionar condiciones similares a las de campo ( $T = 30^{\circ}\text{C}$  en el día y  $20^{\circ}\text{C}$  en la noche y una H.R. = 60%, con un rango entre 40 y 80%). Allí se observaron los cambios que ocurrían en los ácaros momificados que se presumía habían muerto por la infección. La otra parte de los especímenes se destinó para efectuar las pruebas de reinoculación del patógeno. Una vez se determinaron los cambios que ocurrían en los ácaros momificados, se buscó dilucidar si la temperatura y la humedad relativa eran factores determinantes para que un ácaro momificado tomara una u otra apariencia, para la cual se formaron cuatro grupos de 32 ácaros. Cada grupo se mantuvo a una de cuatro temperaturas (20, 24, 28 y  $32^{\circ}\text{C}$ ) y dos humedades relativas (<65% y >65%), llegando algunas veces a la saturación de humedad en el ambiente.

Para realizar los estudios de inoculación del patógeno se emplearon ácaros adultos obtenidos de colonias mantenidas en el laboratorio, las cuales se manejaron desde el estado de huevo, con el propósito de tener certeza acerca de su sanidad. Los individuos se sometieron a varias pruebas: 20 ácaros infectados muertos, previamente envueltos en tela de gaza, se lavaron por 30 segundos en hipoclorito de sodio al 0,05%, y posteriormente se maceraron en un homogenizador de cristal, mezclados con agua bidestilada estéril, y esta solución se asperjó sobre individuos sanos adultos de la misma edad colocados individualmente sobre círculos de follaje de yuca de 2 cm de diámetro, por medio de un microaspersor de Vilbis conectado a una bomba de vacío, a una presión de 20 PSI, para así conseguir una gota muy fina. Igualmente, la solución se asperjó sobre discos limpios de yuca que sirvieron de sustrato

alimenticio a otros ácaros sanos. Como testigos se emplearon ácaros sanos y discos de yuca asperjados con agua bidestilada estéril. En total se trabajó con 50 individuos sanos en contagio y 20 testigos. También se empleó el macerado en seco, asperjado sobre hojas de yuca que sirvieron como sustrato alimenticio a los ácaros sanos. El inóculo inicial se cambió a las 48 horas por hojas limpias. Siempre se empleó yuca de la variedad CMC 40, escogida por ser una variedad susceptible al ataque de ácaros.

Se probó otro método de inoculación, el cual consistió en colocar durante 24 horas, en cámaras de humedad (cajas de petri cubiertas), un ácaro sano en contacto directo con cuatro (4) ácaros momificados; después de este tiempo, las cajas se descubrieron y a las 48 horas se retiraron los ácaros momificados y se cambiaron los discos de yuca.

Para las pruebas descritas anteriormente se emplearon cajas de petri de 14,5 cm de diámetro provistas de espuma saturada con agua. Dentro de cada una se colocaron ocho (8) discos de hoja de yuca CMC 40 de 2 cm de diámetro, numerados y ubicados en círculo. Igualmente se emplearon frascos plásticos de confinamiento, de 2 cm de diámetro, los cuales se cubrieron con plástico adhesivo. Las observaciones se hicieron a partir de las 24 horas y se realizaron diariamente hasta la muerte de los ácaros. Con el propósito de determinar la sintomatología de la infección sobre los huéspedes se evaluó la mortalidad, la movilidad y los cambios en apariencia, tales como color y volumen.

Inicialmente se trabajó bajo una temperatura de 28°C y con humedad relativa promedio del 65%, las cuales corresponden a las condiciones promedias de los sitios de recolección de las muestras en el campo, el

fotoperíodo fue de 12 horas luz: 12 horas oscuridad.

En estos trabajos se redujo el intervalo de observación de 24 a 12 horas y en algunos casos a 6 horas, con el fin de determinar con la mayor aproximación la sintomatología de la enfermedad. Una vez se determinó el proceso de infección, cada síntoma externo se asoció con un estado de desarrollo del patógeno, para lo cual se hicieron montajes de individuos infectados en placas de microscopía, empleando el mismo sistema de aclarado, tinción y montaje de los individuos del primer y tercer grupos. De esta forma se determinó la biología del patógeno.

### **Permanencia de la Epizootia**

Una vez se consiguió reinfectar individuos sanos, se efectuó otro bioensayo con el propósito de comprobar si una epizootia o infección puede mantenerse o perdurar en una población de ácaros. Para ello se pusieron en contacto cinco (5) ácaros adultos sanos con dos (2) ácaros momificados y se replicó 20 veces, para un total de 100 individuos sanos y 40 momificados. Se trabajó con una temperatura promedio de 28°C y una H.R. promedia de 65%; se hizo una observación diaria para registrar los cambios en apariencia de los individuos vivos (color, volumen, movimiento, mortalidad y momificación). El inóculo inicial (40 individuos momificados) se retiró al octavo día, también se retiraron todos los individuos que morían por causas naturales o mecánicas. Con el fin de hacer observaciones sobre una población que se incrementa normalmente, no se retiraron los huevos y se permitió que estos eclosionaran.

### **Velocidad de Infección y Estado más infeccioso**

Conocida la sintomatología y el proceso de infección, se buscó mante-

ner permanentemente individuos infectados, para lo cual fue necesario conocer cuál estado posterior a la momificación era más infectivo, cuál infectaba más rápido y cuál provocaba mayor número de individuos enfermos; para esto se montó un ensayo, colocando grupos de cinco (5) individuos sanos en contacto con un ácaro momificado, uno cristalizado, uno negro y uno con conidiogénesis. Este ensayo se replicó 5 veces, para un total de 25 ácaros sanos por cada estado de inóculo. Para la prueba con individuos momificados se mantuvo la humedad relativa por debajo del 20%, ya que se había comprobado que una humedad relativa alta provoca la conidiogénesis. Sólo se observó si se presentaba o no contagio en los primeros 8 días de contacto. Se consideró como éxito, obtener individuos momificados. La temperatura fue de 28°C.

### **Relación entre Temperatura e Infección**

Después de detectar el estado infectivo, se buscó determinar cuál temperatura favorecía más el contagio. Para esto se montó un ensayo bajo cuatro regímenes de temperatura (20, 24, 28 y 32°C), colocando, sobre un disco de hoja de yuca, cinco (5) ácaros sanos en contacto con un ácaro esporulado. Por cada temperatura, el ensayo se repitió 16 veces, para un total de 320 ácaros sanos. La humedad relativa fue superior al 70%. Se hicieron observaciones cada 24 horas y se registró la presencia de síntomas y la mortalidad causada por la infección.

### **Prueba de Transmisión Transovárica**

Se montó un ensayo para observar las generaciones descendientes de hembras infectadas, con el fin de conocer si la infección se transmite transováricamente; para esto se aislaron y observaron los huevos depo-

sitados por hembras con sintomatología de infección. Se evaluaron aproximadamente 80 huevos, sobre los cuales se observó la eclosión y se llevaron hasta el estado de adulto.

### Pruebas de Patogenicidad sobre Acaros Phytoseiidae

Con el propósito de conocer si el patógeno de los ácaros fitófagos infecta también ácaros depredadores de la familia Phytoseiidae, a dos ácaros depredadores de la especie **Typhlodromalus limonicus** (Garman & McGregor) se les suministró como alimento, cuatro (4) especímenes del ácaro verde de la yuca. Al quinto día se efectuó el montaje de los fitoseiidos, con el fin de observarlos bajo el microscopio de contraste de fase y comprobar la posible presencia del patógeno. El ensayo se replicó cinco veces.

### Identificación del Patógeno

**Medición de estructuras.** Para determinar el género del hongo, esencialmente se empleó la medición y comparación de la morfología y de los estados fisiológicos iguales, utilizando el microscopio de contraste de fase, el microscopio electrónico de barrido, y las descripciones de King y Humber (1981); además, se enviaron especímenes y fotografías al Dr. R. Humber, en el Boyce Thompson Institute. La forma, tamaño y presencia de núcleos de la conidia primaria son quizás los caracteres taxonómicos más importantes. Debido a que los ácaros colectados en el campo generalmente presentan momificaciones y ausencia de conidias, fue necesario diseñar un método para provocar la conidiogénesis. Este consistió en utilizar una campana de vacío estéril con agua 100C en la parte inferior para provocar la saturación de humedad en su interior; en la parte media se colocó una malla sobre la cual se ubicaron placas con individuos

momificados, y posteriormente se selló herméticamente. Se trabajó con una temperatura de 28°C. Se efectuaron mediciones de las estructuras del patógeno aparecidas a las 24, 48 y 72 horas después del montaje.

**Microscopia electrónica.** Para el proceso de identificación del patógeno y estudios de su biología se tomaron fotografías bajo el microscopio de contraste de fase al igual que unas fotografías logradas en el microscopio electrónico de barrido en la Unidad de Virología del CIAT.

## RESULTADOS

### Ubicación y recolección de muestras de ácaros

Las condiciones promedio de temperatura y humedad relativa durante los muestreos en los sitios de recolección en el campo fueron: T = 30°C; H.R. = 51%; mientras que en las casas de mallas fueron T = 34°C; H.R. = 76 - 100%.

Durante las recolecciones de ácaros se encontraron individuos de **M. tanajoa** con momificación y por lo general se registraron en epizootias abundantes. Los individuos infectados se caracterizaron por una momificación y aumento de volumen del cuerpo; cambió de la coloración normal a habano claro, café, hasta el negro intenso y brillante; las patas delanteras quedan estiradas y las manchas ocelares se tornan difusas. En algunos casos se observa una apariencia de cristalización con coloraciones entre el café y el café rojizo brillante.

### Comprobación de infección

En los ácaros momificados colectados que luego se aclararon, se detectó la presencia de cuerpos hifales y conidias adhesivas, estructuras típicas de los hongos de la familia Entomophthoraceae.

Por lo general, los ácaros momificados pasan por un proceso que consiste en la inducción de esporulación; algunos pueden tomar una coloración totalmente blanca; en los momificados se observa una pérdida de volumen, generalmente asociada con la pérdida de las conidias sobre los individuos. Una vez estos ácaros han perdido sus conidias y disminuido su volumen, comienzan a tomar una apariencia cristalizada un poco brillante y aquellos que en este momento no se han cristalizado son susceptibles de ser atacados por hongos saprófitos que los invaden, observándose un crecimiento miceliar sobre ellos.

### Relación entre Temperatura y Apariencia de Acaros Momificados

Una vez se conocieron los cambios que ocurren a partir de los ácaros momificados, se comprobó que la temperatura es un factor determinante de altos cambios. En los ácaros momificados los colores oscuros se asociaron con temperaturas bajas y el color blanco con temperatura alta (32°C). Por el contrario, la conidiogénesis o esporulación es independiente de la temperatura, lo cual fue corroborado en las pruebas con las dos humedades relativas; con la H.R. inferior a 65% y en las cuatro temperaturas, probadas, los ácaros permanecieron momificados, y con la H.R. superior a 65%, en las cuatro temperaturas ocurrió la conidiogénesis. Este parámetro es muy útil en las pruebas de patogenicidad.

Los estudios sobre la sintomatología de los ácaros enfermos se realizaron mediante los métodos de inoculación del patógeno en ácaros sanos. En las pruebas que se utilizó la aspersión del macerado de ácaros momificados, no fueron satisfactorias; ningún individuo presentó momificación. En las pruebas donde se empleó el macerado en seco, únicamente un ácaro, de los 50 del

ensayo, presentó momificación. El método de inoculación donde se empleó una cámara de humedad con cuatro ácaros momificados y uno sano dio buenos resultados. Al octavo día, de los 50 individuos con los que se inició el ensayo, 23 se observaron momificados, lo cual corresponde a un 46%; 21 murieron por causas naturales o mecánicas y 6 permanecieron vivos.

### Sintomatología

La muerte de ácaros por causas diferentes de la infección generalmente ocurrió por ahogamiento o mecánicamente cuando eran traspasados a un disco nuevo de hoja de yuca. Durante el proceso de infección, los ácaros van perdiendo progresivamente la movilidad, aumentan su volumen y aclaran bastante su color. Posteriormente mueren y comienzan a oscurecerse, pierden el brillo y toman una apariencia opaca. El color pasa del amarillo al habano o café; en este punto ya están momificados y han ganado mucho volumen, las patas delanteras generalmente quedan estiradas, las manchas ocelares rojas se tornan difusas y la momificación típica es bastante seca. El proceso entre la aparición de síntomas y la momificación dura entre 36 y 48 horas, a una temperatura promedio de 28°C. El conocimiento de los síntomas permitió reinfectar ácaros sanos y estudiar los cambios internos, al igual que determinar la biología del patógeno.

Cuando en el ácaro se observan los inicios de la sintomatología, internamente ha comenzado a ser invadido por unos pequeños cuerpos hifales que al principio son de forma redondeada (Fig. 1a), luego crecen un poco y algunos se dividen por fisión originando dos cuerpos hifales nuevos; posteriormente empiezan a alargarse y toman formas irregulares al comenzar a retorcerse. Luego, los cuerpos hifales se alargan, se agru-

pan, toman formas más regulares y llenan el hemocelo del ácaro; esta invasión interna es la causa real de la muerte del ácaro. Cuando el ácaro muere, comienza a momificarse (Fig. 1b) e internamente, los cuerpos hifales que ya han invadido todo el cuerpo del ácaro y se han agrupado, se elongan hasta alcanzar la superficie o cutícula del ácaro; cada cuerpo hifal tiene una forma ancha en su extremo que es la que llega a la pared del exoesqueleto, como buscando una salida (Fig. 1c).

La aparición de esporulación sobre el ácaro es el signo externo de la conidiogénesis (Fig. 1d). La emergencia de las conidias ocurre de la siguiente forma: cada cuerpo hifal se constituye en un conidióforo y pequeñas protuberancias van emergiendo; cada punta del cuerpo hifal presiona hasta romper el exoesqueleto por el medio de dos estrías (Fig. 1c). Los cuerpos hifales emergen por todas partes, menos por las patas, quelíceras y el escudo ventral. Cuando cada conidióforo maduro (Fig. 1e) alcanza el tamaño máximo, la punta se torna esférica y en el conidiófono se observa la línea por donde va a ocurrir el desprendimiento de la conidia, entonces se rompe originando una conidia primaria, que es redonda y deja la cicatriz de ruptura. La coloración externa blanca corresponde a una conidiogénesis abundante (Fig. 1d).

Cuando los ácaros toman una apariencia algodonosa y oscura, internamente se observa que han sido invadidos por otros hongos ajenos al causante de la muerte. Algunos de estos invasores fueron identificados como *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp. y *Penicillium* sp.

### Permanencia de la Epizootia

Se comprobó que bajo condiciones similares a las de campo, una epizootia se mantiene en una pobla-

ción. Sobre una colonia de 100 ácaros adultos sanos cogidos al azar se observaron primero dos ácaros momificados a los 10 días, la población siguió creciendo normalmente y aunque la infección jamás puso en peligro a la colonia, se observaron ácaros con síntomas, lo cual indica que estos van a servir de inóculo de infección a otros ácaros y la enfermedad puede continuar causando mortalidad en la población.

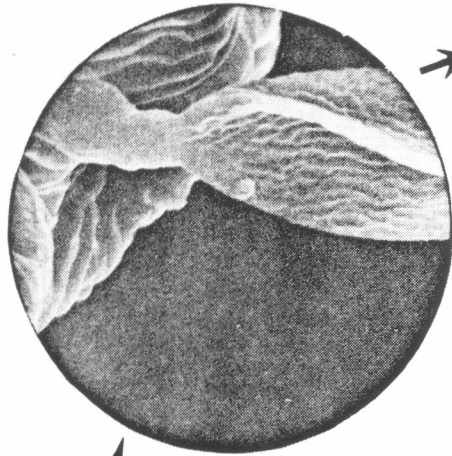
### Relación entre Estado e Infección

El único estado capaz de provocar reinfección sobre individuos sanos fue el estado en el cual se presenta conidiogénesis. Ninguno de los otros estados provocó infección.

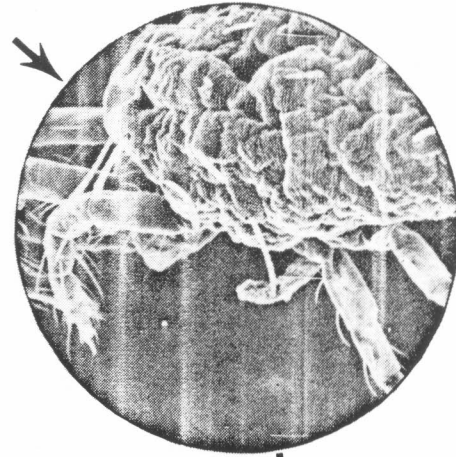
### Relación entre Temperatura e Infección

Se determinó que de las temperaturas probadas las de 24 y 28°C fueron las que mayor número de individuos momificados provocaron, con un total del 81,3% de la población momificada, en ambos regímenes (Fig. 2). La temperatura de 20°C provocó la infección más rápida, con un 47,5% de la población momificada al quinto día. Al contabilizar los individuos vivos en el bioensayo, al décimo día se observó que a menor temperatura mayor número de individuos vivos, y que a mayor temperatura mayor mortalidad. Por lo tanto se cree que una temperatura adecuada para la infección permanente de los ácaros estaría entre 24 y 28°C. Realmente no se puede determinar a cuál temperatura el patógeno es más eficaz, porque si bien a 32°C únicamente hay infección sobre el 21,3% de la población, esto no indica que el patógeno no sea eficaz a esta temperatura, pues ya en el día décimo ha ocurrido una mortalidad natural del 73,7%. Por lo tanto, es posible que el ciclo de vida de los ácaros se acorte hasta el punto de no dar oportunidad de infección al

1g. Conidia adhesiva, adherida al cuerpo del ácaro, provocando el contagio de la infección.

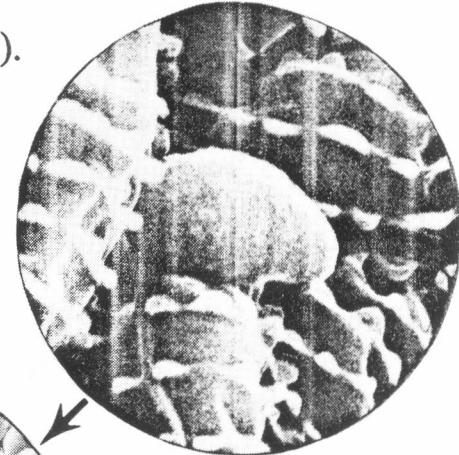


1a. Cuerpos hifales en el hemocele del ácaro.

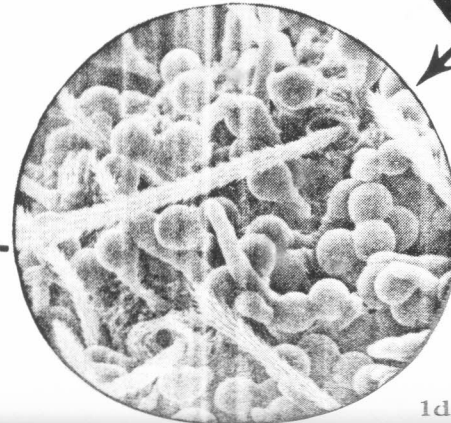


1b. AVY momificado.

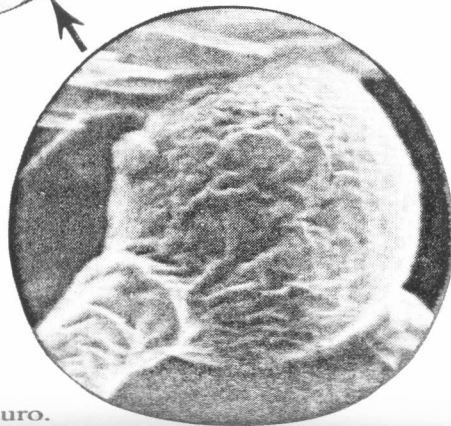
Fig. 1. Ciclo de vida del hongo *Neozygites* sp. patógeno del ácaro verde de la yuca AVY, *Mononychellus tanajoa* (Bondar).



1c. Cuerpo hifal emergiendo en medio de dos estrias.

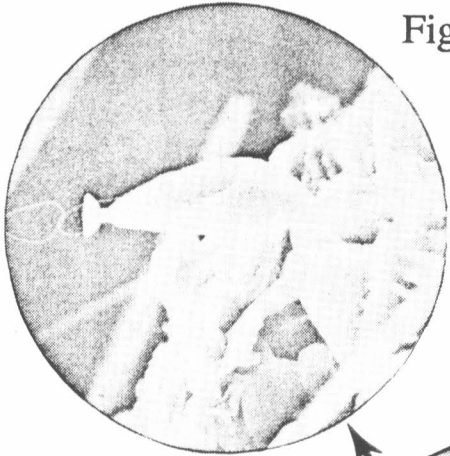


1d. Conidiogénesis abundante.



1e. Conidióforo maduro.

1f. Conidia adhesiva aún en su capilar.



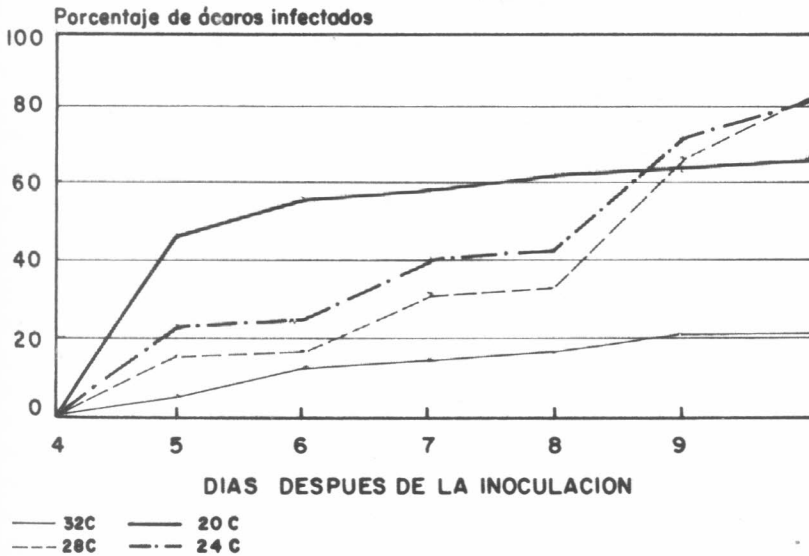


Figura 2. Relación entre infección y temperatura

patógeno. Es decir, con una temperatura entre 24 y 28°C, el proceso de infección no es tan acelerado, pero se infecta un mayor porcentaje de la población; además, es posible que estos nuevos individuos momificados sean capaces de reproducir la infección en los individuos que aún se encuentran vivos.

#### Pruebas de Transmisión Transovárica

En las observaciones de la descendencia de hembras infectadas, ningún individuo mostró síntomas de infección. Los huevos que no eclosionaron se montaron en placas y bajo el microscopio no mostraron señales del patógeno.

#### Pruebas de Patogenicidad sobre Phytoseiidae

Nunca se observó infección sobre los ácaros Phytoseiidae. Sobre 12 ácaros depredadores observados nunca se determinó invasión de los cuerpos hifales. En dos hembras de *T. limonicus* se observaron capilo-

conidias sobre el dorso, pero sin presentar síntoma alguno de infección.

#### Identificación del Patógeno

Los individuos de *M. tanajoa* colectados y observados al microscopio electrónico presentaron evidencia de infección, pero generalmente sin conidiogénesis.

Sobre los individuos colocados en la campana de vacío se observó conidiogénesis en el primer registro a las 24 horas y en estas condiciones se obtuvo presencia de conidias primarias. Estas conidias generalmente fueron claras, sin núcleo y con cicatriz de ruptura. La emergencia de las conidias ocurrió por todas las partes del cuerpo del ácaro, menos por el escudo ventral, las patas y las quelíceras. Las conidias fueron disparadas del conidióforo (Fig. 1e), formando un halo en el huésped; la máxima distancia a la cual se disparó una conidia fue en promedio de 6 mm, lo cual daba un halo de aproxi-

madamente de 13 mm de diámetro, incluido el milímetro del huésped. A las 48 horas se observó la presencia de conidias secundarias y algunas terciarias, las cuales eran oscuras. Las conidias primarias algunas veces se convierten en nuevos conidióforos, los cuales se elongan y dan origen a conidias secundarias. Igual ocurre con los secundarias que originan terciarias. Las conidias que no originan ninguna conidia continúan su desarrollo. En esta observación aparecieron las conidias adhesivas o capiloconidias.

A las 72 horas se observó una gran cantidad de conidias adhesivas o capiloconidias (Fig. 1f), originadas en su mayoría a partir de conidias primarias y algunas por las secundarias. Algunas capiloconidias dan origen capilares, sobre los cuales nacen capiloconidias secundarias y en ocasiones sobre estas últimas nacen capiloconidias terciarias. La germinación y crecimiento de estas conidias se realizó verticalmente sobre las placas de microscopía, y estas se observan soportando un bosque de conidias, donde cada fila vertical de capilares representa un árbol. Al efectuar los montajes, los capilares caen sobre la placa.

En resumen, las conidias mantenidas al 100% de humedad relativa producen muchos cambios; algunas se constituyen en nuevos conidióforos o cuerpos hifales que dan lugar a conidias secundarias y algunas veces estas originan las terciarias, las cuales sólo difieren en unas pocas micras de menos en tamaño; otras conidias en lugar de conidióforos, originan unos tubos delgados o capilares que crecen verticalmente y en la punta van formando un ángulo, sobre el cual crecen unas conidias, inicialmente redondeadas y posteriormente de forma ovalada que una vez maduran, presentan una estructura en forma de cono pequeño en el extremo distal (Fig. 1f).



El capilar que las sostiene se parte fácilmente y estas conidias una vez liberadas caen al sustrato donde se encuentren. Es frecuente observar estas conidias adheridas a las patas de los ácaros, y en ocasiones, adheridas a otras partes del cuerpo, lo cual hace presumir que el minúsculo cono tiene poder adhesivo y que posiblemente estas sean las estructuras de propagación de la infección sobre nuevos ácaros sanos (Fig. 1g), puesto que generalmente los ácaros con conidias adhesivas se encuentran vivos y con síntomas de infección o momificados. Además, algunas conidias adhesivas se observan abiertas longitudinalmente, como si ya hubieran cumplido la misión de pasar su contenido protoplasmático al ácaro (Fig. 1g). Por todo lo anterior, se pudo determinar que se trata de un hongo Entomophthoraceae, perteneciente al género **Neozygites**.

## DISCUSION

En el campo, la recolección de ácaros tetranychidos infectados por "entomophthorosis" es fácil, y estos se reconocen por presentar una momificación típica. Para observar todas las estructuras del patógeno bajo el microscopio de contraste de fase es necesario aclarar los individuos y posteriormente teñirlos.

Bajo condiciones de laboratorio se consiguió provocar la reinfección de individuos sanos de **M. tanajoa** por la acción del patógeno **Neozygites** sp., obteniendo la completa expresión de síntomas. La infección se manifiesta por un aumento en el volumen de los individuos, los cuales pierden las arrugas sobre el dorso, cesan de alimentarse por causa de la inmovilidad y pierden el brillo típico en todo el cuerpo. Una vez el ácaro muere, se momifica, adquiere un color café claro u oscuro opaco, con las manchas ocelares rojas difusas y las patas delanteras estiradas.

Como cada uno de los síntomas y signos se asoció con un estado del patógeno, fue posible, mediante el montaje de los individuos para observación al microscopio, determinar la biología y el género del hongo **Neozygites**. Además, esos montajes permitieron determinar que la muerte ocasionada por el patógeno ocurre por la acción mecánica de la invasión del hemocelo del ácaro.

Los cambios externos ocurridos sobre los ácaros momificados se deben a la conidiogénesis del patógeno. Para que sobre un individuo infectado por "entomophthorosis" ocurra la formación y desprendimiento de conidias primarias (Conidiogénesis) se requiere de una humedad relativa superior al 65%; de lo contrario, con una humedad relativa baja, el individuo permanece momificado. Esto indica la forma como se podrían preservar durante largo tiempo individuos de epizootias de campo. Individuos momificados, de 5 y 6 semanas, produjeron conidiogénesis en ambientes de humedad relativa alta y provocaron la reinfección de individuos sanos. La temperatura fue el factor determinante para que existieran diferentes coloraciones en la conidiogénesis. Mientras que la formación de conidias se favorece con una alta humedad relativa, esta impide la formación de conidias adhesivas.

Dentro de las campanas de humedad, a las 48 horas se condensó el agua en el ambiente, por tanto la humedad relativa bajó y fue por esta razón por la cual hasta ese momento comenzó a observarse la formación de conidias adhesivas.

Los ácaros con sintomatología de infección siempre presentan capiloconidias adheridas a las patas o al cuerpo; algunas de ellas abiertas y libres de su contenido protoplasmático, por lo cual se presume que las estructuras encargadas de propa-

gar la infección son las capiloconidias o conidias adhesivas. Se comprobó que mientras un ácaro se encuentre momificado no tiene poder infectivo. Los individuos sobre los cuales se observaron síntomas de infección, murieron y posteriormente se momificaron, lo cual indica que la infección por causa del patógeno es irreversible y en cualquier caso conduce a la muerte del huésped.

Por medio del montaje de ácaros colectados de las epizootias en el campo, se constató que todos los estados del ácaro son susceptibles a la infección; los huevos fueron los únicos sobre los cuales nunca se observó signo de infección. No se observó transmisión transovarica del patógeno; los individuos obtenidos a partir de hembras infectadas se mantuvieron sanos y no presentaron signo alguno del patógeno.

Por medio de un ensayo durante el cual se proporcionaron condiciones similares a las de campo y se emplearon unos individuos momificados como inóculo inicial, se observó que una epizootia puede mantenerse por sí misma. El contagio se obtiene a través de tres generaciones. A medida que se reinfectan nuevos individuos, estos pueden propagar la enfermedad a la siguiente generación, dependiendo de las condiciones ambientales. Es importante anotar que en un ensayo de laboratorio con características iguales, en Brasil, la patogenicidad se perdió después de la segunda generación.

La velocidad de infección fue mayor a la menor temperatura probada (20°C) y a 24 y 28°C hubo mayor número de individuos infectados. A 32°C el porcentaje de población infectada fue menor, pero esto no prueba que el patógeno sea menos infeccioso a determinada temperatura. A 32°C el ciclo biológico de los tetranychidos se acelera y muchas veces ocurre la muerte natural de estos

antes de haberse expuesto al patógeno, mientras que a menores temperaturas el ciclo de los ácaros es más largo y da mayor oportunidad de infección.

Las condiciones ambientales pueden favorecer la invasión de los cadáveres de los tetranychidos por parte de patógenos secundarios. Los ácaros en estado de conidiogénesis son más susceptibles a la invasión de patógenos secundarios, que aquellos en estado de cristalización.

Las claves taxonómicas de los Entomophthoraceae se basan en la forma, tamaño, color y número de núcleos de las conidias primarias (King y Humber 1981); y a pesar de no tener una nomenclatura validada, es el carácter más aceptable. Luego se consideran las conidias adhesivas, la longitud de los capilares, la presencia o ausencia de rizoides, cystidias y esporas de resistencia.

Mediante el método de conidiogénesis diseñado en el laboratorio se determinó que si las conidias primarias presentan un incremento y un posterior decrecimiento en el tamaño, es muy riesgoso emitir un juicio en cuanto a la identificación taxonómica del patógeno, si no se conoce la edad de la conidia, o por lo menos se tiene un promedio del tamaño de conidias de diferentes edades. Es por esto que no se concluye en la ubicación taxonómica del patógeno de los tetranychidos, pues en una tabla de identificación de especies de *Entomophthora* suministrada por el Dr. R. Humber se podía ubicar el patógeno, en más de dos especies, dependiendo de la edad de las conidias.

Aunque las conidias secundarias y terciarias son más oscuras que las primarias, es necesario observar el proceso para poder determinar si la medición se hace sobre una conidia primaria, secundaria o terciaria, pues estas últimas son más pequeñas que

las primarias. Igualmente ocurre con los cuerpos hifales, pues cuando maduros, presentan formas irregulares y su desarrollo es igualmente proporcional al tamaño del cuerpo del ácaro, es decir que ácaros inmaduros presentan cuerpos hifales más pequeños que ácaros adultos momificados; y cuerpos hifales de machos momificados presentan menor longitud que los de hembras momificadas, por lo tanto la única medida de los cuerpos hifales que sirve como carácter taxonómico para la identificación de la especie, es la de aquellos que aún no se han dividido por fisión.

Las conidias primarias observadas al microscopio electrónico presentan una apariencia muy lisa en su estado joven en el conidióforo, posteriormente se tornan arrugadas y oscuras en el momento que van a ser liberadas (Fig. 1e). Estas conidias son disparadas alrededor del huésped y forman un halo hasta de 13 mm de diámetro. Este parámetro fue muy útil en los trabajos de inoculación de infección, pues los frascos de 2 cm de diámetro, con los cuales se trabajó, fácilmente se cubrieron de conidias, al colocar, en triángulo, tres individuos momificados y provocar la conidiogénesis; de esta manera se garantizó la presencia de inóculo de infección sobre toda el área por donde iban a caminar individuos sanos.

Las capiloconidias nacen redondas y sin disco adhesivo, en el extremo de los capilares de las conidias primarias, secundarias o terciarias; posteriormente se tornan ovaladas y desarrollan en su extremo distal el disco adhesivo. El capilar es más frágil en el extremo donde nace la conidia adhesiva, pues siempre se quiebra por este lado desprendiendo la capiloconidia.

El patógeno del ácaro verde de la yuca no presenta rizoides, cystidias, ni esporas de resistencia.

## CONCLUSIONES

- El hongo *Neozygites* sp. es el causante de la muerte de los ácaros de la especie *Mononychellus tanajoa* Bondar, bajo las condiciones estudiadas.

- Conocida la expresión completa de síntomas de la infección causada por el hongo *Neozygites* sp. y establecido el modelo de reinfección, es posible comenzar a probar un programa de infección del ácaro verde de la yuca mediante el empleo del patógeno.

- La identificación de una especie de *Neozygites* con base en la medición de estructuras del patógeno puede conducir a cometer errores, hasta tanto no se conozca la edad real de las estructuras y se establezca una clave de identificación más clara.

- La infección de los tetranychidos es transmitida por las capiloconidias del patógeno, estructuras que se originan a partir de las conidias primarias, secundarias o terciarias, mantenidas a una humedad relativa inferior al 65%; sin embargo, para que ocurra la conidiogénesis es necesario contar con una humedad relativa superior al 65% en el ambiente.

- No se observó que el patógeno *Neozygites* sp. infectara la especie *Typhlodromalus limonicus* (German y McGregor) (Phytoteiidae), el ácaro depredador más común en Colombia. Por consiguiente, el patógeno fungal debe tenerse en cuenta dentro del manejo integrado de ácaros tetranychidos.

## BIBLIOGRAFIA

- AGUDELO, P. 1986. A species of *Triplosporium* (Zygomycetes = Entomophthorales) infecting *Mononychellus progressivus* (Acari: Tetranychidae) in Venezuela. Florida Entomologist (Estados Unidos) v. 67 no. 2, p. 444-446.

- ALVAREZ, J.M. 1990. Estudios de patogenicidad de un hongo asociado con **Tetranychus urticae** (Koch) y **Mononychellus tanajoa** (Bondar), ácaros plaga de la yuca **Maninot esculenta** Crantz. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá. 113 p. (Tesis Ing. Agrónomo).
- BELLOTTI, A.C.; SCHOONHOVEN, A. van 1978. Mite and insect pests of cassava. Annual Review of Entomology (Estados Unidos) v. 23, p. 39-67.
- BYRNE, D.H. 1980. Studies of resistance to mites **Mononychellus tanajoa** Bondar and **Mononychellus caribbeanae** McGregor in cassava, **Maninot esculenta** Crantz. Cornell University, Itaca, N.Y. U.S.A. 174 P. (Thesis Ph.D.).
- CARRERA, R.I.; CACERES, I.; DOMINGUEZ, D. 1987. Estudio de dos especies de **Hirsutella** y sus hospedantes en el cultivo de la guayaba, **Psidium guajava**. Agrotecnia de Cuba v. 19 no. 1, p. 29-34.
- CARNER, G.R. 1976. A description of the life cycle of **Entomophthora** sp. in the twospotted spider mite. Journal of Invertebrate Pathology (Estados Unidos) v. 28, p. 245-254.
- ; CANERDAY, T.D. 1970. **Entomophthora** sp. as a factor in the regulation of twospotted spider mite on cotton. Journal of Economic Entomology (Estados Unidos) v. 63 no. 2, p. 638-640.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. 1991. Cassava Program. Annual Report. Entomology and Acarology. CIAT, Cali, Colombia. p. 1-25.
- DELALIBERA, I.; SOSA, D.R.; MORAES, G.J. de; ALENCAR, J.A. de; FARIAS, W. Infection of the spider mite **Mononychellus tanajoa** (Acari: Tetranychidae) by the fungus **Neozygites** sp. (Entomophthorales) in Northeast Brazil. (En prensa).
- DORESTE, E.; APONTE, O. 1979. Efecto de los ataques del complejo de ácaros Tetranychidae en los rendimientos del cultivo de la yuca. Revista de la Facultad de Agronomía Maracay (Venezuela) v. 10 nos. 1-4, p. 105-119.
- FISHER, F.E. 1951. An **Entomophthora** attacking the citrus red mite. Florida Entomologist (Estados Unidos) v. 34, p. 83-88.
- GARDNER, W.A.; DETTING, R.D.; STOREY, G.K. 1982. Susceptibility of the twospotted spider mite, **Tetranychus urticae** Koch, to the fungal pathogen **Hirsutella thompsonii** (Fisher). Florida Entomologist (Estados Unidos) v. 65 no. 4, p. 458-465.
- KING, D.S.; HUMBER, R.A. 1981. Identification of the Entomophthorales. In: Burges, H.D. (Ed.). Microbial control of pests and plant diseases. 1970-1980. Academic Press, New York. p. 107-127.
- NYIIRA, Z.N. 1982. Cassava Green Mite: Its distribution and possible control, in Rwanda. Proceedings of a workshop. Ottawa, Canada, International Development Research Centre I.D.R.C. p. 65-67.
- SABA, F. 1971. Population dynamics of some tetranychids in subtropical Florida. In: International Congress of Acarology, 3<sup>o</sup>, Prague. Proceedings. Dr. W. Junk, B.V., the Hague. p. 237-240.
- SMITH, J.W.; FURR, R.E. 1975. Spider mites and some natural control agents found on cotton in the delta area of Mississippi. Environmental Entomology (Estados Unidos) v. 4, p. 559-560.
- SMITLEY, D.R.; BROOKS, W.M.; KENNEDY, G.G. 1986. Environmental effects on production of primary and secondary conidia, infection and pathogenesis of **Neozygites floridana** a pathogen of the twospotted spider mite, **T. urticae**. Journal of Invertebrate Pathology (Estados Unidos) v. 43 no. 3, p. 325-332.
- ; -----; -----; 1986. Role of the entomogenous fungus, **Neozygites floridana**, in the population declines of the twospotted spider mite, **T. urticae**, on field corn. Entomologia Experimentalis et Applicata (Holanda) v. 41, p. 256-264.
- TSINTSADZE, K.V.; ZIL'BERMINTS, V.; VARTOPETOV, S.G. 1976. A natural focus of spider mite Entomophthorosis and feasibility of using this fungus for control of mites. Soviet Agriculture Sciences (Estados Unidos) v. 1, p. 27-28 (In Russian).
- VAN der GEEST, L.P.S. 1985. Pathogens of spider mites. Their biology, natural enemies and control. Vol. 1B, p. 247-258.
- ; SABELIS, M.W.; BAKKER, F.M. 1990. Evaluation of the Entomophthoraceous fungus **Neozygites** sp. as a control agent of the cassava green mite **Mononychellus tanajoa** Bondar. Propuesta de trabajo en estudio ante la Comisión de Comunidades Europeas (Science and Technology for Development) 7p.
- VEIGA, A.G.S.L. 1985. Aspectos bioecológicos e alternativas de controle de ácaro verde da mandioca. **Mononychellus tanajoa** (Bondar) (Acari: Tetranychidae) no estado de Pernambuco. Universida Sao Paulo, Sao Paulo. 138p. (Tesis de doctorado em Ciências Biológicas).
- WEISER, J. 1968. **Triplosporium tetranychii** sp.n. (Phycomycetes: Entomophthoraceae) a fungus infecting the red mite **Tetranychus althaeae** Hanstein. Folia Parasitologica (Checoslovaquia) v. 15, p. 115-122.
- ; MUMA, M.G. 1986. **Entomophthora floridana** n. sp. (Phycomycetes: Entomophthoraceae), a parasite of Texas citrus mite **Eutetranychus banksi**. Florida Entomologist (Estados Unidos) v. 49, p. 155-159.
- YANINEK, J.S.; HERREN, H.R. 1988. Introduction and spread of the cassava green mite, **Mononychellus tanajoa** Bondar (Acari: Tetranychidae), an exotic pest in Africa and the search for appropriate control methods: A Review. Bulletin of Entomological Research (Inglaterra) v. 78 p. 1-13.