



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

Coordinación de Estudios de Posgrado

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales

**SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Beauveria bassiana* (Bals.)
Vuill. Y *Metarhizium anisopliae* Metsch. Sorokin (ASCOMYCOTA:
HYPOCREALES) PATOGENICOS A GALLINA CIEGA
Phyllophaga polyphylla (Bates) (COLEOPTERA:
MELOLONTHIDAE) Y DISTRIBUCIÓN VERTICAL DE
ESPORAS EN DIFERENTES TIPOS DE SUELO**

Tesis

Que para obtener el grado académico de:

MAESTRA EN CIENCIAS

Presenta:

BIOL. LIZETH RAMONA CRUZ COTA

Director de Tesis:

DR. SAMUEL PINEDA GUILLERMO

Morelia, Michoacán, México, Agosto de 2010





UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

DR. HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

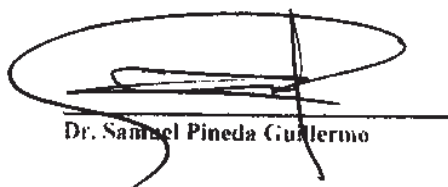
Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Y *Metarhizium anisopliae* Metsch. Sorokin (ASCOMYCOTA: HYPOCREALES) PATOGENICOS A GALLINA CIEGA *Phyllophaga polyphylla* (Bates) (COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE) Y DISTRIBUCIÓN VERTICAL DE ESPORAS EN DIFERENTES TIPOS DE SUELO" presentado por la BIOL. LIZETH RAMONA CRUZ COTA, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestra en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

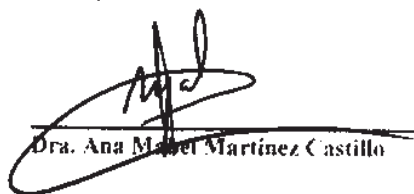
ATENTAMENTE

Morelia, Michoacán, a 06 de agosto de 2010

MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA


Dr. Samuel Pineda Guillermo


Dr. José Isaac Figueroa de la Rosa


Dra. Ana Marcel Martínez Castillo


Dr. Ariel Wilbert Guzmán Franco


M.C. Fernando Tamayo Mejía

DEDICATORIA

A **Dios** por permitirme cumplir uno más de mis objetivos profesionales y por demostrarme constantemente su compañía.

A mi padre **Hilario Cruz Martínez** por su amor, sabiduría y por enseñarme el valor de la tolerancia y la perseverancia.

A mi madre **Rosalba Cota Chávez** por su amor, apoyo y confianza, por enseñarme el camino al éxito y a andar erguido por la vida.

A mis hermanos **Aldo Hilario, Jesús Iván y César Augusto**, por ser en todos los sentidos, mi ejemplo a seguir.

A mi sobrina **Paola Alejandra**, por la alegría que irradia a los que la rodeamos.

A **Juan Pablo**, por aparecer en mi vida e inundarla de luz y amor.

A mis amigos de siempre, **Cecy, Lizeth M., Úrsula, Edwin, Alfredo y Magdiel**.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Instituto de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias por brindarme la oportunidad de cumplir satisfactoriamente mis estudios de maestría.

A CONACYT por el apoyo financiero otorgado para el desarrollo de la maestría.

A la Fundación Guanajuato Produce A. C. porque a través del proyecto 468/08 apoyó al desarrollo de este trabajo.

Se agradece a la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH, a través del proyecto “Parámetros de vida del enrollador de hojas de zarzamora, *Argyrotaenia montezumae* (Lepidoptera: Tortricidae) e identificación de su parasitoide *Colpoclypeus* sp.” del programa de investigación 2010, por contribuir al financiamiento de este trabajo.

Al Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, A. C. por todas facilidades proporcionadas para el cumplimiento de mis estudios de postgrado.

Al Laboratorio de Reproducción de Organismos Benéficos del CESAVEG y a su personal por todo el apoyo.

Al Dr. Samuel Pineda Guillermo por su acertada dirección en esta tesis.

Al MC. Fernando Tamayo Mejía por el apoyo incondicional que siempre me ha brindado y por sus valiosas aportaciones.

A la Dra. A. Mabel Castillo Martínez, Dr. Ariel W. Guzmán Franco y al Dr. Isaac Figueroa De la Rosa, por sus revisiones al escrito y orientación académica.

Al Biólogo Antonio Marín Jarillo, por su apoyo en la identificación de la especie objeto de estudio.

Al Ing. Sandoval Villanazul, por haber creído siempre en mí, gracias Ed por todo el apoyo.

Al Ing. Jaime Antonio Hernández Ocampo por su amistad, compañerismo y apoyo en la realización de este trabajo.

A los Biólogos Jesús Alfredo Ortega Castro y Josué Escobar Sarabia, por todo el apoyo brindado en la realización del presente trabajo en la fase de laboratorio y campo. Por hacer más ameno desarrollo de este estudio.

A Pablo Ramírez Corona, por su amistad y apoyo incondicional.

A Patricia Liliana Cerritos Barriga., por todo el apoyo brindado durante la maestría.

A la familia Trejo Soto, productores amigos de la comunidad de San Lorenzo, Jerécuaro, Gto., que apoyaron incondicionalmente a la realización de este estudio.

CONTENIDO

	PAG.
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE CUADROS	ii
I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	3
III. INTRODUCCIÓN	5
IV. ANTECEDENTES	6
4.1. El complejo gallina ciega	6
4.2. El género <i>Phyllophaga</i> spp.	7
4.2.1. Ubicación taxonómica	8
4.2.2. Ciclo biológico de <i>Phyllophaga</i> spp.	8
4.2.2.1. Huevo	9
4.2.2.2. Larva	9
4.2.2.3. Pupa	11
4.2.2.4. Adulto	12
4.3. Tipos de control	12
4.3.1. Control cultural	12
4.3.2. Control químico	13
4.3.3. Control biológico	13
4.3.3.1. Parasitoides y depredadores	13
4.3.3.2. Entomopatógenos	14
4.3.3.2.1. Bacterias	14
4.3.3.2.2. Nemátodos, rickettsias y virus	15
4.3.3.2.3. Hongos	15
4.3.3.2.3.1. <i>Beauveria bassiana</i>	15
4.3.3.2.3.2. <i>Metarhizium anisopliae</i>	17
4.3.3.2.3.3. Modo de acción de los hongos entomopatógenos	19
4.3.3.2.3.4. Características físicas del suelo que	22

afectan a los hongos entomopatógenos

V. JUSTIFICACIÓN	25
VI. HIPÓTESIS	26
VII. OBJETIVOS	27
7.1. Objetivos generales	27
7.1.1. Objetivos específicos	27
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	28
8.1. Obtención de aislamientos de hongos entomopatógenos	28
8.2. Obtención de cultivos monospóricos	29
8.3. Mantenimiento de gallina ciega e identificación de la especie	30
8.4. Selección de los aislamientos más virulentos	30
8.5. Distribución vertical de esporas de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> en suelos con diferente contenido de arena y humedad	34
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
9.1. Aislamientos de hongos entomopatógenos obtenidos y cultivos monospóricos	39
9.2. Identificación de la especie de gallina ciega	41
9.3. Selección de los aislamientos más virulentos	43
9.4. Distribución vertical de esporas de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en suelos con diferente contenido de arena y humedad	46
9.4.1. Profundidad máxima de penetración	46
9.4.2. Distribución vertical de esporas de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en el perfil de suelo.	48
X. CONCLUSIONES	57
XI. BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE FIGURAS

	PAG.
Figura 1. Ciclo de vida de la gallina ciega, <i>Phyllophaga</i> sp.	10
Figura 2. Adulto macho de <i>P. polyphylla</i> y su genitalia.	42
Figura 3. Profundidad máxima de penetración alcanzada por la aplicación de la solución con esporas de <i>B. bassiana</i> en suelos con diferente contenido de humedad.	47
Figura 4. Profundidad máxima de penetración alcanzada por la aplicación de la solución con esporas de <i>M. anisopliae</i> en suelos con diferente contenido de humedad.	48

ÍNDICE DE CUADROS

	PAG.
Cuadro 1. Aislamientos monospóricos de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> evaluados contra <i>P. polyphylla</i> .	32
Cuadro 2. Características generales de los suelos utilizados en los ensayos.	36
Cuadro 3. Aislamientos de hongos entomopatógenos provenientes de larvas de gallina ciega en diversas localidades del estado de Guanajuato.	40
Cuadro 4. Porcentajes de mortalidad obtenidos por diferentes aislamientos de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en larvas del tercer estadio de <i>P. polyphylla</i> .	44
Cuadro 5. Profundidad máxima de penetración (cm) de las soluciones con esporas de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en suelos con diferente contenido de humedad.	46
Cuadro 6. Unidades formadoras de colonia de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en suelos con diferentes contenido de humedad.	50
Cuadro 7. Unidades formadoras de colonia de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en diferentes profundidades del suelo con distinto contenido de humedad.	52
Cuadro 8. Unidades formadoras de colonia de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> registradas en las interacciones entre el tipo de suelo y la profundidad a diferente contenido de humedad.	54

I. RESUMEN

Los hongos entomopatógenos son una alternativa promisorio para el control de plagas agrícolas. En este estudio, se obtuvieron diversos aislamientos nativos de estos microorganismos provenientes de larvas de gallina ciega del género *Phyllophaga* sp., una de la plagas más importantes del cultivo de maíz en el estado de Guanajuato. En total se obtuvieron 16 aislamientos de hongos entomopatógenos, de los cuales ocho pertenecen a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. y el resto a *Metarhizium anisopliae* Metsch. Sorokin (Ascomycota: Hypocreales). También se evaluó la virulencia de 11 aislamientos; seis de *B. bassiana* (BB35, BB37, BB38, BB39, BB42 y BB44) y cinco de *M. anisopliae* (MA20, MA23, MA24, MA25 y MA28, éste último proveniente de una cepa comercial) sobre larvas de tercer estadio de *Phyllophaga polyphylla* (Bates) (Coleoptera: Melolonthidae). Las larvas se expusieron a través del método de inmersión a la concentración de 1×10^8 conidios/mL de cada aislamiento. Las mortalidades causadas a los 42 días después del tratamiento estuvieron comprendidas entre 10-17% y 10-18% en los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre la mortalidad causada por los aislamientos de ambas especies de hongos entomopatógenos. En la segunda parte de esta investigación, se evaluó la distribución vertical de las esporas de los aislamientos BB02 y MAC06 de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, respectivamente, en suelos con diferentes características físicas y con tres contenidos de humedad (0, 5 y 10%) colectados en el estado de Guanajuato. Se utilizaron tres suelos, dos de éstos provienen del municipio de Jerécuaro (Jer 1 y Jer 2) y el tercero del municipio de Comonfort (Comonfort). Las suspensiones de ambos aislamientos utilizados alcanzaron la mayor profundidad

(entre 4.9-6.25 cm y 4.77-5.80 cm para los aislamientos BB02 y MAC06 de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, respectivamente) cuando los tres suelos contenían el mayor porcentaje de humedad (10%). También se encontró una relación inversa entre el contenido de arcilla y la profundidad de penetración de las soluciones de los hongos. Sin embargo, se observó una relación directa entre el contenido de arena y la profundidad de penetración alcanzada. En suelos con mayor contenido de limo, conductividad eléctrica y capacidad de intercambio catiónico se encontró mayor número de unidades formadoras de colonias (UFCs), pero cuando se incrementó la profundidad de muestreo, la cantidad de éstas disminuyó. Por último, en los suelos con menor contenido de arena hubo una distribución vertical más uniforme de UFCs.

II. ABSTRACT

Entomopathogenic fungi are a promising alternative for the control of agricultural pests. In this study, we obtained several native isolates infecting white grub larvae from the genus *Phyllophaga*, one of the most important pests of maize crop in Guanajuato state. Sixteen isolates of entomopathogenic fungi were obtained, eight from *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and the remaining from *Metarhizium anisopliae* Metsch. Sorokin (Ascomycota: Hypocreales). We also evaluated the virulence of 11 isolates, six of *B. bassiana* (BB35, BB37, BB38, BB39, BB42 and BB44) and five of *M. anisopliae* (MA20, MA23, MA24, MA25 and MA28) against third instar larvae of *Phyllophaga polyphylla* (Bates) (Coleoptera: Melolonthidae). Larvae were immersed in a 1×10^8 conidia/mL suspension of each isolate. The mortality caused after 42 days of incubation were between 10-17% and 10-18% for the isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae*, respectively. No significant differences were observed amongst mortality caused by all isolates from both entomopathogenic fungi species. Additionally, we assessed the vertical movement of conidia from two isolates, one from each fungal species (*B. bassiana* and *M. anisopliae*), in soils with different physical characteristics, under three humidity regimes (0, 5 and 10%) collected in Guanajuato state. Suspension from both isolates reached a maximum depth when the three soils contained the largest humidity percentage (10 %). We also found an inverse relationship between clay content and depth of penetration of fungi solutions. However, there was a proportional relationship of sand content with the depth reached by the fungi suspension. In soils with larger silt content, electrical conductivity and cation exchange capacity, the number of colony forming units (UFCs) was greater, but when the sampling depth increased, the number of colonies

decreased. Finally, the vertical distribution of UFCs was more uniform in soils with lower sand content.

III. INTRODUCCIÓN

Los cultivos agrícolas se ven afectados por diversos factores bióticos y abióticos que merman considerablemente la calidad y el rendimiento de su producción. Dentro de los factores bióticos se encuentran las enfermedades y los insectos plaga que atacan determinadas secciones vegetativas de las plantas tales como follaje, frutos o raíces. Las gallinas ciegas del género *Phyllophaga* sp. (Coleoptera: Melolonthidae) son las plagas rizófagas más importantes en diversas plantas cultivadas (Morón, 1994). En el estado de Guanajuato, estos insectos se encuentran distribuidos principalmente en los municipios de Jerécuaro, Acámbaro, Tarandacuao, Pénjamo, Comonfort y Manuel Doblado (Anónimo, 2006). Debido a sus hábitos subterráneos, las gallinas ciegas son de difícil detección hasta que sus daños demandan el uso inmediato de acciones o tratamientos curativos (Jackson et al. 2000). La amplia diversidad de hospederos, su ciclo de vida prolongado y sus hábitats edáficos, convierten a estos insectos en uno de los principales problemas fitosanitarios.

Con el fin de reducir el impacto ambiental derivado de la aplicación de insecticidas químicos, surge la necesidad de investigar alternativas ecológicamente viables y efectivas para el control de gallinas ciegas. Una opción promisoría es el control biológico mediante el uso de los hongos entomopatógenos, ya que estos agentes tienen la capacidad de atacar a todos los estados de vida de estas plagas. Considerando que el suelo es el hábitat natural de la plaga y es además el reservorio natural más importante de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Bálsamo), *B. brongniartii* (Saccardo) y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) (Rath, 1992; Keller et al. 1999), podría evaluarse su potencial como agentes de control natural.

IV. ANTECEDENTES

4.1. El complejo gallina ciega

Dentro de la superfamilia Scarabaeoidea o Lamellicornia se encuentra el complejo gallina ciega, el cual está conformado por 810 especies; de las cuales 60, 80 y 670 pertenecen a las familias Cetonidae, Scarabaeidae y Melolonthidae, respectivamente (Morón, 2010). Según las regiones étnicas de México, el estado adulto de estos insectos reciben los nombres de escarabajos sanjuaneros, mayates, ronrones, temoles, habas, frailecillos, toritos, chimayates, chochos, cargga-tu-tata, temayates, x-kumuk, pipioles, chimol, jicotes, taches, abejones, rodadores, x-kuclinta, vaqueros o tecuitlaololos. En el estado de Guanajuato a los adultos también se les conoce como mayates de junio, pipiolas, zumbas y pozoles (Marín, 2001a). Las larvas de las gallinas ciegas reciben los nombres comunes de gusano blanco, gallina ciega, nixticuil, kolom, rosquilla o tinoco (Morón, 1984, 2003, 2004; Morón et al. 1997, citados por Morón, 2010).

El daño ocasionado por las gallinas ciegas en el cultivo de maíz se asocia con el amarillamiento, acame y muerte de las plántulas debido al carente desarrollo del sistema radicular, lo que trae como consecuencia reducción en la producción de grano (Nájera et al. 2005). Los daños que causan las gallinas ciegas generalmente se observan en el periodo comprendido de junio a septiembre y muy característicamente en manchones dentro de los cultivos.

Durante los meses de mayo a septiembre de los años 1998, 1999 y 2000 se realizaron capturas con trampas de luz en el estado de Guanajuato y se observó que los géneros más abundantes de gallina ciega fueron *Phyllophaga* spp., en mayor proporción, *Cyclocephala* spp. y *Anomala* spp. En esas colectas, las especies

capturadas del género *Phyllophaga* con importancia agrícola fueron: *Phyllophaga ravid*a (Blanchard), *P. vetula* (Horn), *P. misteca* (Bates), *P. obsoleta* (Blanchard), *P. brevidens* (Bates), *P. setifera* (Burmeister), *P. porodera* (Bates) y *P. polyphylla* (Bates) (Marín, 2001a, 2001b; Marín y Bujanos, 2008).

4.2. El género *Phyllophaga* spp.

En México existen 369 especies del género *Phyllophaga* distribuidas en las 32 entidades federativas y agrupadas en los subgéneros *Chlaenobia*, *Chirodines*, *Phytalus*, *Phyllophaga*, *Tostegoptera*, *Eugastra*, *Triodonyx* y *Listrochelus* (Morón, 2003). Este autor menciona que las especies de importancia agrícola constituyen el 5 % del total de especies reportadas y con frecuencia causan daños a las partes subterráneas de los cultivos de maíz, caña de azúcar, frijol, cacahuate, chile, cebolla, arroz, haba, sorgo, col, papa, alfalfa, jícama, amaranto, cafeto, estatis y pastos ornamentales.

Los adultos del género *Phyllophaga* se caracterizan por presentar labro profundamente emarginado; metaepímero y metaepisterno pequeños, estrechos o ausentes; los esternitos visibles están fusionados mesialmente y en la mayoría de las especies conservan las líneas suturales; aparato copulador masculino complejo, con edeago generalmente provisto de estructuras esclerosadas; propigidio no fusionado con el quinto esternito; pigidio proporcionalmente grande; coxas anteriores transversales y poco prominentes; mesotibias con carinas o proyecciones dentiformes en la parte media externa y generalmente sin espinas en el borde laterodorsal. Las larvas de tercer estadio se caracterizan por presentar la cabeza sin manchas oculares, la epifaringe provista con zygum y epizygum; los dientes

estriduladores de la maxila cortos y truncados; haptomerum con más de cinco heli; plegmata presente; los lóbulos de la placa respiratoria rodean la bulla; palidia generalmente presente; abertura anal en forma de “Y” o “V”; labio anal inferior sagitalmente hendido o surcado; uñas metatorácicas muy pequeñas en comparación con las precedentes (Ritcher, 1966, citado por Morón, 1986).

4.2.1. Ubicación taxonómica

Taxonómicamente, el género *Phyllophaga*, se clasifica de la siguiente forma (Morón, 1986).

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Superclase: Mandibulata

Clase: Insecta

Orden: Coleoptera

Familia: Melonhidae

Subfamilia: Melolonthinae

Género: *Phyllophaga*

4.2.2. Ciclo biológico de *Phyllophaga* spp.

Las especies del género *Phyllophaga* spp. presentes en el territorio mexicano demuestran una gran capacidad de adaptación, lo que les ha permitido colonizar casi todos los ambientes desde el nivel del mar hasta los 3500 m de altitud. El ciclo de vida de *Phyllophaga* spp. varía desde seis meses hasta tres años (Morón, 1986).

4.2.2.1. Huevo

Generalmente, los huevecillos de *Phyllophaga* spp. son depositados durante el final de la primavera o principio del verano en el suelo húmedo y bajo la sombra de las plantas huésped o en zonas de alta concentración de materia orgánica a una profundidad de 10 a 20 cm esparcidos en un área de 20 cm². El número de huevecillos ovipositados varía dependiendo de la especie; pueden ser desde siete hasta 28 (Morón, 1986). Los huevecillos presentan una coloración blanca lechosa y son de forma oval-alargada, miden aproximadamente 2.5 mm (Figura 1). Conforme se desarrolla el embrión, se puede observar, a través del corion, las mandíbulas de color amarillo rojizo de las larvas noenatas (Aragón, 2004). La eclosión de las larvas ocurre en un periodo de dos a seis semanas después de la oviposición (Morón, 1986).

4.2.2.2. Larva

Las larvas de las gallinas ciegas son escarabiformes (cuerpo en forma de "C"), con pubescencia color café rojiza y con numerosos pliegues transversales en todos los segmentos que le dan aspecto arrugado, excepto en el último de ellos en cuya parte ventral destaca una indentación o arruga (*raster*) con palidia -estructura importante para la determinación de géneros y especies- (Figura 1) (Morón, 1986). Las larvas del género *Phyllophaga* sp. presentan el labio anal inferior hendido en la parte media con alcance variable y la abertura anal angulada centralmente formando una Y. La cabeza de las larvas es de color amarillo, anaranjado o castaña-rojizo y las patas amarillentas, constituidas por cuatro artejos (Morón, 1986).



Huevecillo



Larva del tercer estadio



Pupa



Adulto

Figura 1. Ciclo de vida de la gallina ciega, *Phyllophaga* sp.

Las larvas de primer estadio se alimentan activamente de raíces finas, tallos blandos subterráneos, bulbos o materia orgánica durante un período de 20 a 60 días, aumentando su peso inicial de 10 a 15 veces. En el segundo estadio, las larvas incrementan de 5 a 7 veces su biomasa en el transcurso de 30 a 60 días. Las larvas pasan al tercer estadio durante los meses de agosto a octubre, miden entre 15 y 70 mm de longitud y de 3 a 10 mm de anchura torácica; son de color blanco con tonalidades crema, amarillo e incluso gris. El tercer estadio larval es el más longevo y voraz, tiene una duración de entre 4 a 14 meses, dependiendo de la región climática (Morón, 1986; Marín, 2002).

4.2.2.3. Pupa

A finales del otoño, o durante la siguiente primavera, las larvas de tercer estadio construyen una celda o cámara ovoide, compactando con sus excrementos las partículas de suelo que le rodean a una profundidad de 15-20 cm. En esta cámara pupal, las larvas expulsan todo el contenido de su aparato digestivo y se transforman como prepupas una o dos semanas antes de la ecdisis que da origen a la pupa. Dependiendo de la especie, la etapa de pupa transcurre en un periodo de 30 a 45 días en el otoño o en la primavera para dar lugar al imago o adulto (Morón, 1986).

La pupa es exarata con dimensiones de 19 a 20 mm de longitud y de 8 a 9 mm de anchura a nivel de los élitros (Figura 1). Es de color amarillo brillante con detalles anaranjados o rojizos en los bordes de las extremidades. Con la cabeza claramente definida, inclinada hacia abajo (Marín, 2002; Aragón y Morón, 2004).

4.2.2.4. Adulto

Los adultos de gallinas ciegas, *Phyllophaga* sp., permanecen dentro de la cámara pupal mientras se lleva a cabo la maduración sexual. Este tiempo coincide con el incremento de la humedad y temperatura, factores importantes para que estos insectos puedan realizar sus primeras actividades en el exterior. En condiciones naturales, la longevidad de los adultos varía entre 8 y 30 días, aún cuando las hembras de algunas especies pueden sobrevivir más de dos meses (Morón, 1986).

La forma del cuerpo de los adultos de las gallinas ciegas varía en proporciones dentro de un contorno ovalado-alargado con una subsección subcilíndrica. La coloración superficial es pardo-amarillenta o pardo-rojiza, aunque incluye toda una gama de tonos que abarcan el castaño oscuro, castaño rojizo, amarillo-pajizo y pardo-acanelado (Figura 1). Algunas especies de gallinas ciegas son de color negro e incluso existen otras que presentan coloración metálica iridiscente tenue (Morón, 1986; Marín, 2002).

4.3. Tipos de control

4.3.1. Control cultural

Una práctica muy común para el control de los insectos plaga que se encuentran en el suelo es el barbecho oportuno. Esta práctica cultural se debe de realizar inmediatamente después de la cosecha de los cultivos con la finalidad de exponer a las larvas a la intemperie y que sean consumidas por aves y otros animales o mueran por las temperaturas bajas del invierno. Esta práctica resulta efectiva contra diversas especies de gallinas ciegas, pero no para diabroticas, *Diabrotica* spp., ya que aunque también son plagas del suelo, éstas generalmente

pasan el invierno como huevecillos y no como larvas (García et al. 1987; Magallanes y García, 1988).

4.3.2. Control químico

El control convencional de las gallinas ciegas se realiza tradicionalmente con insecticidas químicos. Sin embargo, este tipo de control no siempre representa la mejor alternativa. Los insecticidas tales como clorpirifós, diazinón, ethoprop, terbufós, aldicarb, carbaril, carbofurán y endosulfán pueden tener una eficiencia mediana o nula dependiendo del método, época y condiciones de aplicación (Nájera, 1993). Asimismo, el uso de insecticidas sintéticos tiene como consecuencia la contaminación del suelo y agua, reducción de la fauna benéfica asociada a la rizósfera, además de provocar diversos daños en la salud de los agricultores (Bejarano, 2004).

4.3.3. Control biológico

Al igual que la mayoría de los insectos, las gallinas ciegas son atacadas por una gran diversidad de enemigos naturales entre los que se encuentran depredadores, parasitoides y agentes entomopatógenos.

4.3.3.1. Parasitoides y depredadores

Entre los insectos parasitoides de larvas de *Phyllophaga* spp. se encuentran las avispas de los géneros *Tiphia* (Hymenoptera: Tiphidae), *Campsomeria* (Hymenoptera: Scoliidae), *Scolia* (Hymenoptera: Scoliidae) y *Pelecinus* (Hymenoptera: Pelecinidae); las moscas de los géneros *Dexia*, *Microphthalma*,

Ptlotodexia, *Eutrixia* y *Criptomeigenia*, todos de la familia Tachinidae (Islas, 1964; Berberet y Helms, 1970; Richards y Davies, 1977; Lim et al. 1981, citados por Morón, 1986). Entre los insectos depredadores de larvas y adultos del género *Phyllophaga* spp., se encuentran los coleópteros de los géneros *Calosoma* sp., *Chlaenius* sp., *Scaphhinotus* sp., *Harpalus* sp., *Carabus* sp., *Asgonum* sp., *Evarthrus* sp. y *Pterostichus* sp., todos de la familia Carabidae, y las larvas de los dípteros de los géneros *Asilus* sp. y *Diogmites* sp., ambos de la familia Asilidae (Morón, 1986).

4.3.3.2. Entomopatógenos

Dentro de los enemigos naturales de gallinas ciegas se encuentran los organismos entomopatógenos, los cuales son los más utilizados para su control a nivel mundial (Klein et al. 2007). Dos de los atributos que reúnen estos agentes para ser considerados como buenos candidatos en el control de estas plagas son su persistencia y alta especificidad (Jackson, 2003).

4.3.3.2.1. Bacterias

Entre las bacterias que atacan a los estados larvales de individuos de la superfamilia Scarabaeoidea se encuentran *Bacillus thuringiensis* subs. *japonensis* cepa buibui aislada en Japón, la cual ha demostrado tener buena actividad contra *Popillia japonica* Newman, *Anomala orientalis* Waterhouse y *Cotinis nitida* L. (Alm et al. 1997, citado por Klein et al. 2007). Otras bacterias entomopatógenas que son comunes en el suelo son *Paenibacillus* (= *Bacillus*) *popilliae*, causante de la enfermedad lechosa en las larvas de *P. japonica*, *Ataenius spretulus* Haldeman y

Cyclocephala spp. y *Serratia* spp. agente causal de la enfermedad ámbar en *Costelytra zealandica* White (Alm et al. 1997, citado por Klein et al. 2007).

4.3.3.2.2. Nemátodos, rickettsias y virus

Los nemátodos entomopatógenos que atacan a gallinas ciegas se encuentran en los géneros *Steinernema* spp. y *Heterorhabditis* spp. También se ha encontrado a la rickettsia *Rickettsiella melolonthae* y al virus del grupo *Vagoiavirus* atacando células del cuerpo graso de las larvas de *P. japonica* (Weiser, 1977; Coppel y Mertins, 1977, citados por Morón, 1986; Klein et al. 2000).

4.3.3.2.3. Hongos

Los hongos entomopatógenos registrados sobre diferentes especies de gallinas ciegas son *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *M. anisopliae* y *Cordyceps ravenelli* Berk y Curtis (Morón, 1986; Klein et al. 2007). En general, los hongos entomopatógenos son fáciles de producir y de aplicar en campo. Esto los ha convertido en los agentes de control microbiológico de gallinas ciegas más utilizados en condiciones de campo, representando con ello una alternativa ecológica y eficiente. Por ejemplo, en condiciones naturales, se observó que los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* causaron 24 y 95% de mortalidad, respectivamente, en larvas de *Phyllophaga* spp. (Poprawski y Yule, 1991).

4.3.3.2.3.1. *Beauveria bassiana*

Este hongo entomopatógeno fue el agente causal de la primera enfermedad ocasionada por microorganismos que se registró en insectos, específicamente en el

gusano de seda (Tanada y Kaya, 1993), y a la que se le dio el nombre de “*mal del segno*”, “*calcinaccio*” o “*cannellino*” en Italia o “*muscardina blanca*” en Francia. Este microorganismo ocasionó pérdidas importantes en la producción de seda en el sureste de Europa durante los siglos XVIII y XIX (Ainsworth 1973, citado por Rehner y Buckley, 2005). Dentro del grupo de los hongos entomopatógenos, el género *Beauveria* es uno de los más conocidos a nivel mundial (Ferron, 1978) y se caracteriza por producir conidios unicelulares, hialinos, globosos, elipsoidales o incluso reniformes y dispuestos en forma de zig-zag sobre el raquis o esterigma (Poinar y Thomas, 1978; Tanada y Kaya, 1993; Rehner y Buckley, 2005).

La identificación de especies del género *Beauveria* se ha complicado por la proliferación de los nuevos registros realizados a finales del siglo XIX y mediados del siglo XX, los cuales son morfológicamente diferentes a las especies inicialmente descritas. Morfológicamente, los conidios son la principal característica utilizada para identificar especies y en el caso de *B. bassiana*, éstos tienen la disposición en el raquis de manera típica a la que se registra en el género, los conidios son hialinos, globosos o sub globosos, algunas veces rosados o grises y su tamaño es menor a 3.5 µm, el conidióforo es liso, transparente y las cadenas conidiales son usualmente largas. El reverso de la colonia es de color amarillo pálido (Samson et al. 1988; Humber, 1997; Humber, 1998; Rehner y Buckley, 2005).

El género *Beauveria* es la fase asexual o anamorfa del género *Cordyceps* (Rehner y Buckley, 2005). Sin embargo, la clasificación actual de los hongos se ha basado en las estructuras reproductivas sexuales o teleomorfos, por lo que el género se ha ubicado dentro del Phylum Ascomycota y familia Clavicipitaceae (Sung et al.

2007; Hibbett et al. 2007; Blackwell, 2010), aunque algunos autores ubican a este género dentro de la familia Cordycipitaceae (Humber, 2007).

Con los avances recientes de las técnicas de biología molecular, la taxonomía de los hongos entomopatógenos se ha modificado en los últimos años, de tal forma que la identificación actual de este grupo de hongos, se ha desarrollado ampliamente utilizando marcadores moleculares (Driver et al. 2000; Sung et al. 2007; Hibbett et al. 2007; Roy et al. 2010).

4.3.3.2.3.2. *Metarhizium anisopliae*

Esta especie de hongo tiene un amplio rango de hospederos y, al igual que *B. bassiana*, se encuentra ampliamente distribuido alrededor del mundo (Tanada y Kaya, 1993). Esta especie, denominada “*muscardina verde*”, fue identificada atacando al frailecillo de los cereales *Anisoplia austriaca* Herbst y junto con el gorgojo de la raíz de la remolacha, *Cleonus punctiventris* Germar, fueron las dos especies de insectos donde primero se realizaron los experimentos de infección (Zimmermann, 1993).

Las colonias de *M. anisopliae* son de color blanco cuando están jóvenes, y cuando maduran, se tornan de un color verde oscuro. Los conidióforos son ramificados y el conidio inicial se forma por la constricción de la parte distal del conidióforo. Posteriormente, se forma una cadena de conidios sobre cada conidióforo dando lugar, después, a la formación de masas densas de cadenas de conidios, también de color verde, que a su vez forman una serie de columnas. *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, se caracteriza por tener conidios cortos, con un tamaño de 3.5 a 9 μm y *M. anisopliae* var. *major* tiene conidios de 9 a 18 μm (Tanada y Kaya,

1993), aunque Zimmermann (1993), reporta un tamaño de 5 a 8 μm para la primera variedad y de 10 a 14 μm para la segunda.

Actualmente se considera que *M. anisopliae* cuenta con un complejo de variedades (Bischoff et al. 2009), mismas a las que Driver et al. (2000), ha caracterizado molecularmente e identificado como *M. anisopliae* vars. *acridum*, *lepidiotum*, *anisopliae* y *majus*.

El género *Metarhizium*, es la fase anamorfa o asexual del género *Metacordyceps* (Sung et al. 2007) y la clasificación taxonómica es similar a la presentada para el género *Beauveria*. Algunos autores como Humber (2007) y Sung et al. (2007) ubican a este género dentro de la familia Clavicipitaceae aunque otros como Jaronski y Jackson (2008) lo reportan dentro de la familia Nectriaceae.

Beauveria bassiana y *M. anisopliae* han sido reclasificados taxonómicamente en los últimos años de la siguiente forma (Sung, 2007; Hibbett et al. 2007; Jaronski y Jackson, 2008; Humber, 2008; BayScience Foundation, 2009).

Dominio: Eucariota

Reino: Fungi

Subreino: Dikarya

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Familia: Nectriaceae

Género: Beauveria

Género: Metarhizium

Especie: *B. bassiana* (Bals.) Vuill. 1912.

Especie: *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin 1983

4.3.3.2.3.3. Modo de acción de los hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos infectan a todos los estados de vida de los insectos de prácticamente todos los órdenes. La especificidad de estos microorganismos varía considerablemente; en algunos casos, tienen un amplio rango de hospederos, pero en otros pueden infectar a pocas o a una sola especie de insecto (Tanada y Kaya, 1993).

El modo de infección de los hongos entomopatógenos, frecuentemente es diferente dependiendo de la especie de hongo y del insecto (Ferron, 1978). Generalmente, el proceso de infección puede ser dividida en las siguientes fases: adhesión y germinación de las esporas en la cutícula, penetración del integumento y desarrollo de la micosis que conduce a la muerte del insecto (Tanada y Kaya, 1993).

a) Adhesión y germinación de las esporas

El contacto de las esporas de los hongos con el integumento de los insectos, es la vía más frecuente de infección, aunque también puede ser a través de partes bucales o tracto intestinal (Ferron, 1978). La adhesión de las esporas a la cutícula del insecto es un proceso pasivo. En los hongos Entomophthorales está presente una sustancia mucilaginosa, pero en los hongos considerados anteriormente en la clase

Deuteromycete, el proceso no está claro (Tanada y Kaya, 1993). Samson et al. (1988), mencionan que durante la adhesión las esporas pueden estar incluidas fuerzas electrostáticas e interacciones moleculares. Una vez que la espora se ha adherido al insecto, se produce un tubo germinativo que penetrará la cutícula del hospedero y refuerza la adhesión del hongo a la cutícula del insecto. Las esporas de los hongos tales como *M. anisopliae* y *B. bassiana* forman una estructura llamada apresorio cubierta con una capa mucilaginosa para facilitar la penetración. Esta capa mucilaginosa también se ha encontrado en hongos que no forman apresorio, tales como *Nomuraea rileyi* (Samson et al. 1988).

b) Penetración de integumento

El modo de penetración de los hongos entomopatógenos depende de las propiedades de la cutícula, tales como su grosor, melanización y presencia de sustancias nutricionales y antifúngicas. El proceso de penetración de una hifa a través del integumento de los insectos incluye fuerzas físicas y químicas o enzimáticas. Las enzimas comúnmente encontradas en este proceso son lipasas, proteasas, quitinasas, aminopeptidasas y esterases. El papel de las enzimas no sólo se limita a degradar la cutícula de los insectos, sino que también producen monómeros que pueden ser metabolizados por el tubo germinativo y con ello continúan creciendo a través del integumento. En algunos casos, este proceso de infección no es exitoso porque el hongo no puede degradar el integumento. Esto se debe al incremento en la actividad de las fenoloxidasas, las cuales oxidan los fenoles disponibles y reactivan quinonas, originando que las melaninas se depositen alrededor del tubo germinativo (Samson et al. 1988; Tanada y Kaya, 1993). La

habilidad de los hongos entomopatógenos para digerir grandes cantidades de quitina, ha sido una característica que se ha utilizado para ubicarlos taxonómicamente (Humber, 2008).

c) Desarrollo de la micosis

Después de que el hongo ha penetrado el integumento del insecto y se ha introducido al hemocele, se producen cuerpos hifales levaduriformes, esencialmente blastosporas, hifas y protoplastos de pared delgada. La dispersión a través del hemocele y la invasión de tejidos varía de acuerdo con la especie de hongo. Los hongos entomopatógenos pueden evitar las defensas inmunes de los insectos desarrollando protoplastos, los cuales no son reconocidos por los hemocitos. Además de la producción de micotoxinas, las que finalmente matan al insecto (Ferron, 1978), otra forma de evitar el sistema inmune de los insectos es a través de la formación de cuerpos hifales levaduriformes que se dispersan y multiplican rápidamente, (Samson et al. 1988; Tanada y Kaya, 1993). Los componentes tóxicos que se han aislado e identificado en algunos hongos entomopatógenos son ciclodepsipéptidos tales como las destruxinas A, B, C y D, así como la desmetildestruxina B, beauvericina, beauverolides, bassianolides, oosporein, cyclosporin A y ácido oxálico (Ferron, 1978; Ownley et al. 2010).

Con la muerte del hospedero, termina la fase parasítica del hongo e inicia la fase saprofítica, durante la cual el micelio continúa desarrollándose y produce sustancias antibióticas para la flora bacteriana intestinal del insecto. Si las condiciones ambientales son favorables, el hongo crece fuera del cuerpo del hospedero y se desarrollan estructuras conidiógenas, pero si existen condiciones climáticas

desfavorables, los hongos producen estructuras de resistencia tales como clamidosporas, zygosporas u oosporas, las cuales permiten que el hongo sobreviva bajo condiciones adversas (Samson et al. 1988).

Finalmente, se ha documentado que los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *Lecanicillium sp.* pueden parasitar a los hongos fitopatógenos de los géneros *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Fusarium* a través de mecanismos de antibiosis, competencia y micoparasitismo. También se ha registrado un crecimiento endofítico que les otorga amplias ventajas para utilizarse como agentes de biocontrol de enfermedades (Ownley et al. 2010).

4.3.3.2.3.4. Características físicas del suelo que afectan a los hongos entomopatógenos

La infección y dispersión de las enfermedades en las poblaciones de insectos en el suelo, es afectada por diversos factores biológicos, además de los factores físicos como la textura, estructura, contenido de agua, gases, temperatura y pH (McCoy et al. 1992 y Barbercheck, 1992). Al respecto, Barbercheck (1992) realizó una revisión a detalle del efecto que pueden tener estos factores físicos sobre los agentes de control biológico, particularmente sobre los hongos entomopatógenos.

Textura. La textura del suelo se refiere al rango del tamaño de las partículas en el suelo. Estas partículas son tradicionalmente divididas en categorías conocidas como arena, limo y arcilla. Debido a la textura del suelo, existen cantidades diferentes de espacio disponible para los microorganismos, que a su vez ocupan diferente volumen en el suelo. Las partículas de tamaño pequeño en suelos de textura fina pueden

impedir el movimiento de las esporas de los hongos. Por lo tanto, los suelos arenosos tienen poros más grandes, facilitan el transporte de microorganismos y tienen mejor aireación que los suelos arcillosos (Barbercheck, 1992).

Estructura. La estructura se refiere al arreglo de las partículas de suelo en agregados que varían en tamaño, geometría y porosidad (Hillel, 1982, citado por Barbercheck, 1992). Los suelos con una textura gruesa tienen una estructura poco definida. Por lo tanto, en estos tipos de suelos se forman pocos espacios porosos. La estructura, junto con la textura, y la materia orgánica, pueden facilitar el contacto de los hongos entomopatógenos con los insectos objetivo debido a la que se origina (Barbercheck, 1992)

Humedad. Aunque muchos entomólogos miden el contenido de agua en el suelo en términos de porcentaje, el empleo del término “potencial de agua” tiene un significado más ecológico y permite la comparación de resultados en diferentes tipos de suelo. El mismo porcentaje de humedad en suelos de diferente textura puede representar diferencias extremas en potencial. El potencial del agua es el factor primario que determina la disponibilidad de agua en el suelo para plantas y animales. Conforme disminuye el potencial de agua en el suelo, también se drenan los espacios porosos y se disminuye la actividad de microorganismos móviles en el suelo. El agua no adherida a las partículas de suelo puede afectar adversamente a los propágulos de los hongos entomopatógenos. Al respecto, la sobrevivencia de *B. bassiana* fue menor en suelos con alto contenido de humedad (Barbercheck, 1992).

pH. En suelos ácidos, con niveles de pH por debajo de 4 se limita la infección de diversos agentes de control biológico, Wood (1989), citado por Barbercheck (1992), reportó que a altas cantidades de iones H^+ intercambiables de arcilla o materia orgánica, se libera aluminio, el cual es altamente tóxico a los patógenos de insectos. La vida media de conidios de *B. bassiana* fue similar a pH de 5, 6 y 7.6 (Lingg y Donald, 1981, citados por Barbercheck, 1992).

Temperatura. La temperatura del suelo determina las tasas y direcciones de los procesos físicos y reacciones químicas y puede también influenciar los procesos biológicos. La temperatura y su interacción con la humedad, es uno de los factores físicos que más afectan la infección de los hongos entomopatógenos en insectos que viven en el suelo (Hall y Papierok, 1982, citados por Barbercheck, 1992). Las diferentes especies y aislamientos de patógenos tienen diferentes límites termales para su sobrevivencia y germinación. Por ejemplo, la germinación in vitro de *B. bassiana* y *M. anisopliae* se encuentra entre los 25 y 30 °C, la esporulación ocurre entre los 10 y 35 °C y el punto de muerte termal para ambos hongos es de aproximadamente 50 °C (Walstad et al. 1970, citados por Barbercheck, 1992).

V. JUSTIFICACIÓN

El uso de los insecticidas químicos para el control de insectos plaga ha originado problemas de resistencia, pérdida de fauna benéfica, contaminación ambiental y de salud humana. Por ello, surge la necesidad de investigar alternativas ecológicamente viables y efectivas para el control de las gallinas ciegas. Una opción prometedora es el control microbiano mediante el uso de los hongos entomopatógenos, ya que estos agentes tienen la capacidad de atacar a todos los estados de desarrollo de estas plagas. Debido a que la mayor parte del ciclo de vida de las gallinas ciegas tiene lugar en el suelo, es necesario conocer la capacidad de penetración de las esporas de los hongos entomopatógenos en este ecosistema para determinar la factibilidad de sus aplicaciones líquidas y su potencial como agentes de control.

VI. HIPÓTESIS

- El suelo es el principal reservorio de diversos microorganismos. Por lo tanto, es probable encontrar larvas de gallina ciega infectadas con hongos entomopatógenos nativos en las regiones con mayor problema de esta plaga en el estado de Guanajuato.
- La penetración de esporas de los hongos entomopatógenos, *B. bassiana* y *M. anisopliae*, depende del contenido de arena y humedad del suelo.

VII. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

- ◆ Obtener y evaluar aislamientos nativos de hongos entomopatógenos provenientes de individuos de gallinas ciegas, *Phyllophaga* sp., así como determinar la factibilidad de aplicaciones líquidas de estos microorganismos en diferentes tipos de suelo.

7.1.1. Objetivos específicos

- ◆ Obtener e identificar diversos aislamientos nativos de hongos patógenos a gallinas ciegas del género *Phyllophaga* sp.
- ◆ Identificar la especie predominante de gallina ciega, *Phyllophaga* sp.
- ◆ Seleccionar los aislamientos más virulentos a la gallina ciega, *Phyllophaga polyphylla*.
- ◆ Determinar la distribución vertical de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* aplicados de forma líquida en suelos con distinto contenido de arena y humedad.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Obtención de aislamientos de hongos entomopatógenos

Para la obtención de los aislamientos de hongos entomopatógenos, se realizaron muestreos de larvas y adultos de gallina ciega en los municipios de Jerécuaro, Acámbaro, Pénjamo y Huanímaro, cuyos campos agrícolas son los más afectados por esta plaga en el estado de Guanajuato. Previamente, se corroboró con los productores que no se hubieran realizado aplicaciones de hongos entomopatógenos contra esta plaga en las parcelas de muestreo. Los muestreos de los individuos de gallina ciega se realizaron en cultivos de maíz que presentaban los síntomas característicos de los daños causados por este insecto, colectando larvas en una superficie de suelo de 30 x 30 x 30 cm. Las larvas se colocaron de manera individual en vasos de plástico del número 10 Reyma[®], mismos que contenían 45 g de tierra y un trozo de zanahoria fresca como alimento. Estas muestras se etiquetaron con el nombre del sitio de colecta, fecha e incluso las coordenadas de la parcela y se transportaron al Laboratorio de Reproducción de Organismos Benéficos (LROB) del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato (CESAVEG), ubicado en Irapuato, Guanajuato. Las larvas de gallina ciega se colocaron en condiciones ambientales controladas de 25 °C y 80% de HR para permitir, en caso de estar presente(s), el crecimiento y esporulación del(os) hongo(s) entomopatógeno(s). Para el aislamiento, los hongos entomopatógenos se sembraron en medio de cultivo agar dextrosa saboraud (ADS) BD Bioxon[®] en cajas petri y se incubaron por un periodo de 8 días en las condiciones ambientales antes mencionadas. Posteriormente, cada

aislamiento se purificó, haciendo una resiembra en el medio ADS, e incubó nuevamente por 8 días más.

8.2. Obtención de cultivos monospóricos

De cada aislamiento de los hongos entomopatógenos obtenido de los individuos de gallina ciega colectados en campo, se obtuvieron cultivos monospóricos bajo la metodología reportada por Ho y Ko (1997), salvo algunas modificaciones. De cada aislamiento, se extrajo una porción circular de 5 mm de diámetro del medio de cultivo ADS con el hongo en esporulación y se colocó en 1 vial de vidrio con 10 ml de agua destilada estéril más el surfactante Inex-A[®] (Cosmocel) al 0.1%. Esta solución se agitó por 2 min en un vórtex Maxi-Mix Termolyne[®]. Después de este tiempo, se tomó 1 mL de esta solución, se vertió en cajas petri con medio de cultivo agar-agar Hycel[®] y se dejó reposar por 1 min. Estas cajas se sellaron con cinta Parafilm[®] y se incubaron en una estufa Felisa[®] a $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Después de este tiempo, estas cajas petri se observaron minuciosamente en un microscopio estereoscópico Zeiss Stemi 2000-C para localizar esporas aisladas y germinadas, las cuales se extrajeron con la ayuda de una jeringa estéril para insulina y se colocaron individualmente en otras cajas de petri con medio de cultivo ADS. Finalmente, estas cajas petri se incubaron a $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, hasta la esporulación de los hongos. El desarrollo de cada cultivo se observó diariamente para seleccionar el aislamiento con mejor crecimiento micelial.

8.3. Mantenimiento de gallina ciega e identificación de la especie

Paralelamente a los recorridos de búsqueda de aislamientos de hongos entomopatógenos en campos agrícolas del estado de Guanajuato, se colectaron larvas de tercer estadio de *Phyllophaga* spp. en San Lorenzo, Jerécuaro, Guanajuato, con el fin de establecer su cría bajo condiciones controladas. Estas larvas se colocaron en charolas de plástico de 35 x 55 cm con sustrato peat moss Mix 6 Sunshine Sungro® húmedo y con semillas de maíz recién emergidas como alimento. Las larvas se transportaron al LROB-CESAVEG y se separaron individualmente en vasos de plástico del número 4-Ch Reyma® con sustrato nuevo y dos semillas de maíz a punto de germinar. Cada vaso se cubrió con tapas de plástico perforadas con alfileres entomológicos para permitir la circulación del aire. Estas larvas se mantuvieron en cuarentena por un periodo de 20 días con la finalidad de que expresaran, en caso de estar infectadas, la presencia de alguna enfermedad que impidiera que se utilizaran en la realización de los bioensayos. Para mantener húmedo el sustrato donde se encontraban las larvas de *Phyllophaga* spp., se agregaba agua destilada al vaso que lo requiriera. Las larvas muertas o enfermas se eliminaron de la cría.

Una parte de las larvas colectadas en campo se mantuvieron en los vasos de plástico hasta obtener los adultos e identificar la especie de gallina ciega de acuerdo a las diagnósis publicadas por Morón (1988).

8.4. Selección de los aislamientos más virulentos

Los cultivos monospóricos obtenidos de cada uno de los aislamientos provenientes de campo se reprodujeron en 10 cajas petri con medio de cultivo ADS

para obtener suficiente inóculo y realizar los bioensayos de evaluación de la virulencia de cada uno de ellos. Las cajas petri donde se produjeron los aislamientos, se mantuvieron en una estufa marca Felisa a $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 8 días, hasta la esporulación. Antes de llevar a cabo los ensayos para seleccionar los aislamientos más promisorios se realizaron las pruebas de calidad del inóculo tales como viabilidad y concentración de esporas.

Viabilidad de esporas. En una campana de flujo laminar se colocó, dentro de una caja petri y sobre un triángulo de varilla de vidrio, un portaobjetos con un cuadro de medio de cultivo ADS de 1.5 x 1.5 cm en cada uno de sus extremos. Sobre el medio de cultivo se depositó, con una pipeta Pasteur, una solución de cada aislamiento y posteriormente se colocaron los cubreobjetos. Las cajas petri se incubaron a $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 h. Después de este tiempo, y con un microscopio compuesto Axiostar Plus (Zeiss[®]) en el objetivo de 40x, se contabilizaron las esporas germinadas y no germinadas en cinco campos diferentes por cada cuadro de agar, obteniendo así el porcentaje de viabilidad de esporas de cada aislamiento (Goettel e Inglis, 1997).

Concentración de esporas. En una campana de flujo laminar se cosecharon esporas de los hongos entomopatógenos y se colocaron en viales de vidrio con agua destilada estéril más el adherente Inex-A[®] al 0.1%. Esta suspensión se agitó en un vórtex durante 2 min y posteriormente se tomó una muestra con una pipeta Pasteur y se colocó en una cámara de Neubauer, donde se contabilizaron las esporas mediante la metodología reportada por Goettel e Inglis (1997), utilizando el objetivo de 40x de un microscopio compuesto. Con la información de concentración de

esporas por mL y el porcentaje de viabilidad de las mismas, se ajustó al 100% la viabilidad de las esporas de cada aislamiento de la concentración deseada.

Para los ensayos de selección se utilizaron los aislamientos que se enlistan en el Cuadro 1 y cada uno constituyó un tratamiento. De cada aislamiento se preparó una suspensión de 400 mL a una concentración de 1×10^8 conidios/mL de agua destilada esterilizada más el dispersante Inex-A[®] al 0.1 %. Para los bioensayos, se utilizaron larvas de tercer estadio de *P. polyphylla* mantenidas en la cría, las cuales habían manifestado estar sanas tras el período de cuarentena mencionado en la sección 8.3.

Cuadro 1. Aislamientos monospóricos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* evaluados contra *P. polyphylla*.

ESPECIE	AISLAMIENTO	HOSPEDERO
	TESTIGO	Agua destilada estéril
<i>B. bassiana</i>	BB35	Gallina ciega
	BB37	<i>Melanoplus</i> sp.
	BB38	Gallina ciega
	BB39	Gallina ciega
	BB42	<i>Lygus</i> sp.
	BB44	Gallina ciega
<i>M. anisopliae</i>	MA20	Gallina ciega
	MA23	Gallina ciega
	MA24	Gallina ciega
	MA25	Gallina ciega
	MA28*	Gallina ciega

*Meta-Bichs[®] Bio-Bichs.

Las larvas de gallina ciega que se utilizaron en el bioensayo se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.1%, sumergiéndolas durante 5 segundos y después se

enjuagaron con agua destilada por otros 5 segundos, para finalmente colocarlas sobre papel absorbente. El método de inoculación fue por inmersión. En un embudo de porcelana de 8.5 cm de diámetro x 4.5 cm de alto, sellado en la parte angosta con un tapón de corcho, se vertieron 100 mL de suspensión de cada aislamiento evaluado a la concentración antes mencionada. Grupos de 40 larvas se sumergieron en esta solución por un periodo de 10 segundos. Posteriormente, se retiró el tapón de corcho, dejando que el embudo se vaciara por gravedad. Las larvas del testigo se trataron únicamente con agua destilada esterilizada más el adherente. Después del tratamiento, las larvas se colocaron individualmente en vasos de plástico del número 4-Ch Reyma[®] cubiertos con tapas de plástico perforadas con alfileres entomológicos. Después de 1 hora, a cada vaso, se le adicionó sustrato estéril humedecido y dos semillas de maíz germinadas que sirvieron como alimento para las larvas. Estas semillas se desinfectaron, sumergiéndolas durante 2 horas, en una solución de Captan[®] (2.5 g/L de agua) y posteriormente se enjuagaron con agua para eliminar los residuos del fungicida. Los vasos con las larvas se mantuvieron en condiciones de 25°C y 70 % de HR. El ensayo se repitió tres veces en diferentes ocasiones. La mortalidad causada por los diferentes aislamientos se registró a los 10, 19, 26, 32, 40 y 48 posteriores a la inoculación. Las larvas muertas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.5% y se colocaron en cajas petri formando cámaras húmedas para confirmar la esporulación.

Los datos obtenidos en el bioensayo de selección de aislamientos se analizaron bajo una regresión logística (Genstat Committee, 2005), considerando el total de larvas tratadas en las tres repeticiones.

8.5. Distribución vertical de conidios de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en suelos con diferente contenido de arena y humedad

Con la finalidad de evaluar la distribución vertical de las esporas de los hongos entomopatógenos en suelos con diferente contenido de arena y humedad, se utilizaron los aislamientos BB02, MAC06 de *B. bassiana* y *M. anisopliae* respectivamente. Estas especies de hongos se utilizaron debido a un posible efecto diferencial de distribución de sus esporas en el perfil de suelo, ocasionado por sus diferencias morfológicas. Para ello, se utilizaron cilindros de PVC de 25 cm de altura x 17 cm de diámetro rellenos con suelo, mismos que se adecuaron previamente cortándolos longitudinalmente por la mitad. Posteriormente, estos cilindros se volvieron a unir con una banda elástica y se les colocó, como base, una lámina de plástico grueso unida con silicón. Cada cilindro se llenó con 9 Kg de tierra proveniente de campo y se compactó al ras del mismo. El proceso de compactación se realizó adicionando 1 Kg de tierra a la vez, hasta completar los 9 Kg. La tierra utilizada provenía de terrenos de cultivo comúnmente infestado con gallina ciega y donde no se tenían antecedentes de aplicación de hongos entomopatógenos. Se utilizaron tres suelos con diferentes características físicas, mismas que se determinaron en el Laboratorio Nacional de Fertilidad de Suelos y Nutrición Vegetal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Campo Experimental Bajío (INIFAP-CEBAJ), ubicado en Celaya, Guanajuato (Cuadro 2). De los tres suelos utilizados, dos se colectaron en el municipio de Jerécuaro, Guanajuato; por lo tanto, se etiquetaron como Jer 1 y Jer 2. El tercer suelo proviene del municipio de Comonfort, Guanajuato y se etiquetó como Comonfort.

Los tres suelos utilizados se tamizaron con una malla de 5 x 5 mm para eliminar impurezas y partículas grandes. Una vez tamizada, la tierra se dejó secar en un horno Binder[®] a 150 °C durante tres días y posteriormente se agregó, cuando así se requirió, agua destilada que se mezcló homogéneamente para obtener humedades de 0, 5 y 10%, mismas que fueron determinadas en un analizador de humedad Ohaus[®] modelo MB35. Previamente, se reprodujeron conidios de los aislamientos mencionados de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en el LROB-CESAVEG, utilizando arroz como sustrato.

Cuadro 2. Características generales de los suelos utilizados en los ensayos.

SUELO USADO	TEXTURA				MO (%)	pHe	DA (g/cm ³)	CEe (dS/m)	CIC	pH (1:2)	% de Humedad		
	% ARENA	% ARCILLA	% LIMO	TIPO DE SUELO							P.S.	C.C.	P.M.P.
Jer 1	44.2	32.9	22.9	Franco Arcilloso	2.4	7.6	1.2	0.5	29.0	7.1	62.0	29.8	15.5
Jer 2	68.2	12.9	18.9	Franco Arenoso	2.2	8.0	1.4	0.7	20.0	8.4	38.0	17.1	9.3
Comonfort	30.8	29.2	40.0	Franco Arcilloso	2.9	8.1	1.2	0.9	45.2	7.7	92.6	69.5	36.5

MO: Materia Orgánica, **pHe:** pH en Extracto de Saturación, **DA:** Densidad Aparente, **CEe:** Conductividad Eléctrica en Extracto de Saturación, **CIC:** Capacidad de Intercambio Catiónico, **P.S.:** Punto de Saturación, **C.C.:** Capacidad de Campo, **P.M.P.:** Punto de Marchitez Permanente.

Con estos conidios, se prepararon 10 L de solución a una concentración de 1×10^8 conidios viables/mL más el dispersante Inex-A[®] al 0.5 %. Con una mochila motorizada Arimitsu,[®] utilizando una boquilla H1/4U-SS0060 a 3 psi, se realizaron las aplicaciones de los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre los cilindros de PVC antes mencionados. Se utilizó un gasto de 6,000 L de agua/ha considerando una aplicación a la base de las plantas de cultivo y con un ancho de surco de 0.80 m. La aplicación se realizó a una altura de 5 cm de salida de la suspensión de la varilla de aplicación, haciendo que dicha solución pasara por el diámetro del cilindro. Después de la aplicación de los hongos, y con la ayuda de un hilo de Nylon No. 2, se cortó el suelo a través de las fisuras longitudinales originadas por el corte del tubo de PVC por la mitad. En una de las mitades del cilindro, se tomaron dos muestras de suelo de 1 g cada una a los 0, 3 cm y hasta la profundidad máxima de penetración alcanzada por la suspensión, ésta última profundidad se determinó midiendo con una regla el perfil de humedad generado en el suelo..Una muestra de 1 gr se utilizó para determinar el porcentaje de humedad y así se obtuvo el peso seco de cada una de las muestras tomadas a cada profundidad. La otra muestra de 1 gr de suelo se utilizó para contabilizar el número de unidades formadoras de colonia (UFC). De esta forma se obtuvo el número de UFCs por gramo de suelo seco para cada profundidad del cilindro. La aplicación de los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre los tres suelos se realizó en 4 ocasiones distintas.

El conteo de UFCs por gramo de suelo seco se realizó según lo reportado por Goettel e Inglis (1997). Para ello, se adicionó 1 g de suelo en 9 mL de agua destilada estéril y se agitó durante dos minutos en un vórtex. Posteriormente, se realizaron diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , de las cuales se tomaron 100 μ L y se sembraron

en cajas petri de plástico desechables estériles de 90 x 15 mm SyM[®] que contenían medio de cultivo Veen, el cual es selectivo para los hongos de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* (Butt y Goettel, 2000). Estas cajas se colocaron a 25°C en una incubadora Binder[®] ED-115 y después de 5 días se contabilizó, en un microscopio estereoscópico Zeiss[®], el número de UFCs por cada caja petri.

Para la profundidad máxima de penetración alcanzada por la suspensión de los hongos se realizó un análisis de varianza, bajo un diseño completamente al azar para cada hongo y para cada porcentaje de humedad evaluado y al encontrarse diferencias significativas de penetración entre los tratamientos (suelos) se realizaron pruebas de separación de medias bajo la metodología de Tukey ($\alpha= 0.05$) (SAS Institute, 1999). En cuanto a la distribución vertical de las esporas, considerando UFCs por gramo de suelo seco, se realizó un análisis de varianza en arreglo factorial 3 x 3 (donde el factor A: Suelos y el factor B: Profundidades), bajo un diseño completamente al azar para cada hongo y cada porcentaje de humedad y al encontrarse diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, se aplicó la prueba de separación de medias de Tukey ($\alpha= 0.05$), utilizando el programa estadístico SAS (SAS Institute, 1999).

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Aislamientos de hongos entomopatógenos obtenidos y cultivos monospóricos

De las larvas de gallina ciega colectadas en campo en los municipios de Pénjamo, Huanímaro, Acámbaro y Jerécuaro, Guanajuato, se obtuvieron 16 aislamientos nativos de hongos entomopatógenos; de los cuales ocho corresponden a la especie *B. bassiana* y el resto a *M. anisopliae* (Cuadro 3). En este cuadro también se incluyen cuatro aislamientos más; tres de *B. bassiana* (BB01, BB02 y BB22 provenientes de *Melanoplus* sp., *Lygus* sp. y gusano de alambre, respectivamente) y uno de *M. anisopliae* (MA07, proveniente de gallina ciega), los cuales ya se encontraban en la colección de hongos entomopatógenos del LROB-CESAVEG.

Los géneros y especies de cada uno de los aislamientos de los hongos entomopatógenos aislados de las gallinas ciegas colectadas en campo presentaban, para el caso de *B. bassiana*, los conidios globosos, unicelulares, hialinos y dispuestos en forma de zig zag sobre el raquis del conidióforo. Para el caso de *M. anisopliae*, las colonias se tornaron de color verde oscuro y los conidios estaban dispuestos en forma de cadena sobre columnas de conidióforos, lo cual coincide con lo mencionado por Humber (1997), Tanada y Kaya (1993), Rehner y Buckley (2005), Poinar y Tomas (1978) y Zimmermann (1993).

Cuadro 3. Aislamientos de hongos entomopatógenos provenientes de larvas de gallina ciega en diversas localidades del estado de Guanajuato.

CODIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS	FECHA DE COLECTA	HOSPEDERO	CULTIVO	COMUNIDAD	MUNICIPIO	COORDENADAS	
						LATITUD NORTE	LONGITUD OESTE
POLIESPÓRICOS	MONOSPÓRICOS						
BB01 ¹	10/02/2004	<i>Melanoplus</i> sp.	Maíz	San Bartolo	Apaseo El Alto	20.51327	100.55057
BB02 ¹	08/12/2004	<i>Lygus</i> sp.	Maíz	El Copal	Irapuato	20.74742	101.32725
BB23	05/01/2007	Gallina ciega	Maíz	Tierras Negras	Pénjamo	20.48795	101.73392
BB25	26/10/2007	Gallina ciega	Maíz	Sn José de Ayala	Huanimaro	20.37192	101.45737
BB26	11/10/2007	Gallina ciega	Maíz	Puruagua	Jerécuaro	20.07215	100.44825
BB29	17/10/2007	Gallina ciega	Maíz	San Lorenzo	Jerécuaro	20.01378	100.48166
BB22 ¹	16/01/2007	Gusano dealambre		Emiliano Zapata	Irapuato	20.63561	101.35314
BB24	27/02/2008	Gallina ciega	Maíz	El Moral	Acámbaro	19.98467	100.76342
BB27	27/02/2008	Gallina ciega	Maíz	Sn José de Ayala	Huanimaro	20.37192	101.45737
BB28	25/02/2008	Gallina ciega	Maíz	El Moral	Acámbaro	19.9834	100.76189
BB40	27/02/2008	Gallina ciega	Maíz	El Moral	Acámbaro	19.98017	100.76753
MA13	15/04/2007	Gallina ciega	Maíz	San Lorenzo	Jerécuaro	20.02779	100.47642
MA14	11/10/2007	Gallina ciega	Maíz	Puruagua	Jerécuaro	20.07199	100.44829
MA15	26/10/2007	Gallina ciega	Maíz	Sn José de Ayala	Huanimaro	20.37233	101.45776
MA19	11/10/2007	Gallina ciega	Maíz	Puruagua	Jerécuaro	20.0722	10.44849
MA07 ¹	09/11/2006	Gallina ciega	Maíz	Puruagua	Jerécuaro	20.07197	100.44852
MA11	16/01/2007	Gallina ciega	Maíz	Rancho La Sonaja	Irapuato	20.61917	101.37361
MA12	12/04/2007	Gallina ciega	Maíz	San Lorenzo	Jerécuaro	20.01328	100.48188
MA16	27/02/2008	Gallina ciega	Maíz	El Moral	Acámbaro	19.98102	100.76805
MA18	11/10/2007	Gallina ciega	Maíz	Puruagua	Jerécuaro	20.07215	100.44825

BB: *B. bassiana* **MA:** *M. anisopliae*

¹Hongos colectados previo al estudio.

El registro de hongos entomopatógenos en larvas de gallina ciega ha sido ampliamente documentado. Dhoj GC et al. (2008) colectaron aislamientos nativos tanto *B. bassiana* como de *M. anisopliae* en suelos agrícolas. Por su parte, Villalobos (1992) también encontró al hongo entomopatógeno del género *Cordyceps* sp. atacando *Strategus* sp. en condiciones de campo en el estado de Tamaulipas.

De los 20 aislamientos presentados en el Cuadro 1, solamente se obtuvo un total de 13 cultivos monospóricos; siete de *B. bassiana* (BB37, BB42, BB44, BB35, BB38, BB39 y BB43) y seis de *M. anisopliae* (MA23, MA24, MA20, MA25, MA21 y MA22). No se obtuvieron cultivos monospóricos de cuatro aislamientos de *B. bassiana* (BB22, BB24, BB28 y BB40) ni de tres de *M. anisopliae* (MA07, MA11 y MA18).

Debido a que los aislamientos BB22, BB24, BB28 y BB40 de *B. bassiana* y MA07, MA11 y MA18 de *M. anisopliae* presentaron crecimiento micelial y esporulación deficientes se decidió no obtener sus respectivos aislamientos monospóricos. Esto previendo contar con inóculo suficiente para el desarrollo de bioensayos y considerando la factibilidad de reproducción masiva de algún aislamiento que mostrara potencial en cuanto a virulencia en el insecto plaga objeto de este estudio.

9.2. Identificación de la especie de gallina ciega

Los adultos de gallina ciega que se obtuvieron de las larvas colectadas en la zona agrícola de San Lorenzo, Jerécuaro, Guanajuato corresponden a la especie *Phyllophaga polyphylla* Bates. Esta identificación fue corroborada por el Biólogo Antonio Marín Jarillo del INIFAP-CEBAJ.

Los adultos de *P. polyphylla* tiene una longitud corporal de 14 a 16 mm, su coloración puede cambiar de amarillo pardusco a pardo rojizo (Figura 2) Su cuerpo es oblongo con escasas sedas largas en la base de los élitros y numerosas setas cortas sobre la frente. El mazo de las antenas del macho está formada por cinco lamelas muy largas de igual longitud, o por tres largas y dos cortas (forma heterophylla). El pigidio (placa pigidial), según Edmonds (1972) citado por Morón (1988), representa el tergo del VIII segmento abdominal. La proyección apical ventral de los parámetros es larga y recta (Morón, 1988). En cuanto a su distribución geográfica en México, *P. polyphylla* se encuentra en los estados de Aguascalientes, Jalisco, Michoacán (Morón et al. 1997), Guanajuato (Marín, 2001) y Colima (Díaz, 2002).



Figura 2. Adulto macho de *P. polyphylla* y su genitalia.

9.3. Selección de los aislamientos más virulentos

Los 11 aislamientos (BB35, BB37, BB38, BB39, BB42 y BB44 de *B. bassiana* y MA20, MA23, MA24, MA25 y MA28 de *M. anisopliae*) utilizados resultaron patogénicos a las larvas de tercer estadio de la gallina ciega, *P. polyphylla*, incluso aquellos provenientes de hospederos diferentes a esta plaga tales como los aislamientos BB37 y BB42 de *B. bassiana* provenientes del chapulín *Melanoplus* sp. y chinche *Lygus* sp., respectivamente. Las mortalidades causadas, a los 42 días después del tratamiento, por los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* estuvieron comprendidas entre 10-17% y 10-18%, respectivamente (Cuadro 4). No se observaron diferencias significativas ($Pr > F: 0.674$) entre la mortalidad causada por los aislamientos de ambas especies de hongos entomopatógenos. De igual forma, no existieron diferencias significativas entre los aislamientos de *B. bassiana* ($Pr > F: 0.170$), ni entre los de *M. anisopliae* ($Pr > F: 0.248$).

En otros estudios, Nájera et al. (2005) obtuvieron hasta 80% de mortalidad a los 30 días después de la inoculación con aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* contra larvas de *Phyllophaga crinita* Burmeister. Berón y Díaz (2005) utilizaron aislamientos de los hongos anteriormente mencionados y de *Paecilomyces lilacinus* Thom contra larvas de *Cyclocephala signaticollis* Burmeister y reportaron hasta 70% de mortalidad a 40 días después de aplicados los tratamientos. La diferencia en los porcentajes de mortalidad registrados por los autores antes citados y los obtenidos en el presente estudio pueden ser debido a la concentración utilizada y método de aplicación. Por ejemplo, Nájera et al. (2005) utilizaron una concentración de 2×10^8 conidios/gramo e inocularon los aislamientos en el sustrato, incrementando con ello considerablemente el tiempo de exposición de las larvas con los hongos *B.*

bassiana y *M. anisopliae*. Con excepción de los altos porcentajes de mortalidad registrados en las investigaciones antes referidas, en el presente trabajo también se obtuvo la mayor mortalidad de larvas de gallina ciega después de los 30 días de aplicación de los tratamientos.

Cuadro 4. Porcentajes de mortalidad obtenidos por diferentes aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en larvas del tercer estadio de *P. polyphylla*.

TRATAMIENTO	% DE MORTALIDAD	± S.E.
TESTIGO	0.0	0.0
BB35	17.4	0.0244
BB37	11.6	0.0169
BB38	17.4	0.0252
BB39	17.5	0.0244
BB42	10.3	0.0151
BB44	13.4	0.0198
MA20	10.3	0.0159
MA23	10.4	0.0193
MA24	12.6	0.0193
MA25	16.5	0.0245
MA28	18.3	0.0266

Por su parte, Rath (1992) reportó que *M. anisopliae* requirió alrededor de 190 días para alcanzar el 50% de mortalidad en larvas de la gallina ciega, *Adoryphorus couloni* Burmeister a dosis de 4.1×10^6 esporas/gramo. Derivado de estudios bajo condiciones de laboratorio, este mismo autor recomendó utilizar dosis de entre 1 y 4 toneladas de producto con un 10% esporas por hectárea para controlar eficientemente en campo a esta plaga.

En el presente estudio, la mortalidad más alta fue causada por los aislamientos BB44 (13%), BB35, BB38 y BB39 (17%) de *B. bassiana* y MA25 (16%) y

MA28 (18%) de *M. anisopliae*, aunque cabe mencionar que éste último aislamiento proviene de un producto comercial. Los aislamientos BB42 y BB37 de *B. bassiana*, obtenidos de hospederos diferentes al de gallina ciega, fueron menos virulentos a *P. polyphylla*, ya que causaron los más bajos porcentajes de mortalidad (10 y 12%, respectivamente). Esto puede ser debido al grado de especificidad que desarrolla cada aislamiento para atacar a alguna plaga en particular (Tanada y Kaya, 1993). En contraste, cuando Dhoj GC et al. (2008) evaluaron diferentes aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana* sobre las especies *Anomala dimidiata* Hope, *Adoretus lasiopygus* Burmeister y *Phyllognathus dionysius* Fabricius en Nepal, se encontró que los aislamientos nativos fueron más virulentos en comparación con los aislamientos comerciales, encontrando diferencias de hasta un 30% de mortalidad,

Los resultados derivados del presente trabajo, indicaron que los aislamientos de ambas especies de hongos entomopatógenos fueron similarmente infectivos en larvas de la gallina ciega, *P. polyphylla*. Sin embargo, es otros estudios se ha determinado que el grado de virulencia tiende a ser una característica intrínseca de cada aislamiento, sin importar la especie. Por lo tanto, tomando en cuenta que la virulencia de los hongos entomopatógenos depende del tipo de aislamiento utilizado, es justificable que se haya registrado un máximo de 18 % de mortalidad a diferencia del 100 % obtenido en la gallina ciega, *Antitrogus mussoni* Blackburn cuando se utilizaron diferentes aislamientos *M. anisopliae* (Milner, 1992).

9.4. Distribución vertical de esporas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en suelos con diferente contenido de arena y humedad

9.4.1. Profundidad máxima de penetración

La profundidad máxima de penetración de las soluciones de esporas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* dependió del tipo de suelo en cada contenido de humedad evaluado (Cuadro 5). Las características físicas de los suelos utilizados en este ensayo sugieren una relación inversa entre el contenido de arcilla y la profundidad de penetración de las soluciones de las esporas de ambos aislamientos. Es decir, entre más contenido de arcilla en el suelo, la profundidad alcanzada fue menor y viceversa. Por otro lado, entre más contenido de arena, la penetración de las soluciones fue mayor. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Ignoffo et al. (1977) quienes mencionaron que el contenido de arena influyó en el nivel de penetración de las esporas del hongo *N.rileyi* en el suelo.

Cuadro 5. Profundidad máxima de penetración (cm) de las soluciones con esporas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en suelos con diferente contenido de humedad.

SUELO USADO	PORCENTAJE DE HUMEDAD					
	0%		5%		10%	
	Bb	Ma	Bb	Ma	Bb	Ma
Jer 1	4.00 b	4.42 a	4.92 b	5.02 ab	5.20 b	4.77 b
Jer 2	4.97 a	5.07 a	5.60 a	5.60 a	6.25 a	5.80 a
Comonfort	4.17 b	4.52 a	3.77 c	4.17 b	4.90 b	4.90 ab
Pr>F	0.0115	0.2572	0.0001	0.0131	0.005	0.0338

Medias con la misma letra dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey $\alpha= 0.05$). Bb, *Beauveria bassiana*; Ma, *Metarhizium anisopliae*.

En general también se observó que, sin importar el aislamiento del hongo utilizado, hubo una tendencia de incremento de la penetración de las soluciones en el suelo a medida que aumenta el contenido de humedad (Figuras 3 y 4). En los tres suelos ensayados con 10% de humedad, las soluciones de los hongos entomopatógenos alcanzaron las mayores profundidades de penetración (entre 4.90-6.25 cm para *B. bassiana* y 4.77-5.80 cm para *M. anisopliae*). Esto se debe a que el contenido de agua presente en el suelo influye ampliamente en la acción de capilaridad del mismo, de tal forma que en suelos más secos la movilidad de las partículas es menor (Storey y Gardner, 1987; McCoy et al. 1992)

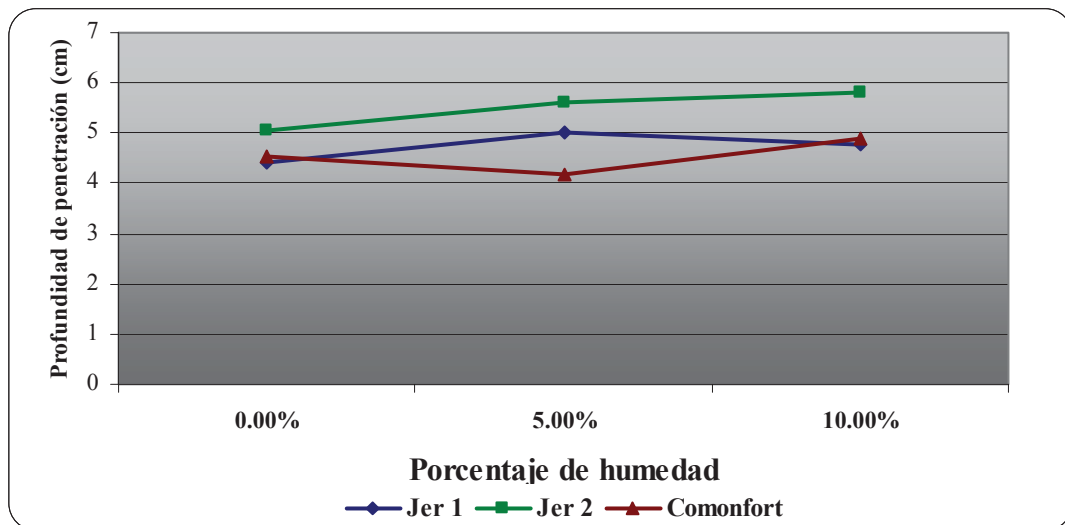


Figura 3. Profundidad máxima de penetración alcanzada por la aplicación de la solución con esporas de *B. bassiana* en suelos con diferente contenido de humedad.

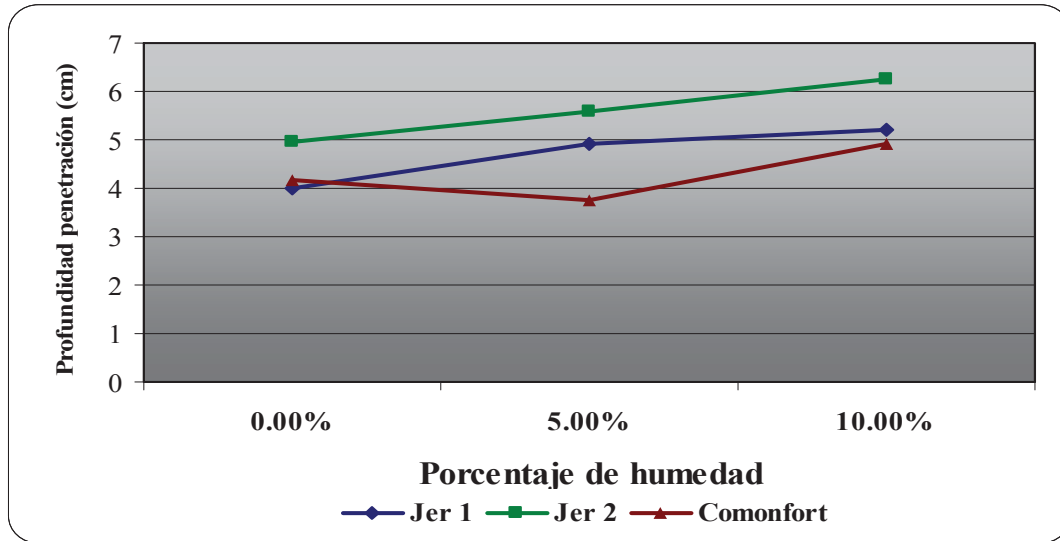


Figura 4. Profundidad máxima de penetración alcanzada por la aplicación de la solución con esporas de *M. anisopliae* en suelos con diferente contenido de humedad.

9.4.2. Distribución vertical de esporas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en el perfil de suelo.

Existen diversos factores que pueden afectar el movimiento vertical de los conidios en el suelo. El agua contenida en el suelo es el vehículo principal mediante el cual se mueven las partículas. En suelos secos, la movilidad de las partículas es más difícil debido a la reducción en la acción de capilaridad (Storey y Gardner, 1987; McCoy et al. 1992). El análisis estadístico realizado del factor tipo de suelo para determinar la distribución vertical de las esporas en cada suelo utilizado, registró diferencias significativas (Cuadro 6). En este cuadro, se observa en general que los valores de las UFCs se correlacionan positivamente con el contenido de limo, conductividad eléctrica y capacidad de intercambio catiónico. Esto indica que entre

más alto sea el valor de estas características físicas, mayor será el número de UFCs encontradas en el suelo.

Cuadro 6. Unidades formadoras de colonia de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en suelos con diferentes contenido de humedad.

SITIO DE COLECTA	PORCENTAJE DE HUMEDAD					
	0%		5%		10%	
	Bb	Ma	Bb	Ma	Bb	Ma
Jer 1	5.90E+06 c	8.12E+06 b	1.79E+07 a	1.31E+07 B	8.53E+06 b	1.37E+07 b
Jer 2	1.30E+07 b	1.07E+07 ab	1.11E+07 b	9.50E+06 B	8.80E+06 b	1.53E+07 ab
Comonfort	2.00E+07 a	1.40E+07 a	2.12E+07 a	1.85E+07 A	1.49E+07 a	2.02E+07 a
Pr>F	0.0001	0.0214	0.0001	0.0001	0.0004	0.0486

Medias con la misma letra dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey $\alpha= 0.05$).

Esta tendencia de retención de UFCs en la matriz de suelo se mantuvo independientemente del aislamiento del hongo entomopatógeno utilizado, así como del contenido de humedad que cada serie de suelo presentaba al momento de realizar los ensayos. Así, el suelo de Comonfort que presentó 40% de contenido de limo, 0.9 de conductividad eléctrica y 45.2 de capacidad de intercambio catiónico, registró el mayor número de UFCs en comparación con los suelos Jer 1 y Jer 2 que presentan menor cantidad de limo (22.9 y 18.9%, respectivamente), conductividad eléctrica (0.5 y 0.7, respectivamente) y capacidad de intercambio catiónico (29.0 y 20.0, respectivamente). Estos resultados son similares a los obtenidos por Salazar et al. (2007), quienes encontraron que el suelo que contenía mayor porcentaje de limo retuvo una mayor cantidad de esporas.

Para el caso del análisis estadístico del factor profundidad de penetración de las esporas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, también se encontraron diferencias significativas en cuanto al número de UFCs registradas a los 0 y 3 cm, así como a la profundidad máxima en cada suelo utilizado (Cuadro 7). En este cuadro, se observa que, en ambos aislamientos, el contenido de UFCs disminuye conforme incrementa la profundidad de muestreo de las esporas, encontrándose la mayor cantidad de ellas a los 0 cm de profundidad y en menor cantidad en la profundidad máxima. En trabajos realizados por Storey y Gardner (1988) se evaluó en condiciones de invernadero el movimiento vertical de una suspensión acuosa de esporas de *B. bassiana* en el perfil de cuatro suelos sin perturbar. Estos autores reportaron una correlación positiva entre las UFCs encontradas a diferentes profundidades con la infiltración de agua. Sin embargo, al realizar estos mismos estudios en condiciones de campo, no se encontró correlación significativa entre

Cuadro 7. Unidades formadoras de colonia de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en diferentes profundidades del suelo con distinto contenido de humedad.

PROFUNDIDAD	PORCENTAJE DE HUMEDAD					
	0%		5%		10%	
	Bb	Ma	Bb	Ma	Bb	Ma
0 cm	1.45E+07 a	1.55E+07 a	1.77E+07 a	1.71E+07 a	1.41E+07 a	1.96E+07 a
3 cm	1.46E+07 a	1.15E+07 a	1.99E+07 a	1.50E+07 a	1.27E+07 a	2.20E+07 a
Max	1.04E+07 b	5.78E+06 b	1.28E+07 b	8.58E+06 b	5.37E+06 b	7.67E+06 b
Pr>F	0.0147	0.0002	0.0037	<.0001	<.0001	<.0001

Medias con la misma letra dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey $\alpha=0.05$).

el movimiento vertical de las UFCs con el contenido de arena, arcilla, limo y tasa de infiltración en los cuatro suelos utilizados. En este caso, aunque el agua utilizada para la aplicación de *B. bassiana* penetró 15 cm de profundidad del suelo después de dos horas, el 94 % de los conidios aplicados fue retenido en los primeros 5 cm de profundidad, lo cual es similar a lo observado por Storey y Gardner (1988), Storey et al. (1989) y Fierer et al. (2003).

En este estudio, se observó menor contenido de humedad conforme se incrementaba la profundidad de muestreo de las esporas en el perfil del suelo. Esto puede explicar la distribución vertical de esporas de acuerdo con el contenido de humedad ya éste es un factor importante para la distribución de microorganismos en el suelo (Storey y Gardner, 1987; McCoy et al. 1992; Barbercheck, 1992). La tendencia general de disminución de las UFCs conforme se incrementa la profundidad se mantuvo independientemente del aislamiento del hongo utilizado, así como del contenido de humedad con que inicialmente se encontraban los suelos.

Para el caso de la interacción entre los factores tipo de suelo y profundidad de penetración de las esporas, sólo se observaron diferencias significativas para 0 y 10 % de contenido de humedad con el aislamiento de *B. bassiana* (Cuadro 8). En este caso, y de forma general, se encontró que los suelos Comonfort y Jer 2 presentaron los valores de UFCs más altos comparado con el suelo Jer 1. Esto puede estar relacionado con la cantidad de limo, conductividad eléctrica y capacidad de intercambio catiónico en cada uno de estos suelos. De forma general, el suelo de Comonfort, que contiene menor contenido de arena, presentó una distribución vertical más uniforme de UFCs en comparación a los suelos Jer 1 y Jer 2. Los resultados del presente estudio son similares a los reportados por Salazar et al.

Cuadro 8. Unidades formadoras de colonia de *B. bassiana* y *M. anisopliae* registradas en las interacciones entre el tipo de suelo y la profundidad a diferente contenido de humedad.

INTERACCIÓN	PORCENTAJE DE HUMEDAD					
	0%		5%		10%	
	Bb	Ma	Bb	Ma	Bb	Ma
Jer1- 0 cm	5.50E+06	1.32E+07	1.85E+07	1.67E+07	1.29E+07	1.65E+07
Jer1- 3 cm	5.10E+06	8.04E+06	1.87E+07	1.34E+07	9.95E+06	1.86E+07
Jer1- Max	7.31E+06	3.06E+06	1.66E+07	9.41E+06	2.66E+06	6.08E+06
Jer2- 0cm	1.66E+07	1.63E+07	1.43E+07	1.08E+07	1.19E+07	2.01E+07
Jer2- 3 cm	1.76E+07	1.36E+07	1.42E+07	1.31E+07	1.40E+07	2.50E+07
Jer2- Max	5.53E+06	2.30E+06	4.94E+06	2.88E+06	4.01E+05	1.03E+06
Comonf- 0 cm	2.13E+07	1.71E+07	2.02E+07	2.37E+07	1.76E+07	2.22E+07
Comonf- 3 cm	2.12E+07	1.29E+07	2.67E+07	1.99E+07	1.43E+07	2.26E+07
Comonf- Max	1.84E+07	1.19E+07	1.68E+07	1.20E+07	1.30E+07	1.59E+07
Pr>F	0.0057	0.2725	0.2508	0.4651	0.0480	0.1181

Medias con la misma letra dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey $\alpha= 0.05$).

(2007), quienes reportaron una distribución uniforme de esporas de *M. anisopliae* en suelos con 44.1 % de arena.

Ignoffo *et al.* (1977) reportaron que los conidios de *N. rileyi* alcanzaron mayor profundidad en suelos con mayor contenido de arena comparado con los que contenían más limo cuando se utilizó una concentración de 3.04×10^9 conidios/mL. Sin embargo, estos autores encontraron que el 90% de los conidios se concentró en los primeros dos centímetros de profundidad de los suelos limosos. Por otra parte Storey y Gardner (1987) encontraron un 30% de conidios de *B. bassiana* en suelos con mayor contenido de arena cuando se aplicó una solución con 5×10^7 conidios/mL a cilindros de plástico de 30.6 x 3.8 cm. Estas diferencias pueden ser debido a que los conidios se adhirieron a la arcilla o partículas orgánicas presentes en el suelo y por lo tanto no se movieron a profundidades mayores, además de las concentraciones utilizadas en ambos estudios. Otra de las razones de estas diferencias puede ser debido a que Ignoffo *et al.* (1977) utilizaron un agente humectante. Esto pudo hacer más hidrofílicos a los conidios de *N. rileyi*, originando así su poca adsorción a las partículas de arcilla. Además, los conidios de *N. rileyi* son más grandes en comparación con los de *B. bassiana*, lo que puede determinar la profundidad del suelo que puedan alcanzar.

En el caso de *M. anisopliae* no se observaron diferencias significativas entre las interacciones de los tipos de suelo y la profundidad de penetración en ninguno de los contenidos de humedad ensayados. Sin embargo, numéricamente se registró una tendencia de distribución de esporas muy similar a la registrada en

el caso de *B. bassiana*. También se observó una distribución más uniforme de las esporas en el suelo Comonfort, el cual tiene menor contenido de arena.

La tendencia general de incremento del número de UFCs en cada una de las profundidades analizadas conforme aumentó el contenido de humedad de los suelos se observó en ambos aislamientos ensayados. En el caso de *M. anisopliae*, se observó que con 10 % de humedad siempre existió mayor número de UFCs en cada suelo y profundidad. En contraste, en el caso de *B. bassiana*, el mayor contenido de esporas se observó en los suelos con 5 % de humedad. La distribución de esporas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* registrada en este estudio, puede ser debido a las características hidrofóbicas de ambos microorganismo, mismas que pueden afectar su distribución en el perfil de suelo (McCoy et al. 1992, Jaronski y Jackson 2008).

X. CONCLUSIONES

- *Phyllophaga polyphylla* es la especie de gallina ciega que predomina en la zona agrícola de San Lorenzo, Jerécuaro, Guanajuato.
- Los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* pueden infectar de forma natural a las larvas de gallina ciega en los municipios de Pénjamo, Huanímaro, Acámbaro y Jerécuaro del estado de Guanajuato.
- Los aislamientos BB39 de *B. bassiana* y MA28 de *M. anisopliae* fueron los más virulentos en larvas de tercer estadio de *P. polyphylla* al provocar 17.5 y 18.3 % de mortalidad, respectivamente.
- En el suelo Jer 2, se observó una mayor penetración de la solución con esporas de los aislamientos BB02 de *B. bassiana* y MAC06 de *M. anisopliae* en los tres contenidos de humedad ensayados (0, 5 y 10%). Lo anterior, presumiblemente, debido al mayor contenido arena presente en este suelo.
- La distribución más uniforme de las UFCs se observó en el suelo con mayor contenido de limo, conductividad eléctrica y capacidad de intercambio catiónico (suelo Comonfort).
- La mayor cantidad de esporas de los aislamientos BB02 de *B. bassiana* y MAC06 de *M. anisopliae* se retuvieron en los primeros tres centímetros de los diferentes suelos y contenidos de humedad ensayados.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Anónimo, 2006. Informes técnicos de las campañas fitosanitarias en Guanajuato. Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato. S/p.
- Aragón, G. A. y Morón, M. A. 2004. Un método de cría para “gallinas ciegas” rizófagas del género *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae). pp. 109-118. En: Bautista, M. N., Bravo, M. H. y Chavarín, P. C. (eds). Cría de insectos plaga y organismos benéficos. Grupo editorial Emmanuel. Texcoco, Edo. México.
- Barberchek, M. E. 1992. Effect of soil physical factors on biological control agents of soil insect pests. *Florida Entomologist*. 75: 539-548.
- BayScience Foundation. 2009. *Beauveria bassiana*. http://zipcodezoo.com/fungi/B/Beauveria_bassiana/. (Accesada en Julio de 2010).
- Bejarano, F. 2004. Daños crónicos a la salud provocados por los plaguicidas. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas (RAPAM), México.
- Berón, C. M. y Diaz, B. M. 2005. Pathogenicity of hyphomycetous fungi against *Cyclocephala signaticollis*. *BioControl*. 50: 143-150.
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A. y Humber, R. A. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*. 101: 512-530.
- Blackwell, M. 2010. Fungal evolution and taxonomy. *BioControl*. 55: 7-16
- Butt, T. M. y Goettel, M. S. 2000. Bioassays of entomogenous fungi. pp. 141-195. En: Navon, A. y Ascher, K. R. S (Eds). Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. CABI Publishing. New York, USA

- Chetry, Y. D. G., Kelle, S., Nagel, P. y Kafle, L. 2008. Mass production and application of *Metarhizium anisopliae* against white grubs in Nepal. Journal International Cooperation. 3: 15-30.
- Deloya, C. 1993. El género *Phyllophaga* Harris en Cuernavaca, Morelos, México (Coleoptera: Melolonthidae, Melolonthinae). pp. 39-54. En: Morón, M. A. (Comp.) Diversidad y manejo de plagas subterráneas. Sociedad Mexicana de Entomología e Instituto de Ecología, México.
- Dhoj, GC. Y., Keller, S., Nagel, P. y Kafle, L. 2008. Virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against common white grubs in Nepal. Formosan Entomology. 28: 11-20.
- Díaz, M. P. 2002. Abundancia y distribución de especies de gallina ciega (Coleoptera: Melolonthidae), hongos (Hyphomycetes) y nematodos (Nematoda: Heterorhabditidae) entomopatógenos en los Altos de Jalisco, México. Universidad de Colima. Tesis de Maestría. Tecomán, Colima, México. 94 p.
- Dorta, B. y Arcas, J. 1996. Producción de hongos entomopatógenos. pp. 195-206. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Buenos Aires, Argentina.
- Driver, F., Milner, R. J. y Trueman, J. W. H. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. Mycol. Res. 104: 134-150.
- Elliot, E. T. y Coleman, D. C. 1988. Let the soil work for us. Ecological Bulletin. 39: 23-32

- Ferron, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Annual Review of Entomology. 23: 409-442.
- Fierer, N., Schimel, J. P. y Holden, P. A. 2003. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. Soil Biology and Biochemistry. 35: 167-176.
- Galván, C. F., Marín, J. A., Bujanos, M. R., García, L. M. L. y Byerly, M. K. F. 2002. Alternativas de acción hacia el manejo integrado de plagas de suelo en Guanajuato. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Bajío. Celaya, Guanajuato, México. 23 p.
- Genstat Committee. 2005. Genstat 8 Release 8.2 Reference Manual. Oxford University Press, Oxford UK.
- Glare, T. R. 1992. Fungal pathogens of scarabs. pp: 63-77. En: Jackson, T. A y Glare, T. R. (Eds.). Use of pathogens in the scarab pest management. Intercept, Andover, Hampshire, England.
- Goettel, M. S. e Inglis. G. D. 1997. Fungi: Hyphomycetes. pp. 213-249. En: Lacey, L. A. (Ed). Manual of techniques in insect pathology. Academic Press, Inc. California, USA.
- Ho, W. C y Ko, W. H. 1997. A simple method for obtaining single-spore isolates of fungi. Botanical Bulletin of Academia Sinica. 38: 41-44.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous,

P. W., Dai, Y. C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W, Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Kořljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K. H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J. M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J. P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y. J., Zhang, N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological Research*. 111: 509–547

Humber, R. A. 1997. Fungi: Identification. pp: 153-185. En: Lacey, L. A. (Ed). *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press, Inc. California, USA.

Humber, R. A. 1998. Entomopathogenic fungal identification. APS/ESA Workshop. 7 November. Las vegas, NV. U.S.A. 26 p.

Humber, R. A. 2007. Recent phylogenetically based reclassifications of fungal pathogens of invertebrates. <http://arsef.fpsnl.cornell.edu/mycology/phyloclass.pdf>. (Accesada en Julio de 2010)

Humber, R. A. 2008. Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*. 98: 262–266.

Ignoffo, C. M., García, C. Hostetter, D. L. y Pinnell, R. E. 1977. Vertical movement of conidia of *Nomuraea rileyi* through sand and loam soils. *Journal of Economic Entomology*. 70: 163-164.

- Jackson, T. A. 2003. Using entomopathogens in scarab pest management. pp. 327-335. En: Aragón, G. A., Morón, M. A. y Marín, J. A. (Eds). Estudio sobre coleópteros en América. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- Jackson, T. A., Alves, S. B. y Pereira, R. M. 2000. Success in biological control of soil –dwelling insects by pathogens and nematodes. pp. 271-296. En: Gurr, G. y Watten, S. (eds). Biological control: measures of success. Kluwer Academic Publisher. Netherlands.
- Jaronski, S. T. y Jackson, M. A. 2008. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. *Biocontrol Science and Technology*. 18: 849-863.
- Keller, S., Schwizer, C. y Shah, P. 1999. Differential susceptibility of two *Melolontha* populations to infections by the fungus *Beauveria brogniartii*. *Biocontrol Science and Technology*. 9: 444-446.
- Klein, M. G., Grewal, P. S. y Jackson, T. A. 2000. Lawn, turf and grassland pests. pp. 655-675. En: Lacey, L. A. y Kaya, H. K. (Eds.). Field manual of techniques in invertebrate pathology. Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests. Second edition. Springer, Netherlands.
- Lozano, T. M. D., Rodríguez, S. M. N., Vásquez, A. N. C. y Sánchez, G. G. 2000. Efecto de *Metarhizium anisopliae* sobre plagas rizófagas de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) en Colombia. *Manejo Integrado de Plagas*. 56: 58-64.
- Magallanes, C. R. y García, L. M. L. 1988. Efecto de prácticas culturales sobre el daño por plagas subterráneas en maíz de temporal. En: Resúmenes de la

Primera Reunión Científica, Forestal y Agropecuaria. Centro de Investigaciones Forestales y Agropecuarias de Guanajuato. INIFAP, SARH, Guanajuato, México.

Marín, J. A. 2001a. Insectos plaga del maíz. Guía para su identificación. Folleto Técnico Número 1. SAGARPA-INIFAP. Celaya, Guanajuato. 29 p.

Marín, J. A. 2001b. Abundancia del complejo “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae) asociado al cultivo de maíz en el centro de México. Agricultura Técnica en México. 2: 119-131.

Marín, J. A. y Bujanos, M. R. 2008. Especies del complejo “gallina ciega” del género *Phyllophaga* en Guanajuato, México. Agricultura Técnica en México. 34: 349-355.

McCoy, C. W., Storey, G. K. y Tigano-Milani, M. S. 1992. Environmental factors affecting entomopathogenic fungi in the soil. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 27: 107-111.

Milner, R. J. 1992. The selection of strains of *Metarhizium anisopliae* for control of australian sugarcane white grubs. pp: 209-215. En: Jackson, T. A y Glare, T. R. (Eds.). Use of pathogens in the scarab pest management. Intercept, Andover, Hampshire, England.

Morón, M. A. 1986. El género *Phyllophaga* en México. Morfología, distribución y sistemática supraespecífica (Insecta: Coleoptera). Instituto de Ecología. México, D. F. 341.

- Morón, M. A. 1988. Las especies de *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae) con mayor importancia agrícola en México. pp. 81-102. En: Memoria tercera mesa redonda plagas de suelo. Morelia, Michoacán, México.
- Morón, M. A. 1994. Experiencias en América sobre control de Scarabaeidae fitófagos. Simposio de plagas rizófagas. XXI Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. 27-29 de julio de 1994. Medellín. 177 p.
- Morón, M. A. 2003. Diversidad, distribución e importancia de las especies de *Phyllophaga* Harris en México (Coleoptera: Melolonthidae). pp. 1-27. En: G. A., Morón, M. A. y Marín, J. A. (Eds). Estudio sobre coleópteros en América. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- Morón, M. A. 2010. Diversidad y distribución del complejo “gallina ciega” (Coleoptera: Scarabaeoidea). pp. 41-63. En: Rodríguez, D. L. y Morón, M. A. (Eds). Plagas de suelo. Mundi Prensa. México, D. F.
- Morón, M. A., Ratcliffe, B. C. y Deloya, C. 1997. Atlas de los escarabajos de México. (Coleoptera: Lamellicornia). Vol. 1 Familia Melolonthidae. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Sociedad Mexicana de Entomología. México, D. F. 280 p.
- Muhi-ud din, S., Zaki, F. A., Jan, A. y Bhat, F.A. 2006. Dose optimization of promising entomopathogenic fungi against white grub (*Holotrichis* sp.). Journal of Biological Sciences. 6: 958-960.
- Nájera, R. M. 1993. Coleópteros rizófagos asociados al maíz de temporal en el centro del estado de Jalisco, México: Identificación, ecología y control. pp. 143-144. En: Diversidad y manejo de plagas subterráneas (Morón, M. A.,

Compilador). Publicación especial de la Sociedad Mexicana de Entomología e Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz, México.

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

Ortega, O. C. A. 2005. Estudios metodológicos para evaluar el impacto económico de escarabajos Melolonthidae (Insecta: Coleoptera) en tres cultivos tropicales. Tesis de Maestría en Ciencias en Fitoprotección. Escuela Politécnica del Ejército. Palmira, Ecuador. 209 p.

Ownley, B. H., Gwinn, K. D. y Vega, F. E. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. BioControl. 55: 113–128.

Poinar, G. O. y Thomas, G. M. 1978. Laboratory guide to insect pathogens and parasites. Plenum Press. New York, U.S.A. 390 p.

Poprawski, T. J. y Yule, W. N. 1991. Incidence of fungi in natural populations of *Phyllophaga* spp. and susceptibility of *Phyllophaga anixia* (Le Conte) (Coleoptera: Scarabeidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina). Journal of Applied Entomology. 112: 359-365.

Rath, A. C. 1992. *Metarhizium anisopliae* for control of the Tasmania pasture scarab *Adoryphorus couloni*. pp. 217-227. En: Jackson, T. A. (Ed). Use of pathogen in scarabs pest management.

- Rehner, S.A. y Buckley, E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97 (1): 84–98.
- Roy, H. E., Brodie, E. L., Chandler, D. Goettel, M. S., Pell, J. K., Wajnberg, E. y Vega, F. E. 2010. Deep space and hidden depths: understanding the evolution and ecology of fungal entomopathogens. *BioControl*. 55: 1–6.
- Salazar, P. M., M. Gerding G., A. France I., J. Campos P., M. Gerding P., M. Sandoval E. y V. Becerra V. 2007. Desplazamiento de conidias de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* en columnas de tres series de suelo. *Agricultura Técnica (Chile)*: 67: 236-243.
- Samson, R.A., Evans, H.C., Latgé, J. P. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer-Verlag. Wetenschappelijke uitgeverij Bunge, Netherlands. 184 p.
- SAS Institute. 1999. The SAS System for Windows V. 8. SAS Institute. Carry, N.C.
- Steel, R. G. D. y Torrie, J. H. 1988. Bioestadística: Principios y procedimientos. Segunda Edición. McGraw-Hill. 622 p.
- Storey, G. K. y Gardner, W. A. 1987. Vertical movement of commercially formulated *Beauveria bassiana* conidia through four Georgia soil types. *Environmental Entomology*. 16: 178-181.
- Storey, G. K. y Gardner, W. A. 1988. Movement of an aqueous spray of *Beauveria bassiana* into the profile of four Georgia soils. *Environmental Entomology*. 17: 135-139.
- Storey, G. K., Gardner, W. A. y Tollner, E. W. 1989. Penetration and persistence of commercially formulated *Beauveria bassiana* conidia of two tillage systems. *Environmental Entomology*. 18: 835-839.

- Storey, G. K. y McCoy, C. W. 1992. Potential for biological control of soil insects using microbial pesticides in the Caribbean. *Florida Entomologist*. 75: 533-539.
- Sung, G. H., Nigel, L. H. J., Sung, J. M., Luangsa-Ard, J.J. Shrestha, B. y Spatafora, J. W. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology* 57: 5–59.
- Tanada, Y. y Kaya, H. K. 1993. *Insect pathology*. Academic Press, Inc. San Diego, C.A. U.S.A. 666 p.
- Villalobos, F. J. 1992. The potential of entomopathogens for the control of white grub pest of corn in México. pp: 253-260 En: Jackson, T. A y Glare, T. R. (Eds.). *Use of pathogens in the Scarab Pest Management*. Intercept, Andover, Hampshire, England.
- Zimmermann, G. 1992. Use of the fungus *Beauveria brongniartii* for the control on european cockchafers *Melolontha* spp., in Europe. pp: 199-208. En: Jackson, T. A y Glare, T. R. (Eds.). *Use of pathogens in the scarab pest management*. Intercept, Andover, Hampshire, England.
- Zimmermann, G. 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science*. 37: 375-379.