

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

EVALUACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS CONTRA LARVAS DE *PHYLLOPHAGA* Y *ANOMALA* EN CONDICIONES DE LABORATORIO

AUGUSTO JAVIER PEÑA PEÑA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS


MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

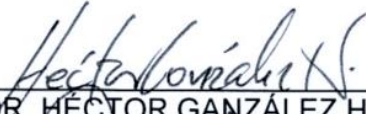
2015


La presente tesis titulada: "Evaluación de hongos entomopatógenos contra larvas de *Phyllophaga* y *Anomala* en condiciones de laboratorio" realizada por el alumno: Augusto Javier Peña Peña; bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:


MAESTRO EN CIENCIAS EN
FITOSANIDAD-ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA


CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA 
DRA. MA. TERESA SANTILLÁN GALICIA

ASESOR 
DR. HÉCTOR GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

ASESOR 
DR. DANIEL TÉLIZ ORTÍZ

ASESOR 
DR. JAVIER SUÁREZ ESPINOZA

ASESOR 
DR. ARIEL W. GUZMÁN FRANCO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, marzo de 2015

Hay una diferencia filosofica entre un derrotado y un vencido.

El derrotado vive un estado psicologico en el cual

hay una predisposición al fracaso

sin oposición por conseguir lo contrario.

Mientras que la palabra vencido viene de victoria,

representa a todas aquellas personas

que realizan su maximo esfuerzo y

no le es suficiente para conseguir su objetivo

A salud de los vencidos

Tohtem

DEDICATORIA

A mi mamá Miroslava Peña Carrillo que con su ejemplo me sigue enseñando a trabajar cada día, a seguir superandome sin importar las dificultades y que lo importante no es cumplir el objetivo si no disfrutar el camino que se hace para siempre tener una sonrisa :D.

A mi familia, principalmente a mis abuelos Gelacio y María Auxilio, mis tios Carlos y Alma Rosa, mis primos Ricardo, Alejandro, Adonai que a la distancia senti su apoyo y cariño para sobrellevar la distancia de estar lejos de casa.

A Carolina Villanueva Rocha (†) el recuerdo de tu amistad es un impulso del por que debo seguir siempre luchando por mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para realización del posgrado.

Al Colegio de Postgraduados por los conocimientos y la experiencia obtenida durante esta etapa.

A la Dra. Ma Teresa Santillán Galicia por haber aceptado ser mi consejera, por la confianza, su paciencia, la amistad y el apoyo en esta gran experiencia.

Al Dr. Ariel Wilbert Guzman Franco por transmitirme sus conocimientos, por su paciencia, constancia y apoyo en la elaboración de esta tesis.

A mis asesores de tesis Dr. Hector Gonzalez, Dr. Javier Suarez Espinosa y Dr. Daniel Telliz por el tiempo, apoyo, paciencia, consejos y motivación depositados en la realización de este trabajo.

A Jorge Hernandez Lopez y a Jhony Navat Enriquez Vera por sus aportaciones a este trabajo fueron invaluableles.

A Davira Palma por su amor y compañía han sido de gran apoyo para mí.

A Flor Ruvalcaba y Naybi Muñoz, con quienes fueron mis compañeras de casa y siempre me aconsejaron y ayudaron para bien, en esta aventura.

A mis amigos del laboratorio de Patología de insectos, Lupita, Carmen y Nuvia, que sus observaciones, jalones de oreja y apoyo que fueron fundamentales para concluir este trabajo.

A mis amigos del laboratorio de Acarología: Paulina Romero, Delfina y Everardo, por los momentos compartidos durante esta etapa.

A mis amigos del posgrado del Colegio: Isis, Alejandro, Patricio, Eber, Emma, Gabriel, Erika, Aurelio, Dina, Karla, Lidia, Ismael, Roxandra y Elvia por su amistad incondicional, consejos, tiempo compartido, todas esas horas de alegría y en esas ocasiones en las que fuimos a degustar de una buena cena a los restaurantes familiares Doopler, Choperia, etc...

A mis amigos de Guadalajara Arturo, Alejandro (Flaco), César (lente), Pedrin, Jarvis y Oscar por que a pesar de la distancia y los años, atesoro todo lo vivido para no olvidar quien soy y a donde me dirijo (Paynos siempre en los mejores eventos).

¡Gracias a todos por todo!

ÍNDICE

	Páginas
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	4
2.1 Objetivo general	4
2.2 Objetivos específicos	4
2.3 Hipótesis	4
3. REVISIÓN DE LITERATURA	5
3.1 Importancia del cultivo del maíz	5
3.2 Importancia del complejo gallina ciega	5
3.2.1 Ciclo de vida	7
3.2.2 <i>Phyllophaga pollyphylla</i>	7
3.2.3 <i>Anomala cincta</i>	9
3.2.4 Estrategias de manejo	9
3.2.4.1 Control químico	9
3.2.4.2 Control con hongos entomopatógenos	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1 Obtención del material biológico	12
4.1.1 Aislamientos de <i>Metarhizium</i>	12
4.1.2 Larvas de gallina ciega	12
4.2 Mortalidad de larvas de <i>P. polyphylla</i> inoculadas con aislamientos monoespóricos y pluriespóricos de <i>M.</i> <i>pingshaense</i> y <i>B. pseudobassiana</i>	12
4.3 Mortalidad de larvas de <i>P. polyphylla</i> al ser infectadas con diferentes especies de <i>Metarhizium</i>	14
4.4 Mortalidad de larvas de <i>A. cincta</i> inoculadas con conidios de <i>M. pingshaense</i> en el sustrato y en semillas de maíz.....	14
4.5 Persistencia de conidios <i>M. pingshaense</i> al aplicarse en semillas de <i>Zea mays</i>	16
5. RESULTADOS	17

5.1 Mortalidad de larvas de <i>P. polyphylla</i> inoculadas con aislamientos monoespóricos y pluriespóricos de <i>M. pingshaense</i> y <i>B. pseudobassiana</i>	17
5.2 Mortalidad de larvas de <i>P. polyphylla</i> al ser infectadas con diferentes especies de <i>Metarhizium</i>	18
5.3 Mortalidad de larvas de <i>A. cincta</i> inoculadas con conidios de <i>M. pingshaense</i> en el sustrato y en semillas de maíz	18
5.4 Persistencia de conidios <i>M. pingshaense</i> al aplicarse en semillas de <i>Zea mays</i>	19
6. DISCUSIÓN	20
7. CONCLUSIONES	24
8. LITERATURA CITADA	25

ÍNDICE DE CUADROS

	Páginas
Cuadro 1 Mortalidad de larvas de <i>P. polyphylla</i> con diferentes especies de <i>Metarhizium</i>	18

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1 Gráfica de mortalidad de larvas de <i>P. polyphylla</i>	17
Figura 2 Gráfica de mortalidad de larvas de <i>A. cincta</i>	19
Figura 3 Gráfica de persistencia de los aislamientos de <i>M. pingshaense</i> a través del tiempo	20

**EVALUACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS CONTRA
LARVAS DE *PHYLLOPHAGA* Y *ANOMALA* EN CONDICIONES DE
LABORATORIO**

AUGUSTO JAVIER PEÑA PEÑA. MC

Colegio de Posgraduados. 2015

RESUMEN

La producción de maíz (*Zea mays*) se ve disminuida año con año, hasta en un 30% a causa de diversos grupos de insectos nocivos, de éstos destaca el complejo de diferentes géneros de gallina ciega (*Phyllophaga*, *Anomala*, *Paranomala* y *Cyclocephala*). Con el fin de aportar información para el control biológico de estas especies de gallina ciega, se evaluaron aislamientos de los hongos entomopatógenos *Metarhizium pingshaense* (dos) y *Beauveria pseudo bassiana* (dos) en larvas de las especies *P. poliphylla* y *A. cincta*. Primero se evaluó el efecto de aislamientos mono y pluriespóricos de estos cuatro aislamientos en *P. poliphylla*; posteriormente se evaluaron diferentes especies del género *Metarhizium* (*M. anisopliae*, *M. pingshaense* y *M. robertsii*) contra esta misma especie. En otro experimento, se evaluó el efecto de conidios de *M. pingshaense* inoculados como suspensión y en semillas de maíz en larvas de *A. cincta*. Finalmente, se estudió la capacidad de colonización endofítica de dos aislamientos de *M. pingshaense* en maíz. La mortalidad obtenida en larvas de *P. poliphylla* nunca fue superior al 10% al evaluarse las versiones mono y pluriespóricas de *M. pingshense* y *B.*

pseudobassiana, así como las diferentes especies de *Metarhizium*. Las mortalidades de *A. cincta* inoculadas con conidios de *M. pingshaense* fueron del 90 y 50% al ser aplicadas en suspensión y en semillas de maíz, respectivamente. Ambos aislamientos de *M. pingshaense* lograron colonizar endofíticamente a plantas de maíz. Es necesaria la búsqueda de aislamientos más virulentos para el control biológico de *P. poliphylla*. La aplicación de conidios de *M. pingshaense* en semillas de maíz puede ser una estrategia de control biológico para *A. cincta*, de bajo costo y altamente efectiva.

**EVALUATION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS AGAINST
PHYLLOPHAGA AND ANOMALA LARVAE IN LABORATORY**

AUGUSTO JAVIER PEÑA PEÑA. MC

Colegio de Posgraduados. 2015

ABSTRACT

Production of maize (*Zea mays*) is diminished every year, up to 30% due to various groups of harmful insects, they highlighted the complex of different genres of grubs (*Phyllophaga*, *Anomala*, *Paranomala* and *Cyclocephala*). In order to provide information for the biological control of these species of white grubs, isolates of entomopathogenic fungi *Metarhizium pingshaense* (two) and *Beauveria bassiana* pseudo (two) in larvae of the species *P. poliphylla* and *A. cincta* were evaluated. First the effect of mono and pluriesporic isolates of these four isolates was assessed *P. poliphylla*; later different species of *Metarhizium* (*M. anisopliae*, *M. robertsii* and *M. pingshaense*) against this same species were evaluated. In another experiment, the effect of *M. pingshaense* conidia suspension and inoculated as corn seed *A. cincta* larvae was assessed. Finally, the ability of endophytic colonization of two isolates of *M. pingshaense* studied in maize. The mortality obtained in larvae of *P. poliphylla* was never higher than 10% monosporic versions pluriesporic *M. pingshaense* and *B. pseudobassiana* evaluated and different species of *Metarhizium*. The mortalities of *A. cincta* inoculated with conidia of *M. pingshaense* were 90 and 50% when applied slurry and maize, respectively. Both isolates of *M. pingshaense* endophytically achieved

colonize maize plants. Finding more virulent isolates for biological control of *P. poliphylla* is required. The application of conidia of *M. pingshaense* in maize seeds can be a biological control strategy for *A. cincta*, inexpensive and highly effective.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de maíz (*Z. mays*) es originario de México, el cual se inicio desde la domesticación del teocintle (*Z. perennis*) por las culturas prehispánicas de nuestro país. Actualmente es el cultivo con mayor superficie en todo el mundo, y en el año 2013 también lo fue en nuestro país con más de siete millones de hectáreas, con una producción de 76 millones de pesos, de los cuales resaltan los estados de Sinaloa, Jalisco, Michoacán, Guanajuato, por ser los de mayor producción según datos de SAGARPA (2014).

Sin embargo, la producción de maíz se ve disminuida año con año en un 30% a causa de diversos grupos de insectos nocivos que se alimentan de estas plantas y afectan económicamente al campo mexicano (Rodríguez y Marín, 2008). Rodríguez y Marín (2008) mencionan 23 insectos que se consideran plaga para este cultivo y que se encuentran en México. De estos se puede resaltar el complejo de larvas llamado gallina ciega que afecta entre 400 a 500 ha en las principales zonas maiceras mexicanas (Ruiz *et al.*, 2012). La gallina ciega principalmente incluye los géneros: *Phyllophaga*, *Anomala*, *Paranomala*, *Cyclocephala*, del primero se han reportado 386 especies distribuidas tan solo en México (Morón, 2010).

Estas larvas se caracterizan por vivir en el suelo y alimentarse de las raíces, por lo que las plantas de maíz manifiestan un desarrollo deficiente, una coloración violeta asociado a la deficiencia de fósforo, con daño mas severo

ocasiona plantas marchitas y por último la muerte. En una parcela pueden llegar a ocasionar pérdidas de un 50 a 90% de la producción esperada (Ruiz *et al.*, 2012). Las medidas de control más usadas son el barbecho y el control químico durante la siembra (Rodríguez y Marín, 2008), aunque este último presenta dos desventajas: contamina el ambiente y los insectos que se quieren controlar pueden llegar a generar resistencia a sus ingredientes activos (Loera *et al.*, 2010). Es por esto que es necesario encontrar otras estrategias para manejar estas plagas.

Una estrategia amigable con el ambiente para el manejo de la gallina ciega es el control biológico, el cual puede basarse en el uso de hongos entomopatógenos. De manera natural, esta plaga al estar en el suelo se expone a una gran cantidad de microorganismos y algunos de ellos tienen la capacidad de infectarlas y ocasionarles la muerte, por lo que es común encontrar larvas infectadas por hongos (Hernández *et al.*, 2010). Como ejemplo está el trabajo realizado por Carrillo-Benítez *et al.* (2013) quienes encontraron 17 aislamientos de *Beauveria* spp. y dos de *Metarhizium* spp. infectando gallina ciega en el cultivo de maíz en Guanajuato.

Debido a que el uso de microorganismos entomopatógenos implica un amplio entendimiento de las interacciones bióticas y abióticas del suelo, es importante realizar investigaciones en laboratorio que puedan tener impacto en el campo. Estudios previos del efecto de hongos entomopatógenos en larvas de *P. polyphylla*, han reportado mortalidades no mayores al 10% (Guzmán-Franco *et al.*, 2012; Enríquez-Vara *et al.*, 2012), esto sugiere que hace falta un mayor

entendimiento de la relación hongo-insecto, para poder incrementar las mortalidades obtenidas y generar métodos de control alternativos al químico de esta plaga. Aunado a esto, también se requiere el estudio de métodos más eficaces de inoculación de estos hongos en campo, y lograr mortalidades de la plaga que representen un menor daño de la planta, y al mismo tiempo que no representen un costo más elevado que el control químico, para que pueda ser aceptado por el agricultor.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo general

Evaluar algunos factores que pueden modificar la relación hongo-insecto, y que puedan generar información que ayude a la implementación de hongos entomopatógenos en suelo para el control de larva de gallina ciega.

2.2 Objetivos particulares

- Evaluar la mortalidad de larvas de *P. polyphylla* al inocularlas con cultivos mono y pluriespóricos de *M. pingshaense*.
- Evaluar la mortalidad que ocasionan diferentes especies de *Metarhizium* en larvas de *P. polyphylla*.
- Evaluar si la aplicación de conidios de *M. pingshaense* en semillas de maíz puede ocasionar mortalidad en larvas de *A. cincta*.
- Evaluar de la persistencia de *M. pingshaense* al estar asociado con raíces de semillas de maíz.

2.3 Hipótesis

La diversidad genética intra-específica e inter-específica de los hongos entomopatógenos puede modificar los niveles de mortalidad al aplicarlos en larvas de *P. polyphylla*. Así mismo, la asociación de conidios de *M. pingshaense* con las raíces de maíz, le confiere mayor persistencia al hongo, ocasionando mortalidades comparables con una aplicación inundativa de esta especie de patógeno.

3. REVISION DE LITERATURA

3.1 Importancia del maíz

El cultivo del maíz es el cereal de mayor importancia a nivel mundial, debido a la diversidad de usos que se le puede dar como producto de consumo, tanto para humanos como para animales, o en la industria (almidón, glucosa, dextrosa, fructosa, aceite, etanol) (SIAP, 2007). En el año 2013, este representó para nuestro país, el cultivo con mayor superficie sembrada, con más de 7 millones de hectáreas, con un rendimiento de 2.63 ton/ha a nivel nacional y con una derrama económica de 76 millones de pesos. La producción de maíz grano representa el 85% del volumen nacional de cereales en México. Los estados de mayor producción son Sinaloa, Jalisco, Michoacán, Guanajuato (SAGARPA, 2014).

3.2 Importancia de la gallina ciega

El complejo de gallina ciega comprende los géneros de *Phyllophaga*, *Anomala*, *Dyscinetus*, *Strategus*, *Eutheola*, *Orizabus*, *Ligyris*, *Euphoria* y *Cotinis*, (Morón 1984, Deloya 1993). El género de mayor distribución en el estado de Guanajuato es *Cyclocephala*, aunque también es común encontrar *Anomala* spp. y *Phyllophaga* spp. (Marín y Bújanos, 2003).

El grupo de especies que se le denomina gallina ciega afecta entre 400 a 500 ha en las principales zonas maiceras mexicanas (Ruiz *et al.*, 2012). Es un insecto que se le considera rizófago por que la mayor parte de su ciclo de vida (larva y pupa) vive en el suelo, sus hábitos alimenticios se caracterizan por consumir materia orgánica en descomposición, heces, hojarasca, y tejido

vegetal vivo (Morón, 2001). Las preferencias por el tipo de alimento puede variar entre estadio, especie y géneros; por ejemplo, en larvas del género *Paranomala* y *Hoplia* se reporta que tiene preferencias por suelos con alto contenido de materia orgánica, esto no aplica en su totalidad en el caso de *Phyllophaga* ya que se reporta que puede sobrevivir en diferentes tipos de suelo independientemente de su contenido de materia orgánica (Nájera y Jackson, 2010)

A partir de que planta de maíz ha desarrollado de cinco a diez hojas y su sistema radicular ha crecido lo suficientemente profundo, es cuando la larva entra en contacto con éste y se empieza a alimentar. El daño se observa mucho tiempo después, hasta que la planta de maíz esta en edad reproductiva, y ya es tarde para establecer una estrategia de manejo (Ramírez y Castro, 2000). Los síntomas que se pueden apreciar es deficiencia de fósforo asociada a una coloración violeta, con daño mas severo ocasiona plantas marchitas y por último la muerte (Ruiz *et al.*, 2012). En Oaxaca reportan que el daño por alguna de las especies de gallina ciega puede representar pérdidas en un 50 a 90% de la producción esperada (Ruiz *et al.*, 2012), mientras que en Michoacán señalan que aun con la aplicación de algún insecticida químico, la disminución de la producción esta entre un 15 y 25% (Nájera, 2010), para este mismo estado pero con la especie *P. vetula* reportan pérdidas de hasta un 100% (Nájera y Jackson, 2010). En el estado de Tamaulipas se reporta que *P. crinita* disminuye el rendimiento en un 40%, pero en altas infestaciones este daño puede llegar al 100% (Rodríguez, 2010). Para Puebla se han estimado pérdidas en un 48 % para el género *Phyllophaga* (Aragón *et al.*, 2010)

3.2.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida de las gallinas ciegas es muy largo y variable, ya que hay especies anuales, bianuales y trianuales. Al iniciar las primeras lluvias, los adultos emergen en las primeras horas de la noche para atraer a sus parejas y copular. Después de la copula las hembras buscan el lugar con las mejores condiciones (materia orgánica, humedad e insolación) para ovipositar. Los huevos son depositados a una profundidad de 10 a 20 cm; se caracterizan por tener una forma alargada y de un color perla. Las larvas presentan un cuerpo en forma de letra “C”, son de color blanco, cabeza café oscuro y tienen tres pares de patas. Las pupas son de color café y no tienen la capacidad de moverse (García, 2007)

3.2.2 *Phyllophaga polyphylla*

El género *Phyllophaga* es originario del continente americano y en México se han citado 400 especies aproximadamente (García, 2007). *P. polyphylla* ha sido reportado en los estados de Jalisco, Michoacán, Aguascalientes y Guanajuato (García *et al.*, 2009). Es considerado de mayor importancia agronómica porque ataca varios cultivos en México (Morón *et al.*, 2010). Las larvas se caracterizan por una abertura anal en forma de “Y” o “T”, y las mandíbulas carecen de áreas estriduladoras ventrales (Bautista, 2006). En algunas especies de *Phyllophaga* el hábito alimenticio va cambiando entre cada instar; en el primero se alimentan de materia orgánica degradada (humus), en el segundo instar empiezan a comer raíces vivas mezcladas con humus, y en el tercero sólo consumen tejido vegetal (raíces, tubérculos o tallos) (Morón *et al.*, 2010). Estos daños se observan en campo, en el cultivo de maíz, principalmente en manchones

(Garcia, 2007). Los adultos se les conoce con el nombre de mayates, son de color café y el cuerpo es ovalado, sus uñas tarsales son bífidas y presentan coxas anteriores transversales (Bautista, 2006). También se le ha encontrado asociada al cultivo de agave tequilero (Garcia *et al.*, 2009) y pueden alimentarse del follaje de diferentes árboles, así como de flores, frutos y polen (Garcia, 2007).

3.2.3 *Anomala cincta*

En el mundo se reportan más de mil especies de este género (Ramírez y Morón, 2009); en México se han identificado sólo 77 especies (García, 2007). *A. cincta* se ha reportado en algunas regiones del estado de Morelos, y Guanajuato (Aragón *et al.*, 2001). El adulto se puede diferenciar fácilmente de *Phyllophaga* por su color metálico aunque éste puede variar (Aragón *et al.*, 2001). Las características distintivas son sus uñas tarsales dentadas desiguales en longitud y grosor, la de mayor tamaño tiene una hendidura y la menor es sencilla (Bautista, 2006). Las larvas presentan una abertura anal transversal y las mandíbulas tienen áreas estriduladoras ventrales (Bautista, 2006).

En los meses de mayo a junio es cuando hay más presencia de adultos (García, 2007). Se le ha encontrado en el cultivo de la caña, maíz, y cacahuate, pero no se sabe con certeza si es de hábitos rizófagos, saprófagos o facultativos (Aragón *et al.*, 2001), pero se les ha encontrado alimentándose de flores y hojas de *Pithecellobium dulce* (guamúchil) (Aragón *et al.*, 2001).

3.2.4 Estrategias de manejo

3.2.4.1 Control químico

El uso de insecticidas químicos para controlar plagas del suelo es la estrategia de mayor uso. Los insecticidas granulados son los más comunes en las regiones de Jalisco y Michoacán, los cuales se usan mezclados con el fertilizante. Para una mejor efectividad se recomienda que la aplicación sea al surco e incorporarse al suelo para evitar su volatilización. Se pueden usar insecticidas sistémicos que se aplican directamente a la semilla (Loera *et al.*, 2010).

Aunque en México los estudios son escasos, hay reportes de que el uso excesivo de estos productos ha ocasionado que algunas gallinas ciegas presenten niveles de resistencia a algunos insecticidas como es el caso de *C. comata* a carbofuran y terbufos (Ponce *et al.*, 1994). Otras especies de *Phyllophaga* y *Cyclocephala* presentan resistencia tóxica a los productos clorpirifos, diazinon, carbofuran y bufencarb (Ponce *et al.*, 2006).

3.2.4.2 Control con hongos entomopatógenos

Los hongos del género *Metarhizium* son conocidos por su capacidad de infectar y ocasionar la muerte al complejo de gallina ciega (Hiromi y Nishigaki, 2001; Samson *et al.*, 2005; Enríquez *et al.*, 2012; Guzmán *et al.*, 2012). Se dice que estos hongos actúan por contacto, ya que estos infectan a las larvas por medio del esporas (conidios) (Hernández *et al.*, 2010). Al estar en contacto el conidio con el insecto, este se hincha la región apical de los tubos germinativos formando un apresorio, esto con el objetivo de adherirse a la cutícula del

insecto. Para que el hongo pueda degradar los componentes de la cutícula intervienen una gran cantidad de enzimas de las cuales los principales degradadores son proteasas, serína proteasas, cisteína proteasa, carboxipeptidasas por mencionar algunas. Ya que el hongo se encuentra en el hemocele, la colonización se realiza por medio del micelio y unas estructuras llamadas blastosporas. Dentro de la hemolinfa este consume los carbohidratos que se encuentran en esta, ocasionando desnutrición y daños mecánicos en el interior del insecto y por ultimo la muerte (Alatorre, 2007; Hernández *et al.*, 2010).

También se han realizado estudios para evaluar a los hongos *B. brongniartii* (Bhattacharyya y Pujar; 2014; Goble *et al.*, 2014) y *B. bassiana* (Goble *et al.*, 2014), los cuales fueron obtenidos de campos agrícolas donde se registraron epizootias en los escarabajos *Schizonycha affinis* y *Hypopholis sommeri*. En larvas de *S. affinis* se observó una mortalidad que va desde el 50 al 95%. Se han realizado estudios de las interacciones de la aplicación de alguno de estos microorganismos en combinaciones de hongos y nematodos entomopatógenos (Wu *et al.*, 2014; Martínez, 2014) pero no todos coinciden con resultados muy prometedores. Además se han identificado a bacterias de los géneros *Bacillus*, *Psychrobacter*, *Paracoccus*, *Peanibacillus*, *Mycrobacteriu*, *Staphylococcus* y *Novosphingobium* obtenidas de la gallina ciega *Brahmina cariaea* y evaluadas contra larvas de este mismo insecto, donde *Bacillus cereus* ocasiono una mortalidad mayor al 50% (Sharma *et al.*, 2012). En México, en suelos agrícolas del estado de Guanajuato, se ha encontrado a los hongos *B. bassiana*, *B. pseudobassiana* y *M. robertsii* (Pérez *et al.*, 2014). De esta misma región se

obtuvieron directamente de larvas de gallina ciega (*Phyllophaga*) a los hongos *M. pingshaense*, *M. anisopliae*, *M. robertsii* y *B. pseudobassiana* (Carrillo-Benítez *et al.*, 2012). También se reporta la presencia del hongo entomopatógeno *Paecilomyces* asociado a larvas de *Phyllophaga* en el estado de Morelos (Hernández *et al.*, 2011). Guzmán-Franco *et al.* (2012) evaluaron a los hongos *M. anisopliae* y *B. bassiana* contra larvas de *P. polyphylla* y *A. cincta*, ellos reportan que la mortalidad de *P. polyphylla* nunca fue mayor del 20% mientras que *A. cincta* fue del 90%, por lo que concluyen que esta especie es más susceptible al ataque de estos hongos.

Los aislamientos que se usan como hongos entomopatógenos en su mayoría son de origen monospórico, los cuales se obtienen de una espora asexual. Al ser una espora asexual haploide, la variabilidad genética y las mutaciones que podrían llegar a presentarse son muy escasas. Por el contrario, los cultivos pluriespóricos son compuestos por varios conidios, y muy probablemente con diferente información genética, los cuales en conjunto pueden llegar a presentar diferentes características patogénicas y de adaptación al ambiente (Deacon, 2006).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Obtención del material biológico

4.1.1 Aislamientos de *Metarhizium*

Las cepas se obtuvieron de la colección del laboratorio de Patología de insectos del Colegio de Postgraduados del campus Montecillo, las cuales fueron colectadas en campos agrícolas del estado de Guanajuato. Se usaron cinco aislamientos, dos de la especie *M. pingshaense* (GC01 y GC02), y tres de la especie *B. pseudonassiana* (GC03, GC06 y GC15). Adicionalmente, se consiguieron tres aislamientos de la colección del USDA (ARSEF), U.S.A.; pertenecientes cada uno a las especies *M. anisopliae* s.l. (ARSEF 8837), *M. robertsii* (ARSEF 2134) y *M. anisopliae* s.s. (ARSEF 3924).

4.1.2 Larvas de gallina ciega

Las larvas de *P. polyphylla* y *A. cincta* se obtuvieron en la localidad de San Lorenzo, Municipio de Jerecuaro, estado de Guanajuato.

4.2 Mortalidad de larvas de *P. polyphylla* inoculadas con aislamientos

monoespóricos y pluriespóricos de *M. pingshaense* y *B. pseudobassiana*

Se usaron los aislamientos monospóricos y pluriespóricos GC01 y GC02 de *M. pingshaense*, y los aislamientos GC03 y GC15 de *B. pseudobassiana*, ambas versiones de cada uno de estos aislamientos se consideró como un tratamiento, por lo que se tuvieron en total ocho tratamientos. La metodología de inoculación de cada tratamiento fue el mismo. Se usaron larvas de *P.*

polyphylla de tercer instar, las cuales antes de la inoculación con los aislamientos, se enjuagaron con agua destilada estéril y luego se dejaron secar sobre papel absorbente. Para la inoculación con cada tratamiento, las larvas se inocularon en grupos de 24 individuos, estos se sumergieron en 20 mL de una suspensión de conidios con una concentración de 1×10^8 conidios mL^{-1} durante 20 segundos. Las larvas del tratamiento testigo fueron sumergidas únicamente en una solución Tween 80 al 0.03%. Las larvas inoculadas se colocaron en dos placas de cultivo de tejidos con 12 orificios cada una, una larva por orificio, y se incubaron a 25 °C a oscuridad total. Las larvas se alimentaron con rodajas de zanahoria. La mortalidad se registró cada tercer día durante un mes que duró el experimento.

Este trabajo se realizó bajo un diseño completamente al azar, donde todos los tratamientos se realizaron el mismo día, y todo el experimento se realizó en tres ocasiones diferentes. Debido a que no hubo mortalidad en el tratamiento testigo, estos datos se excluyeron del análisis. Los datos del experimento se analizaron mediante regresión logística con aislamiento y versión (pluriespórica y monoespórica) como factores principales usando el programa GenStat v. 8 (Payne *et al.*, 2005).

4.3 Mortalidad de larvas de *P. polyphylla* al ser inoculadas con diferentes especies de *Metarhizium*

Las inoculaciones se realizaron de la misma manera descrita en el punto 4.2. Los tratamientos fueron *M. pinghsaense* (GC01), *M. anisopliae* s.l. (ARSEF 8837), *M. robertsii* (ARSEF 2134), *M. anisopliae* s.s. (ARSEF 3924) y un tratamiento testigo al cual sólo se le aplicó Tween 80 al 0.03%. Posteriormente, las larvas se incubaron a 25 °C en total oscuridad. La mortalidad se registró cada tercer día durante 30 días. Para este experimento no se realizó análisis estadístico debido a que sólo se hizo una repetición por insuficiencia de larvas.

4.4 Mortalidad de larvas de *A. cincta* inoculadas con conidios de *M. pingshaense* en el sustrato y en semillas de maíz

Antes de usarse, las semillas de maíz se desinfectaron con cloro y posteriormente se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril. De éstas, se seleccionaron 60, las cuales se sumergieron durante 24 horas en una suspensión de conidios de *M. pingshaense* (aislamiento GC02) a una concentración de 1×10^8 conidios mL⁻¹ (Tratamiento 1). Otras 180 semillas se sumergieron durante el mismo tiempo en Tween 80 al 0.03%. Tanto las semillas tratadas con la suspensión de conidios, como las tratadas únicamente con Tween 80 al 0.03% fueron depositadas en grupos de tres semillas, en vasos de 1 litro de plástico conteniendo 800 gr de peat moss estéril. En total se hicieron cuatro grupos de 20 vasos, un grupo conteniendo las semillas tratadas con conidios de *M. pingshaense*, y los otros tres grupos conteniendo semillas de maíz tratadas únicamente con Tween 80 al 0.03%.

Los cuatro grupos de 20 vasos fueron incubados a una temperatura de 25°C con un fotoperiodo de 16:8 luz oscuridad por una semana para permitir la germinación de las semillas de maíz. Al término de este periodo, en uno de los tres grupos de 20 vasos donde se depositaron semillas tratadas con Tween 80, en cada uno de los 20 vasos se inocularon 2 mL de una suspensión de conidios de *M. pingshaense* (aislamiento GC02) a una concentración de 1×10^8 conidios mL⁻¹. A otro grupo conteniendo semillas tratadas únicamente con Tween 80 al 0.03% (tratamiento testigo), como al grupo de vasos conteniendo semillas tratadas con conidios de *M. pingshaense*, se depositaron en cada vaso 2 mL de Tween 80 al 0.03%. Al cuarto grupo de vasos conteniendo semillas tratadas con Tween 80 no se le aplicó nada (testigo absoluto). Posteriormente, en cada uno de los vasos de los cuatro tratamientos se colocó una larva de *A. cincta* de tercer instar. La mortalidad se registró cada tercer día durante un mes. Todos los tratamientos se incubaron a 25°C con un fotoperiodo de 18 h luz y 6 h oscuridad. Este trabajo se realizó bajo un diseño completamente al azar, donde todos los tratamientos se realizaron el mismo día, y todo el experimento se repitió en cuatro ocasiones diferentes. Debido a que no hubo mortalidad en ambos tratamientos testigo (Tween 80 y absoluto), estos datos se excluyeron del análisis. Los datos del experimento se analizaron mediante regresión logística, en donde el factor principal fue el tipo de inoculación, usando el programa GenStat v. 8.

4.5 Persistencia de conidios de *M. pingshaense* en semillas de maíz

Este experimento se realizó con la misma metodología del punto 4.4 para inocular las semillas. Se usaron contenedores de un litro con peat moss estéril, a los cuales se les colocaron dos semillas por tratamiento. En este experimento, además del aislamiento MGC02, se incluyó el aislamiento MGC06 de la misma especie, sólo para comparación. El tratamiento testigo consistió en semillas sumergidas solo en Tween 80 al 0.03%. Todos los tratamientos se incubaron a 25 °C con un fotoperiodo de 18 h luz y 6 h oscuridad. La persistencia de conidios de *M. pingshaense* se estimó mediante la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) a los 3, 5, 8 y 16 días posteriores a la inoculación, utilizando una unidad experimental (vaso con dos semillas de maíz) diferente para cada fecha de muestreo. Para la cuantificación de UFC en cada fecha de muestreo, se tomó un gramo del suelo asociado a la raíz y se depositó en 10 mL de una solución de Tween 80 al 0.03%. De la suspensión resultante, se tomaron 100 µL, los cuales se colocaron en una caja Petri con medio de cultivo selectivo CTC (1000mL H₂O, 36 gr. PDA, 200 µL. tiabendazol, 0.5 gr extracto de levadura, 5 mL clorfenicol, 2.5 mL ciloexamida). Este procedimiento se repitió dos veces para cada unidad experimental, uno por cada semilla de maíz. Las cajas se incubaron a 25°C a oscuridad total. Para la cuantificación de UFC en cada fecha de muestreo, cada caja Petri se dividió en cuatro secciones, y en una de ellas se contaron las UFC. El conteo se realizó a las 24 y 48 horas posteriores a la fecha establecida de muestreo. El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar, con cinco repeticiones por aislamiento y fecha de muestreo. Los datos del experimento se analizaron mediante análisis de varianza con aislamiento y

fecha de muestreo como factores principales, y su interacción. Previo al análisis, los datos se transformaron mediante el cálculo de la raíz cuadrada de cada valor. Los análisis y transformación de los datos se hicieron en el programa GenStat v. 8.0.

5. RESULTADOS

5.1 Mortalidad de larvas de *P. polyphylla* inoculadas con aislamientos monoespóricos y pluriespóricos de *M. pingshaense* y *B. pseudobassiana*

La mortalidad de larvas de *P. polyphylla* fue similar entre todos los aislamientos ($F_{3,14}=0.74$, $P=0.543$). Tampoco se observaron diferencias significativas al comparar los cultivos pluri y monoespóricos ($F_{1,14}=0.39$, $P=0.54$) (Figura 1).

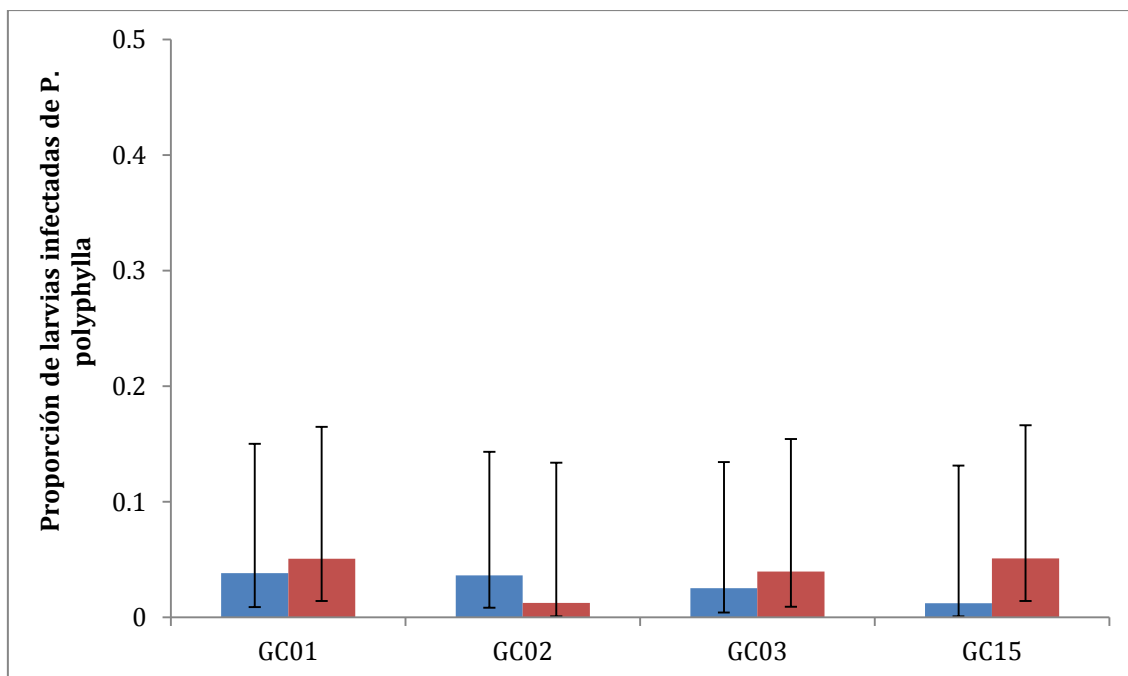


Figura 1. Gráfica de mortalidad de larvas de *P. polyphylla*. Barras azules cultivos monoespóricos, barras en color rojo cultivos pluriespóricos. Las barras

de error representan intervalos de confianza (95%) transformados de la escala logística.

5.2 Mortalidad de larvas de *P. polyphylla* al ser inoculadas con diferentes especies de *Metarhizium*

Para este experimento no se realizó análisis estadístico debido a que sólo se hizo una repetición. Los datos que se muestran en el Cuadro 1 nos señalan la baja mortalidad que se obtuvo en larvas de *P. polyphylla*.

Cuadro 1. Mortalidad de larvas de *P. polyphylla* con diferentes especies de *Metarhizium*.

Tratamientos	Mortalidad de larvas
Control	0
<i>M. anisopliae</i> s.l.	3
<i>M. pingshaense</i>	3
<i>M. robertsii</i>	3
<i>M. anisopliae</i> s.s.	1

5.3 Mortalidad de larvas de *A. cincta* inoculadas con conidios de *M. pingshaense* en el sustrato y en semillas de maíz

Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($X^2_1=310.49$, $P<0.001$). La mayor mortalidad se obtuvo en el tratamiento donde se inocularon 2 mL de la suspensión de conidios, comparado con la mortalidad obtenida en el

tratamiento donde los conidios se inocularon junto con las semillas de maíz (Figura 2).

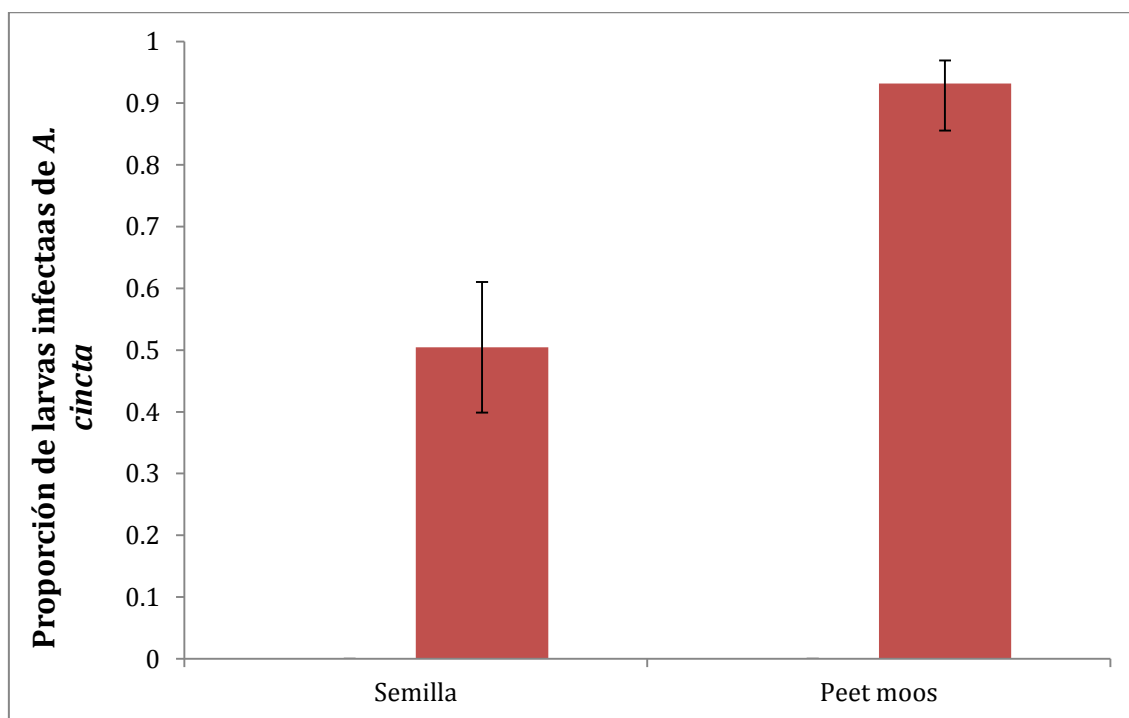


Figura 2. Mortalidad de larvas de *A. cincta* inoculadas con conidios de *M. pingshaense*, mediante una suspensión de conidios y en semillas de maíz. Las barras de error representan intervalos de confianza (95%) transformadas de la escala logística.

5.4 Evaluación de la persistencia de *M. pingshaense* al aplicarse en semillas de *Zea mays*

Se observaron diferencias significativas al comparar la persistencia de los aislamientos de *M. pingshaense* en los diferentes días ($F_{1, 63}=24.41$, $P<0.001$). La mayor cantidad de UFC se obtuvo a los cinco días posteriores a la inoculación para ambos aislamientos. El aislamiento MGC02 obtuvo la mayor persistencia comparado con el aislamiento MGC06 ($F_{3,63} =53.56$, $P<0.001$). Al

evaluar la interacción de estos dos factores se concluye que no hay interacción ($F_{3,63}=1.11$, $P=0.352$). (Figura 3).

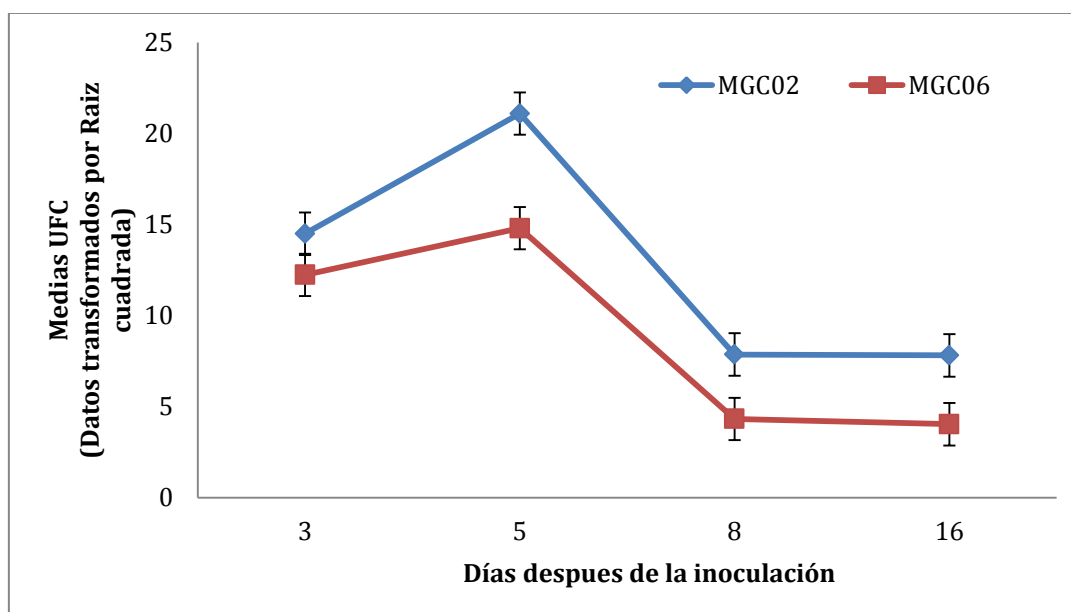


Figura 3. Gráfica de persistencia de los aislamientos de *M. pingshaense* a través del tiempo. Las barras de error representan \pm error estándar de la media.

6. DISCUSIÓN

P. poliphylla es una de las principales plagas que afectan a maíz en diversos lugares de México, incluyendo el estado de Guanajuato (Marin-Jarillo y Bujanos, 2003). Esta plaga ha mostrado una resistencia muy fuerte a la infección por hongos, ya que en experimentos previos se obtuvo una mortalidad máxima del 10% (Guzmán-Franco *et al.*, 2012; Enríquez-Vara *et al.*, 2012). Todos estos experimentos se realizaron usando versiones monospóricas de los mismos aislamientos usados en esta investigación. En un

esfuerzo para tratar de incrementar la mortalidad por hongos en larvas de *P. polyphylla*, se evaluaron versiones mono y pluriespóricas de estos aislamientos, ya que reportes previos señalan una mayor mortalidad por aislamientos pluriespóricos comparados con monospóricos de *M. anisopliae* en adultos de la mosca pinta *Aeneolamia postica* (Torres *et al.*, 2013); sin embargo, los resultados obtenidos muestran una resistencia similar a ambas versiones de los aislamientos bajo estudio, es muy probable que esto se deba a que la principal barrera de esta especie de gallina ciega hacia la infección está en la cutícula (Enríquez-Vara *et al.*, 2014), lo cual probablemente sea el resultado de que este estado larval sea habitante de suelo, por lo que convive con diversos microorganismos patógenos, de manera que ha desarrollado resistencia a diversos microorganismos incluyendo diferentes genotipos de una misma especie de patógeno, situación similar al uso de las dos versiones (mono y pluriespóricas) de los aislamientos estudiados.

La baja mortalidad obtenida en larvas de *P. polyphylla* cuando se inocularon con diferentes especies de *Metarhizium*, confirman que esta especie de gallina ciega es resistente al ataque de diferentes especies de organismos patógenos de insectos presentes en suelo, ya que nuevamente nunca se obtuvo una mortalidad mayor al 10%. Esto confirma que esta especie de gallina ciega invierte gran parte de sus recursos energéticos en una cutícula capaz de proteger a la larva de la infección por diversos patógenos habitantes de suelo (Enríquez-Vara *et al.*, 2012).

Interesantemente, *A. cincta*, otra especie de gallina ciega que co-existe con *P. polyphylla*, es altamente susceptible a los aislamientos de *M. pingshaense* (Guzmán-Franco *et al.*, 2012; Enríquez-Vara *et al.*, 2012) estudiado en este trabajo. No es claro el porqué de esta diferencia en susceptibilidades en estas dos especies ocupando el mismo espacio. Se ha sugerido que probablemente *A. cincta*, al ser una especie más asociada a materia orgánica, este en contacto con un menor número de organismos patógenos en comparación con *P. polyphylla* quien es una especie mayormente rizófaga (Enríquez-Vara *et al.*, 2012); sin embargo, esto aún requiere de confirmación experimental. Es importante, sin embargo, aprovechar esta susceptibilidad de *A. cincta* hacia *M. pingshaense* para evaluar diferentes formas de inoculación en campo y así lograr reducir poblaciones de esta especie mediante hongos entomopatógenos. Con base en esto, se evaluó la posibilidad de infectar larvas de *A. cincta* al estar en contacto con semillas de maíz inoculadas con un hongo entomopatogeno , ya que con esto se reducirían costos al hacer inoculaciones que pondrían en contacto directo al insecto y al patógeno, comparado con inoculaciones inundativas del hongo. Nuestros resultados sugieren este método como altamente potencial para la reducción de poblaciones de larvas de *A. cincta* mediante *M. pingshaense*, ya que se obtuvo un 50% de mortalidad. Aunado a esto, se ha reportado que la persistencia de *M. anisopliae*, especie muy relacionada a *M. pingshaense* (Bischoff *et al.*, 2009) puede ser favorecido por la rizosfera (St Leger *et al.*, 2012), lo cual se confirmó de manera preliminar en el experimento de persistencia; sin embargo, esto se requiere evaluar durante un mayor lapso de tiempo, ya que en este estudio se evaluó la persistencia durante 16 días, pero para tener resultados más concluyentes, se

tendrían que considerar mayores lapsos mayores de tiempo. Por ejemplo, se ha reportado que *M. brunneum* y *M. robertsii* aplicados en semillas de trigo (*Triticum aestivum*) pueden ocasionar mortalidades en larvas de *Tenbrio molitor* hasta cuatro semanas posteriores a la inoculación (Keyser *et al.*, 2014). La persistencia *Metarhizium* puede ser por los exudados de la raíz, los cuales se estiman que son de 15 mg de materia orgánica (Burgmann *et al.*, 2005).

Esta cualidad de que estos hongos pueden sobrevivir y mantener su capacidad infectiva a través del tiempo, es una ventaja ecológica muy importante que debe estudiarse más a fondo, así como la interacción con su ecosistema para poder implementarse en programas de manejo integrado de plagas.

7. CONCLUSIONES

- La baja mortalidad de larvas de *P. polyphylla* ocasionada por aislamientos de *M. pingshaense* y *B. pseudobassiana*, no es modificada por la diversidad genética intra-específica de los hongos evaluados, ni por la diversidad inter-específica del género *Metarhizium*.
- La aplicación de conidios de *M. pingshaense* en semillas de maíz, ocasiona una alta mortalidad en larvas de *A. cincta*, lo cual representa una estrategia viable y de bajo costo para el control biológico de esta especie de gallina ciega, en combinación con la persistencia de los conidios de este hongo al estar asociado a las raíces de la planta.

8. LITERATURA CITADA

- Alatorre R. R. 2007. Hongos entomopatógenos. En Teoría y aplicación del control biológico. Ed. Rodríguez B. L. A. y Arredondo B. H. C. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. 127-143.
- Aragón G. A., Morón M. A. M., Tapia R. A. M. Pérez T. B. López O. J. F. 2010. "Gallina ciega" en Puebla. In: Plagas del suelo. Ed. Rodríguez del Bosque L. A. y Morón M. A. Mundiprensa. 337-359
- Bhattacharyya B. Pujari, D. 2014. Field evaluation of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae* against white grubs damaging green gram in Assam. International Journal of Plant Protection. 7: 67-70
- Bautista M. N. 2006. Insectos plaga, una guía ilustrada para su identificación. Colegio de postgraduados. 113.
- Bhattacharyya B. Pujari, D. 2014. Field evaluation of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae* against white grubs damaging green gram in Assam. International Journal of Plant Protection. 7: 67-70
- Bischoff, J.F., Rehner, S.A., Humber, R.A., 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. Mycologia 101, 512-530.
- Burgmann H., Meier, S., Bunge, M., Widmer, F., Zeyer, J. 2005. Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community. Environment Microbiology. 7: 1711–1724.
- Carrillo-Benítez M. G., Guzmán-Franco A.W., Alatorre-Rosas R., Enríquez-Vara J. N. 2013. Diversity and Genetic Population Structure of Fungal Pathogens Infecting White Grub Larvae in Agricultural Soils. Microbiology Ecology. 65:437-449.
- Deacon J. 2006. Fungal genetics, molecular genetics, and genomics. In

Fungal. biology. Ed. Blackwell. 152-183

Deloya L. C. 1993. El género *Phyllophaga* Harris en Cuernavaca, Morelos, México (Coleoptera: Melolonthidae, Melolonthinae) In Morón M.A. (Comp.). Diversidad y manejo de plagas subterráneas. Publicación especial de la Sociedad Mexicana de Entomología e Instituto de Ecología. Veracruz, México. 39-54.

Enríquez-Vara J., Cordoba A., Guzmán-Franco A.W., Hernández-López J., Alatorre-Rosas R., Contreras-Garduño J. 2012. Is survival after pathogen exposure explained by host's immunestrength? a test with two species of white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) exposed to fungal infection. *Environmental Entomology*. 41: 959-965.

García A. L. 2007. Determinación de especies de gallina ciega (Coleoptera: Melolonthidae) asociadas al *Agave tequilana* Weber var. Azul en Jalisco, México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. 58

García G. L., Ortega A. L., González H. H., García A. A., Nápoles J. R., Cortes R. R. 2009. Descripción de las larvas de tercer instar de Melolonthidae (Coleoptera) asociadas al cultivo de *Agave tequilana* var. Azul y su fluctuación poblacional en Jalisco, México. *Neotropical Entomology*. 38(6):769-780.

Goble T. A., Conlong D. E., Hill M. P. 2014. Virulence of *Beauveria brongniartii* and *B. bassiana* against *Schizonycha affinis* white grubs and adults (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Applied Entomology*. 139:134-135

Guzmán-Franco A.W., Hernández-López J., Enríquez-Vara J. N., Alatorre-Rosas R., Tamayo-Mejía F., Ortega-Arenas L. D. 2012. Susceptibility of

- Phyllophaga polyphylla* and *Anomala cincta* larvae to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates, and the interaction with soil properties. *Biocontrol*. 57:553-563
- Hirromori H., Nishigaki J. 2001. Factor analysis of synergistic effect between the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and synthetic insecticides. *Applied Entomology Zoology*. 36:231-236
- Hernández-Velázquez V.M., Núñez-Valdez M.E., Ruiz-Vega J., Nájera-Rincón M.B., Villalobos F.J. 2010. Uso de entomopatógenos. In: Plagas del suelo. Ed. Rodríguez del Bosque L. A. y Morón M. A. Mundiprensa. 169-183
- Hernández V. V. M., Cervantes E. Z., Villalobos F. J., Lina G. L., Peña C. G. 2011. Aislamiento de hongos entomopatógenos en suelo y sobre gallinas ciegas (Coleoptera: Melolonthidae) en agroecosistemas de maíz. *Acta Zoológica Mexicana*. 27(3):591-599
- Hu, G., St Leger, R.J. 2002. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 6383-6387.
- Keyser C. A., Thorup Kristensen. K., Meyling V. N. 2014. *Metarhizium* seed treatment mediates fungal dispersal via roots and induces infections in insects. *Fungal Ecology*. 11:122-131.
- Loera-Gallardo J., Pérez-Domínguez J.F., Rodríguez-del-Bosque L.R., 2010. Control químico. In: Plagas del suelo. Ed. Rodríguez del Bosque L. A. y Morón M. A. Mundiprensa. 197-214

- Marín J. A., Bújanos M. R. 2003. Especies del complejo “gallina ciega” del género *Phyllophaga* en Guanajuato, México. Agricultura técnica mexicana. 34:349-355.
- Martínez H. A. 2014. Interacción de nematodos y hongos entomopatógenos como reguladores de *Phyllophaga polyphyla*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. 24.
- Morón M. A. 1984. Escarabajos. 200 millones de evolución. Publicación 14. México Instituto de Ecología.137
- Morón M. A. 2010. Diversidad y distribución del complejo “Gallina ciega” (Coleoptera: Scarabaeidae). In: Plagas del suelo. Ed. Rodríguez del Bosque L. A. y Morón M. A. Mundiprensa. 41-63
- Morón M. A., Rodríguez B. L. A., Aragón A., Ramírez S. C. 2010. Biología y hábitos de coleópteros escarabaeideos. In: Plagas del suelo. Ed. Rodríguez del Bosque L. A. y Morón M. A. Mundiprensa. 65-82
- Nájera R. M. B., Jackson T. A. 2010. Plagas del suelo en Michoacán. In: Plagas del suelo. Ed. Rodríguez del Bosque L. A. y Morón M. A. Mundiprensa. 263-284,
- Nájera R. M. B., Jackson T. A. 2010. Biología y hábitos de coleópteros escarabaeideos. In: Plagas del suelo. Ed. Rodríguez del Bosque L. A. y Morón M. A. Mundiprensa. 97-124
- Pérez G. V. H., Guzmán F. A., Alatorre R. R., Hernández L. J., Hernandez L. A., Carrillo B. M. G., Baverstock J. 2014. Specific diversity of the entomopathogenic fungi *Beauveria* and *Metarhizium* in Mexican agricultural soils. Journal of Invertebrate Pathology. 119:54-61.

- Ponce P. P., Corrales J., Sánchez V. 1994. Niveles de resistencia de *Cyclocephala comata* Bates (Coleoptera: Scarabeidae) a insecticidas de distintos grupos toxicológicos de maíz de Arenal, Jalisco. Memoria del XXIX Congreso Nacional de Entomología. Monterrey N. L., México. 24-27 Abril. 265-266
- Ponce P. P., Santana J.S., Ramírez J. L., Martínez C. M. D., Cabral E. 2006. Determination of the susceptibility of White grubs (*Phyllophaga* spp.) to different insecticides in population of San Martin Hidalgo, Jalisco, México. Resistant Pest Management Newsletter. Michigan State University. 6
- Ramírez S. C., Castro R. A. E. 2000. El completo "gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae) en el cultivo de maíz, en el Madronal, Municipio de Amatenango del Valle, Chiapas México. Acta Zoológica Mexicana. 79:17-41
- Rodríguez del Bosque L. A., Marín J., A. 2008. Insectos plaga y su control. In El cultivo del maíz temas selectos. Ed Rodríguez M. R., De León C. Mundiprensa. 29-46.
- Ruiz V. J., Aquino B. T., Silva R. M. E., Girón P. S., 2012. Control integrado de gallina ciega *Phyllophaga vetula* Horn (Coleoptera: Melolonthidae) con agentes entomopatógenos en Oaxaca, México. Revista científica UDO agrícola. 12: 609-616.
- SAGARPA. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2014. <http://www.siap.gob.mx> (Fecha de consulta 29 de agosto de 2014).

- Samson P. R., Milner R. J., Sander E.D., Bullard G. K. 2004. Effect of fungicides and insecticides applied during planting of sugarcane on viability of *Metarhizium anisopliae* and its efficacy against white grubs. *Biocontrol*. 50: 151-163
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2007. Situación actual y perspectivas del maíz 1996-2012. Universidad Autónoma de Chapingo. México.
<http://www.campomexicano.gob.mx/portal.../Perspectivas/maiz96-12.pdf>
- Sharma A., Thakur D. R., Kanwar S. y Chandla. 2013. Diversity of entomopathogenic bacteria associated with the White grub, *Brahmina coriácea*. *Journal of Pest Science*. 86:261-273.
- Torres de la C. M., Cortez M. H., Ortiz G. C. F. Cappello G. S. De la Cruz P. A. 2013. Caracterización de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad hacia *Aenelomia postica*, en Tabasco, México. *Revista Colombiana de Entomología*. 39:40-46.
- Wu S., Youngman R. R., Kok L. T., Laub C. A., Pfeiffer G. D. 2014. Interaction between entomopathogenic nematodes and entomopathogenic fungi applied to third instar southern masked chafer white grubs, *Cyclocephala lurida* (Coleoptera: Scarabaeidae), under laboratory and greenhouse conditions. *Biological Control*. 76:65-73