



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**“VIRULENCIA DE AISLAMIENTOS DE LOS HONGOS
ENTOMOPATÓGENOS *Beauveria bassiana* (BALS.)
VUILL. Y *Metarhizium anisopliae* (METSCH.)
(ASCOMYCETES: HYPOCREALES) EN LARVAS DE
GALLINAS CIEGAS (COLEOPTERA: SCARABAEIDAE) Y
SU INTERACCIÓN CON ALGUNOS FACTORES
BIÓTICOS Y ABIÓTICOS”**

JORGE HERNÁNDEZ LÓPEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

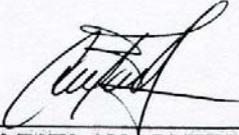
2010

La presente tesis titulada: **VIRULENCIA DE AISLAMIENTOS DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. Y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) (ASCOMYCETES: HYPOCREALES) EN LARVAS DE GALLINAS CIEGAS (COLEOPTERA: SCARABAEIDAE) Y SU INTERACCIÓN CON ALGUNOS FACTORES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

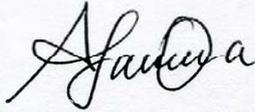
**MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:


DR. ARIEL W. GUZMÁN FRANCO

ASESOR:


DRA. LAURA DELIA ORTEGA ARENAS

ASESOR:


M.C. FERNANDO TAMAYO MEJÍA

Montecillo, Texcoco, Edo., de México, Julio de 2010.

VIRULENCIA DE AISLAMIENTOS DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS
Beauveria bassiana (BALS.) VUILL. Y *Metarhizium anisopliae* (METSCH.)
(ASCOMYCETES: HYPOCREALES) EN LARVAS DE GALLINAS CIEGAS
(COLEOPTERA: SCARABAEIDAE) Y SU INTERACCIÓN CON ALGUNOS
FACTORES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS

JORGE HERNÁNDEZ LÓPEZ, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2010

RESUMEN

Se realizó una búsqueda de aislamientos infectando larvas de gallina ciega en el estado de Guanajuato, México. Se obtuvieron 13 aislamientos, 11 de la especie *Beauveria bassiana* y dos de *Metarhizium anisopliae*. Los aislamientos obtenidos, más otros cuatro (dos de *M. anisopliae* y dos de *B. bassiana*) obtenidos de otras fuentes fueron evaluados en larvas de *Phyllophaga polyphylla* para estimar los niveles de virulencia. Los porcentajes de mortalidad fueron muy bajos (menor al 20%); sin embargo, estos resultados ayudaron a seleccionar siete aislamientos (cuatro de *B. bassiana* y tres de *M. anisopliae*) para confirmar la virulencia de los aislamientos seleccionados. Posteriormente, únicamente se seleccionó cuatro aislamientos (dos de cada especie de hongo), donde se evaluó el efecto de la temperatura. Los mismos aislamientos fueron evaluados simultáneamente en larvas del género *Anomala*, otra especie de gallina ciega cohabitando el mismo. Finalmente, con un solo aislamiento de *M. anisopliae* y larvas del género *Anomala* sp. se evaluó el efecto del suelo en la relación patogénica de estos dos organismos. La temperatura no tuvo un efecto significativo en las mortalidades obtenidas por aislamientos de ambas especies de hongos entomopatógenos en larvas de *P. polyphylla*. Cuando los mismos aislamientos fueron evaluados en larvas de *Anomala* spp, únicamente los aislamientos de *M. anisopliae* causaron porcentajes de mortalidad muy altos (arriba del 90%). El tipo de suelo tuvo

un ligero efecto en la interacción de aislamientos de *M. anisopliae* y larvas de *Anomala* spp., El papel ecológico y práctico de estos resultados son discutidos.

ABSTRACT

A survey was carried out to find isolates infecting white grub (*Phyllophaga polyphylla*) larvae in Guanajuato, Mexico. Thirteen isolates were collected, eleven from *Beauveria bassiana* and two from *Metarhizium anisopliae*. Collected isolates and other four obtained from other sources (two from each fungal species) were tested on *P. polyphylla* healthy larvae to obtain virulence levels. Infection rates were low (less than 20% mortality), these results helped to select seven isolates, two from each species, for further experiments to confirm virulence levels. From this last experiment, four isolates were further selected (two from each fungal species) to investigate the effect of temperature in the virulence. The same isolates were also tested on *Anomala* spp larvae, a white grub species co-habiting the same ecosystem. Finally, one *M. anisopliae* isolates was evaluated on *Anomala* sp larvae and the effect of soil in this relationship. Temperature did not have a significant effect on the mortality levels obtained by isolates from both fungal species on *P. polyphylla* larvae. When same isolates were tested on *Anomala* spp larvae, *M. anisopliae* isolates caused large mortality percentages (above 90%). Soil type had some effect on the interaction between *Anomala* spp. larvae and one *M. anisopliae* isolate. The ecological and practical significance of these findings are discussed.

DEDICATORIA

A mis padres

Tomasa López Morales y Francisco Hernández Benítez†, por su apoyo y amor incondicional. En especial a ti Madre, por tus enseñanzas, comprensión, amor y el transmitirme el amor por el campo.

A mis hermanos

Rafael, Oscar y Alejandro

A los académicos

Dra. María de Lourdes de la Isla de Bauer, por su apoyo incondicional y motivación.

Doctores Abel Quevedo Nolasco y Jesús Pérez Moreno, por sus palabras de aliento

A los amigos

Víctor Manuel Perea Estrada, Joel Zuñiga Reyes, Manuel Sánchez, Nuvia Orduño Cruz, Talina Olivia Martínez.

A mi amiga incondicional Erica Muñiz Reyes, por brindarme su apoyo, sus consejos y su amistad.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico para la realización de mis estudios de Posgrado.

Al Colegio de Postgraduados (CP) por haberme dado la oportunidad de continuar con mi formación profesional.

A la Fundación Produce Guanajuato A. C., por haber apoyado con el recurso económico para la realización de mi investigación.

Al COMECYT, por su apoyo económico para la realización de la Tesis.

Al Dr. Ariel W. Guzmán Franco por su apoyo incondicional, y la gran paciencia en el desarrollo de mi investigación.

A la Dra. Laura Delia Ortega Arenas, por las observaciones hechas durante mi investigación.

Al Maestro en Ciencias Fernando Tamayo Mejía, por su apoyo en el desarrollo de mi investigación y sus valiosas observaciones al escrito.

A la Dra. Raquel Alatorre por sus valiosos consejos y observaciones. Agradezco el que me transmitiera un poco de su experiencia.

Al M.C. Jorge M. Valdez Carrasco por las asesorías en la captura de imágenes digitales y sus asesorías en la manipulación de las mismas.

A los amigos, Erica, Nuvia, Talina, Violeta, Ariadna, Lupita, Iliana, Karla, Erika, Gabriela, Carolina, Verónica, Irene, Mariaelena y Patricia Jhony, Fabián, Nicolás, Víctor Hugo, Alberto, Alejandro, Santos.

A los productores cooperantes, por su hospitalidad y su ayuda en el poblado de San Lorenzo Jerécuaro, Guanajuato

CONTENIDO

	PÁG.
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	xii
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVO	4
1.2 OBJETIVOS PARTICULARES	4
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	5
2.1. Aislamientos de hongos entomopatógenos	5
2.2. Crio-conservación de hongos entomopatógenos	6
2.3. Recuperación de aislamientos de crio-preservación	6
2.4. Obtención de aislamientos monospóricos	7
2.5. Prueba de germinación de la suspensión de conidios	8
2.6. Experimento inicial para estimar niveles de virulencia de aislamientos	9

de hongos entomopatógenos de los géneros <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> hacia larvas de <i>Phyllophaga</i> spp. y <i>Anomala</i> spp.	
2.6.1. Larvas de <i>Phyllophaga polyphylla</i> y <i>Anomala</i> spp.	9
2.6.2 Procedimiento para la obtención de suspensiones de conidios	10
2.6.3 Procedimiento de bioensayo	10
2.7 Estimación de la virulencia de siete aislamientos de hongos entomopatógenos hacia larvas de gallina ciega del género <i>Phyllophaga polyphylla</i>	11
2.7.1 Diseño experimental y análisis de datos	12
2.8 Efecto de la temperatura en la virulencia de aislamientos de hongos entomopatógenos en larvas del género <i>Phyllophaga polyphylla</i>	14
2.8.1 Procedimiento de bioensayo	14
2.8.2 Diseño experimental y análisis de datos	15
2.9 Virulencia de aislamientos de hongos entomopatógenos hacia larvas de gallina ciega y su interacción con el género del insecto	15
2.9.1 Diseño experimental y análisis de datos	15
2.10 Interacción de diferentes tipos de suelos en la virulencia de <i>Metarhizium anisopliae</i> y larvas de <i>Anomala</i> sp.	15

2.10.1	Colecta y localización de los suelos empleados	16
2.10.1.1	Determinación de abundancia y diversidad de hongos entomopatógenos en cada uno de los suelos experimentales	16
2.10.1.2	Determinación de poblaciones microbianas presentes en los suelos experimentales	17
2.10.2	Procedimiento de bioensayo	18
2.10.3	Diseño experimental y análisis de datos	19
CAPÍTULO 3. RESULTADOS		20
3.1	Experimento inicial para estimar niveles de virulencia de aislamientos de hongos entomopatógenos de los géneros <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> hacia larvas de <i>Phyllophaga polyphylla</i> . y <i>Anomala</i> spp	20
3.2	Virulencia de siete aislamientos de hongos entomopatógenos contra larvas de <i>Phyllophaga polyphylla</i>	22
3.3	Efecto de la temperatura en la virulencia de aislamientos de hongos entomopatógenos en larvas del género <i>Phyllophaga polyphylla</i>	23
3.4	Virulencia de aislamientos de hongos entomopatógenos hacia larvas de gallina ciega y su interacción con el género del insecto	25

3.5 Interacción de diferentes tipos de suelos en la virulencia de <i>Metarhizium anisopliae</i> y larvas de <i>Anomala</i> sp.	28
3.5.1 Características físico-químicas de los suelos experimentales	28
3.5.2 Población microbiana de los suelos experimentales	30
3.5.3 Efecto del tipo de suelo en la virulencia de <i>Metarhizium anisopliae</i> (MaGC02) hacia larvas de <i>Anomala</i> sp.	31
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN	32
CAPÍTULO 5. LITERATURA CITADA	41

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1	Aislamientos empleados durante esta investigación.	5
Cuadro 2	Aislamientos de hongos entomopatógenos utilizados como segunda prueba de virulencia contra larvas de <i>P. polyphylla</i> .	12
Cuadro 3	Tratamientos en los que los diferentes grupos de larvas inoculadas con conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> fueron incubadas.	18
Cuadro 4	Características físico-químicas de los suelos experimentales.	29
Figura 1	Proporciones de mortalidad y esporulación logradas con diferentes aislamientos de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en larvas de <i>Phyllophaga polyphylla</i> (A) y <i>Anomala</i> sp. (B). E= Insectos muertos con signos visibles de esporulación. M=Insectos muertos por causas no determinadas	21
Figura 2	Proporciones de mortalidad obtenidas con cada uno de los aislamientos en larvas de <i>Phyllophaga polyphylla</i> . Las barras de error representan límites de confianza del 95%, transformadas a partir de la escala logística.	22
Figura 3	Proporciones de mortalidad obtenidas con cada uno de los aislamientos en larvas de <i>Phyllophaga polyphylla</i> , las proporciones son el promedio obtenido bajo las tres temperaturas de incubación. Bb= <i>Beauveria bassiana</i> , Ma= <i>Metarhizium anisopliae</i> . Las barras de error representan límites de confianza al 95%, transformadas de la escala logística.	23
Figura 4	Proporciones de mortalidad obtenidas en cada una de las temperaturas de	24

incubación. Las proporciones reportadas en cada temperatura son el promedio de mortalidad obtenido con todos los aislamientos. Las barras de error representan límites de confianza al 95%, transformadas de la escala logística.

- Figura 5 Proporciones de mortalidad obtenidos con los 4 aislamientos evaluados y 25
bajo las tres temperaturas de incubación. Las barras de error representan
límites de confianza al 95%, transformadas de la escala logística.
- Figura 6 Proporciones de mortalidad obtenidos en larvas de los géneros *Anomala* 26
sp y *Phyllophaga polyphylla*. Los resultados presentados son el promedio
de mortalidades obtenidos con todos los aislamientos. Las barras de error
representan límites de confianza al 95, transformadas de la escala
logística.
- Figura 7 Promedio de proporciones de mortalidad de larvas de *P. polyphylla* y 27
Anomala sp. obtenidas con cada uno de los aislamientos evaluados. Las
barras de error representan límites de confianza al 95 %, transformadas de
la escala logística.
- Figura 8 Proporciones de mortalidad obtenidos con los 4 aislamientos evaluados y 28
en larvas de los géneros *Anomala sp* y *Phyllophaga polyphylla*. Las barras
de error representan límites de confianza al 95%, transformadas de la
escala logística.
- Figura 9 Poblaciones totales de hongos y actinomicetos estimadas en muestras de 30

suelo de las localidades bajo estudio.

Figura 10 Poblaciones totales de bacterias estimadas en muestras de suelo 30
provenientes de las localidades bajo estudio.

Figura 11 Proporciones de mortalidad obtenidos en larvas del género *Anomala* sp, 31
inoculadas con el aislamiento GC02 de *M. anisopliae*, e incubadas en
suelos provenientes de 4 diferentes localidades descritas en el Cuadro 3.
Las barras de error representan límites de confianza al 95%,
transformadas de la escala logística.

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

El complejo de especies de gallina ciega representa un serio problema en varios lugares de México (Morón, 2010). Las larvas se alimentan de las raíces de diversos cultivos como el maíz (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.), caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), frijolm (*Phaseolus vulgaris* L.), cebolla (*Allium cepa* L.), tomate verde (*Physalis ixocarpa* B.), papa (*Solanum tuberosum* L.) (Moron, 1986) y agave (*Agave tequilana* Weber) (García *et al*, 2009). Diversas estrategias se han empleado para controlar esta plaga, siendo el control químico el más usado; sin embargo, problemas relacionados con el uso de esta estrategia, como el desarrollo de resistencia, persistencia de estos en el suelo y los resultados erráticos en el control de esta plaga se hacen cada vez más frecuentes (Loera-Gallardo *et al.*, 2010). Dentro de los géneros más importantes del complejo gallina ciega esta *Phyllophaga*, del cual se han descrito 285 especies en México, y de estos únicamente el 10% está asociado a cultivos agrícolas (Morón, 2010). En el estado de Guanajuato, 60% de su territorio es de uso agrícola, y de ese porcentaje, 80% es empleado para cultivar maíz, sorgo, trigo y crucíferas donde la gallina ciega es una de las plagas más importantes (Marin Jarillo & Bujanos Muñiz, 2008). *Phyllophaga polyphilla* (Bates) es una de las especies más importantes en Guanajuato (Marín-Jarillo & Bujanos Muñiz, 2008). Esta situación ha creado la necesidad de realizar mayor investigación para la búsqueda de alternativas de control de esta plaga. Existen trabajos donde reportan resultados de experimentos evaluando nematodos entomopatógenos contra especies del género *Phyllophaga* como *Phyllophaga georgiana* (Horn.) y *P. crinita* (Burmeister) (Koppenhöfer *et al.*, 2008, 2004) y los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* contra *Phyllphaga anxia* (Leconte) (Poprawski & Yule, 1991). En México también son pocos los reportes de experimentos con larvas del género *Phyllophaga*, como los reportados con larvas de

P. crinita (Rodríguez-del-Bosque *et al.*, 2005) y una especie no identificada de *Phyllophaga* (Flores *et al.*, 2002), y más recientemente, un aislamiento de la bacteria *Serratia entomophila* fue reportada como muy virulenta contra larvas de *Phyllophaga blanchardi* (Arrow), *P. trichodes* (Bates), *P. ravidia* (Blanch), *P. obsoleta* (Blanch.) y *Anomala donovani* (Stephens) (Núñez-Valdez *et al.*, 2008).

Personal del Comité Estatal de Sanidad Vegetal del estado de Guanajuato, reportó la presencia de larvas infectadas con hongos entomopatógenos en diversas localidades del estado, específicamente cultivos de maíz, lo cual sugiere que estos microorganismos tienen potencial para ser desarrollados como una estrategia de control. Aunado a esto, la investigación realizada para el control microbiano de otras plagas subterráneas como *Melolontha melolontha* (L.) mediante el hongo entomopatógeno *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch en Europa (Keller *et al.*, 1997; Keller *et al.*, 1999; Kessler *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 2003; Enkerli *et al.*, 2004; Kessler *et al.*, 2004; Dolci *et al.*, 2006; Sevim *et al.*, 2010; Loesh *et al.*, 2010) confirman el enorme potencial que los hongos tienen para ser desarrollados para el control microbiano de plagas de suelo.

El conocimiento de la diversidad y abundancia de hongos entomopatógenos, y su papel en la regulación de poblaciones de insectos es muy escaso (Chandler *et al.*, 1997). Por esta razón, el estudio de la composición de especies nativas de hongos entomopatógenos es muy necesario, si estos microorganismos van a ser empleados como una herramienta de control microbiano (Meyling & Eilenberg, 2006).

Las larvas del género *Phyllophaga* spp., así como los diferentes complejos de especies presentes en diversas regiones, son una plaga importante en México (Morón, 2010). *Phyllophaga*

polyphylla se encuentra entre las especies más importantes atacando cultivos en México, especialmente en el estado de Guanajuato (Morón, 2010). No existen reportes de estudios con hongos entomopatógenos realizados con esta especie. A pesar de la existencia de otras especies de *Phyllophaga*, la investigación que se puede realizar con *Phyllophaga polyphylla* es económicamente importante por su estatus de plaga, y representa un excelente modelo para estudiar la relación patogénica entre hongos entomopatógenos y este insecto, y la ecología de esta relación.

Considerando lo anterior, una serie de experimentos fue llevada a cabo para estudiar la relación patogénica entre aislamientos de hongos entomopatógenos nativos del estado de Guanajuato, larvas de *P polyphylla* y factores que pudieran modificar esta relación.

1.1 OBJETIVO

Estudiar el posible efecto que tienen algunos factores bióticos y abióticos en el resultado de la interacción de hongos entomopatógenos con larvas de *Phyllophaga polyphylla*.

1.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Este objetivo se cumplió mediante los siguientes objetivos particulares:

1. Búsqueda y aislamiento de hongos entomopatógenos nativos del estado de Guanajuato en larvas de gallina ciega.
- 2.- Comparar la virulencia de aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* hacia larvas de gallina ciega del género *Phyllophaga* spp.
- 3.- Evaluar el efecto de temperatura en la interacción de aislamientos de hongos entomopatógenos en larvas de gallina ciega del género *Phyllophaga* spp.
- 4.- Estudiar los niveles de virulencia de aislamientos de hongos entomopatógenos hacia larvas de gallina ciega y su interacción con el género de la larva.
- 5.- Estudiar el efecto del suelo en la interacción de hongos entomopatógenos con larvas de gallina ciega.

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Aislamientos de hongos entomopatógenos

Los aislamientos de hongos entomopatógenos empleados en esta investigación (Cuadro 1) se encuentran en resguardo en la colección del Laboratorio de Patología de Insectos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Dichos aislamientos se encuentran bajo crio-preservación a -80 °C.

Cuadro 1. Aislamientos empleados durante esta investigación.

Especie	Aislamiento	Hospedero	Origen Geográfico
<i>Metarhizium anisopliae</i>	MaGC01	<i>Phyllophaga</i> spp.	Puruagua, Jerécuaro
<i>M. anisopliae</i>	MaGC02	<i>Phyllophaga</i> spp.	Puruagua, Jerécuaro
<i>M. anisopliae</i>	MaMGC06	<i>Phyllophaga</i> spp.	-----
<i>M. anisopliae</i>	MaMGC07	<i>Phyllophaga</i> spp.	-----
<i>Beauveria bassiana</i>	BbGC03	<i>Phyllophaga</i> spp.	San Lorenzo, Jerécuaro
<i>B. bassiana</i>	BbGC07	<i>Phyllophaga</i> spp.	San Lorenzo, Jerécuaro
<i>B. bassiana</i>	BbGC09	<i>Phyllophaga</i> spp.	Tierra Negra, Pénjamo
<i>B. bassiana</i>	BbGC11	<i>Phyllophaga</i> spp.	Tierra Negra, Pénjamo
<i>B. bassiana</i>	BbGC12	<i>Phyllophaga</i> spp.	Tierra Negra, Pénjamo
<i>B. bassiana</i>	BbGC13	<i>Phyllophaga</i> spp.	Tierra Negra, Pénjamo
<i>B. bassiana</i>	BbGC14	<i>Phyllophaga</i> spp.	Tierra Negra, Pénjamo
<i>B. bassiana</i>	BbGC15	<i>Phyllophaga</i> spp.	SJ Sabinos, Pénjamo
<i>B. bassiana</i>	BbGC16	<i>Phyllophaga</i> spp.	SJ Sabinos, Pénjamo
<i>B. bassiana</i>	BbGC18	<i>Phyllophaga</i> spp.	SJ Sabinos, Pénjamo
<i>B. bassiana</i>	BbGC20	<i>Phyllophaga</i> spp.	SJ Sabinos, Pénjamo
<i>B. bassiana</i>	Bb88	<i>Hypothenemus hampei</i>	Costa de Oaxaca, Oax.
<i>B. bassiana</i>	GHA	Aislamiento comercial	

Todos los aislamientos, excepto el comercial (GHA) y Bb88, provienen del estado de Guanajuato, México. Los aislamientos MGC06 y MGC07 fueron proporcionados por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato.

2.2 Crio-conservación de hongos entomopatógenos

Todos los aislamientos se crio-preservaron a -80 °C. El procedimiento fue el mismo para todos los aislamientos y se realizó bajo una campana de flujo laminar utilizando un cultivo de 20 días de sembrado en placas de Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) (BIOXON®), e incubado a 25 °C en total oscuridad, se extrajeron varios círculos de 5 mm de diámetro por medio de un sacabocados. Entre 4 y 5 círculos fueron depositados en crio-viales de 2 mL de volumen (CORNING®) conteniendo un mL de glicerol al 10% estéril, en caso necesario se añadió más glicerol al 10% estéril para ajustar el volumen final en el crio-vial a 1.8 mL aproximadamente. Posteriormente los crio-viales se colocaron en un ultracongelador a -80 °C.

2.3 Recuperación de aislamientos de crio-preservación

Los aislamientos se recuperaron del ultra-congelador siguiendo el método modificado propuesto por Humber (1997) y fue el mismo para todos los aislamientos. Se extrajo un crio-vial y se colocó dentro de campana de flujo laminar hasta que el glicerol se haya descongelado por completo. Posteriormente, el crio-vial se agitó durante 15 segundos en un vortex y se tomaron alícuotas de 100 µL de la suspensión de conidios y se depositaron en al menos 15 diferentes placas de ADS estéril. La suspensión se distribuyó uniformemente en cada placa y se incubó a 25 °C en total oscuridad por 15 días o hasta que las colonias de hongos hayan esporulado

2.4 Obtención de aislamientos monospóricos

Los aislamientos mantenidos a -80 C eran multiespóricos; es decir, se pueden encontrar diversos genotipos dentro del mismo aislamiento. Esto podría llevar a obtener aislamientos con características biológicas diferentes en sub-cultivos posteriores (Ryan *et al.*, 2002). Para minimizar el efecto de la variación genética, se trabajó con aislamientos obtenidos a partir de un solo conidio (monospóricos).

El procedimiento para todos los aislamientos fue el mismo. A partir de una colonia de 15 días posteriores a su inoculación en placas de ADS, se tomo, con la ayuda de un asa bacteriológica, una cantidad no cuantificada de conidios. Estos fueron depositados en frascos de vidrio con tapa de rosca conteniendo 20 mL de Tween 80 al 0.03%, el frasco fue agitado durante tres minutos con un vortex para tratar de obtener una suspensión lo mas homogéneamente posible. Posteriormente, se tomó una alícuota de 100 µL y se deposito en la parte central de una caja de Petri conteniendo 15 mL de agar-agua al 1.5 %. Con la ayuda de una varilla de vidrio estéril en forma de “L”, se disperso la alícuota en toda la superficie de la placa de agar-agua. Se realizó este procedimiento por triplicado para cada aislamiento. Todas las cajas fueron incubadas a 25 °C en total oscuridad durante 24 horas. Al término de las 24 horas, aún con la caja cerrada y con la ayuda de un microscopio estereoscópico, se localizaron en cada caja, aquellos conidios que estuvieran aislados de otros conidios y que hayan germinado; estos conidios fueron marcados encerrándolos en un círculo mediante un marcador de punto fino, dicho círculo se realizo en la base de la caja de Petri.

Una vez seleccionados los conidios con las características previamente descritas, y dentro de un campana de flujo laminar, se extrajo la parte de la placa de agar-agua marcada previamente

mediante una navaja estéril y se transfirió a una placa de ADS. El círculo de agar-agua conteniendo el conidio se colocó en la placa de ADS de manera invertida. El número de placas conteniendo conidios individuales fue variable para cada aislamiento. Del total de cajas producidas de esta manera y conteniendo un solo conidio, se seleccionó al azar una sola caja la cual fue posteriormente preservada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ siguiendo la misma metodología descrita en la sección 2.2.

2.5. Prueba de germinación de la suspensión de conidios

La prueba de germinación es muy importante para comprobar la viabilidad de los conidios en las suspensiones empleadas en cada uno de los experimentos justo antes de la ejecución de los mismos. El método consistió en tomar $10\text{ }\mu\text{L}$ de una suspensión final de 1×10^8 conidios/mL y colocarlos en $990\text{ }\mu\text{L}$ de Tween 80 al 0.003%, la suspensión resultante se agitó en un vortex por 10 segundos. Finalmente, se tomaron 3 alícuotas de $10\text{ }\mu\text{l}$ y fueron colocadas cada una en una zona diferente dentro de una misma placa de ADS. Se dejó dentro de una campana de flujo laminar hasta que la mayoría del Tween 80 al 0.03 % se hubiera evaporado. La caja de Petri se invirtió y en la base de la misma se marcó con un marcador indeleble, las zonas donde previamente se depositaron los $10\text{ }\mu\text{l}$. La caja se incubó a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en total oscuridad y se revisaron a las 8 y 12 horas para obtener un nivel de germinación inicial que permitiera realizar una contabilización adecuada al microscopio compuesto. Dentro del campo del ocular del microscopio, se cuantificó de manera aleatoria conidios germinados y no germinados hasta sumar aproximadamente 100 y estimar el porcentaje de viabilidad.

2.6 Experimento inicial para estimar niveles de virulencia de aislamientos de hongos entomopatógenos de los géneros *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* hacia larvas de *Phyllophaga polyphylla* y *Anomala* spp.

Este experimento se realizó con todos los aislamientos enlistados en el Cuadro 1. El objetivo fue determinar niveles de virulencia de todos los aislamientos y poder tener un criterio de selección de un menor número de aislamientos a emplear en experimentos subsecuentes.

2.6.1 Larvas de *Phyllophaga polyphylla* y *Anomala* spp.

Larvas de tercer instar de ambos géneros de gallina ciega fueron colectadas en la comunidad de San Lorenzo, Municipio de Jerécuaro en el estado de Guanajuato (N 20°02'30.1', W 100°28'36.4'') con ayuda de productores cooperantes. Los cultivos donde se colectó las larvas fueron de maíz y sorgo.

Las larvas colectadas fueron separadas por género y se seleccionó aquellas que no presentaran puntos de esclerosamiento o con presencia de ácaros o nematodos. Posteriormente, se depositaron de manera individual en envases de plástico transparente de 100 mL de capacidad con tapa conteniendo Peat Moss húmedecido (Growing Mix®, Canadá). Dentro de cada envase se colocó un trozo de zanahoria lavada y desinfectada con cloro al 0.1% para su alimentación. Las larvas fueron conservadas en el laboratorio a temperatura ambiente, y cada ocho días se revisó la humedad del sustrato y se colocó más zanahoria en caso necesario. Las larvas se mantuvieron bajo observación durante 20 a 30 días antes de ser usadas en los experimentos.

2.6.2 Procedimiento para la obtención de suspensiones de conidios

Todas las suspensiones se realizaron a partir de cultivos monospóricos de los aislamientos del Cuadro 1. Los aislamientos fueron recuperados de crio-preservación mediante la técnica descrita en la sección 2.3 y la metodología de preparación de las suspensiones de conidios fue la misma para todos los aislamientos. A partir de cultivos con 15 días posteriores a su inoculación en placas de ADS y con la ayuda de una espátula metálica, se removió la mayor cantidad posible de conidios y micelio de las cajas de Petri. El material extraído de 15 a 20 cajas de Petri por aislamiento, se depositaron en un tubo para centrifuga de 50 mL de capacidad y se añadió 20 mL o más si era requerido de Tween 80 estéril al 0.03%. El tubo se agitó con un vortex durante 5 minutos y el contenido se filtró a otro tubo de centrifuga limpio por medio de una doble capa de pañalina contenida en un embudo de cristal de 5 cm de diámetro.

De la suspensión de conidios resultante por aislamiento, se tomó una alícuota de 10 μL y se depositó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL de capacidad conteniendo 990 μL de Tween 80 al 0.03%. La suspensión resultante se empleo para estimar la concentración de conidios por mL mediante una cámara de Neubauer. Los tubos de centrifuga conteniendo las suspensiones concentradas de conidios fueron mantenidas a 4 °C por un periodo no mayor a 24 horas hasta su uso.

La concentración que se usó en los experimentos fue de 1×10^8 conidios/mL en un volumen final de 100 mL.

2.6.3 Procedimiento de bioensayo

El procedimiento para la inoculación de todos los aislamientos en larvas de los géneros *Phyllophaga polyphylla* y *Anomala* spp., fue el mismo. Diferentes grupos de 30 larvas para el

caso de *P. polyphylla* y 20 larvas para *Anomala* spp del tercer instar fueron inoculados con suspensiones de 1×10^8 conidios/mL. Dentro de una campana de flujo laminar, las larvas fueron colocadas en un embudo de porcelana de 15 cm de diámetro conteniendo 2 círculos de papel filtro Whatman No 1 de 15 cm de diámetro, el embudo estaba conectado a un kitasato el cual a su vez se conectó a una bomba de vacío. Cien mililitros de una suspensión de conidios con una concentración de 1×10^8 conidios/mL fueron depositados dentro del embudo. La suspensión de conidios fue mantenida durante 20 segundos en contacto con las larvas, quienes se encontraban completamente inmersas en la suspensión de conidios. Una vez transcurridos los 20 segundos de inoculación, la suspensión fue retirada mediante succión por medio de la bomba de vacío. Las larvas tratadas fueron transferidas a placas de cultivo de tejidos con 12 orificios, en donde en cada orificio se colocó una larva. En cada orificio de la placa, se colocó con anterioridad un círculo de papel filtro Whatman No. 1 de 2 cm de diámetro humedecida con 80 μ L de agua destilada estéril y una rodaja de zanahoria como alimento. Las larvas testigo para cada género de gallina ciega fueron expuestas únicamente a 100 mL de Tween 80 al 0.03% por 20 segundos. Todo el experimento fue incubado a 25 °C en total oscuridad durante 36 días. La mortalidad de las larvas se registró cada tres días.

2.7 Estimación de la virulencia de siete aislamientos de hongos entomopatógenos hacia larvas de gallina ciega del género *Phyllophaga polyphylla*

El objetivo de este experimento fue corroborar los resultados obtenidos en el experimento anterior pero únicamente con larvas de *P. polyphylla*. Los métodos para la obtención de larvas y producción de las suspensiones de conidios fueron las mismas descritas anteriormente en las secciones 2.6.1 y 2.6.2 respectivamente. Para el caso del procedimiento de bioensayo, este fue el

mismo descrito anteriormente (Sección 2.6.3), únicamente que se emplearon 24 larvas de tercer instar.

Con base en los resultados del experimento anterior (Sección 2.6), se seleccionó un menor número de aislamientos. Se evaluaron siete aislamientos, cuatro de *B. bassiana* y tres de *M. anisopliae* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Aislamientos de hongos entomopatógenos utilizados como segunda prueba de virulencia contra larvas de *P. polyphylla*.

Especie	Aislamiento	Hospedero	Origen Geográfico
<i>Metarhizium anisopliae</i>	MaGC01	<i>Phyllophaga</i> spp.	Puruagua, Jerécuaro
<i>M. anisopliae</i>	MaGC02	<i>Phyllophaga</i> spp.	Puruagua, Jerécuaro
<i>M. anisopliae</i>	MaMGC07	<i>Phyllophaga</i> spp.	
<i>Beauveria bassiana</i>	BbGC03	<i>Phyllophaga</i> spp.	San Lorenzo,
<i>B. bassiana</i>	BbGC07	<i>Phyllophaga</i> spp.	San Lorenzo,
<i>B. bassiana</i>	BbGC14	<i>Phyllophaga</i> spp.	Tierra Negra,
<i>B. bassiana</i>	BbGC15	<i>Phyllophaga</i> spp.	SJ Sabinos, Pénjamo

2.7.1 Diseño experimental y análisis de datos

Los tratamientos fueron dispuestos en un diseño experimental completamente al azar y todo el experimento se repitió en tres ocasiones. Los datos del experimento se analizaron mediante regresión logística, asumiendo que los datos tienen una distribución binomial, y el tamaño de muestra igual al número de individuos evaluado. Cada número de individuos infectados fue una proporción del número total de individuos evaluados. En el análisis para determinar el efecto de los aislamientos en la sobrevivencia de las larvas, únicamente se emplearon aquellos tratamientos donde conidios de los diferentes aislamientos fueron empleados. El testigo se

empleo como un medio de verificación de que no existió contaminación cruzada, y para corregir mortalidad en caso de tener larvas muertas en el tratamiento testigo. La corrección de mortalidad se realizó mediante la fórmula de Abbot con modificaciones (Guzman, 2005), y son las siguientes:

Para ajustar el número inicial de larvas en los tratamientos:

$$ANt = Nt * ((1 - (Rc/Nc)))$$

Para ajustar el número de individuos que respondieron en los tratamientos:

$$ARt = Rt - (Nt - ANt)$$

Donde: ANt=Numero inicial ajustado de larvas en los tratamientos, Nt=Numero inicial de larvas sin ajustar en los tratamientos, Rc=Numero de larvas muertas en el control, Nc=Numero de larvas vivas en el control, ARt=Numero ajustado de larvas que respondieron en los tratamientos, Rt=Numero de larvas muertas en los tratamientos.

Se permitió mayor variación en los datos de los esperados bajo el supuesto binomial comparando la diferencia de la desviación media del tratamiento y la desviación media residual contra una distribución "F", y no comparando la desviación del tratamiento contra una distribución χ^2 , como normalmente se hace.

El análisis estadístico se realizó usando el paquete estadístico GenStat v 8.1.

2.8 Efecto de la temperatura en la virulencia de aislamientos de hongos entomopatógenos en larvas del género *Phyllophaga polyphylla*

El objetivo de este experimento fue estudiar el efecto de la temperatura en la relación hongos entomopatógenos y larvas de gallina ciega estudiada en el experimento anterior. Para realizar esta prueba se seleccionaron los aislamientos GC01, GC02, GC03 y GC15 (Cuadro 2) y se incubaron a 20, 25 y 30 °C.

2.8.1 Procedimiento de bioensayo

Las larvas fueron obtenidas con la misma metodología descrita en la sección 2.6.1, y las suspensiones de conidios obtenidas con la metodología descrita en la sección 2.6.2 pero en este caso se realizaron 200 mL de una suspensión de conidios a una concentración de 1×10^8 conidios/mL por cada aislamiento.

Diferentes grupos de 16 larvas se inocularon mediante un dispositivo que consistía en una jaula hecha de malla antinsectos soportada por alambres de cobre revestidos de laca. La jaula con las larvas se sumergió en 200 mL de una suspensión de conidios contenida en un matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad durante 20 segundos. El tratamiento testigo consistió en sumergir larvas en 200 mL de Tween 80 al 0.03% durante el mismo lapso de tiempo. El mismo procedimiento y suspensión por aislamiento se empleó para inocular las larvas e incubarlas en las diferentes temperaturas experimentales. El hecho de emplear la misma suspensión de conidios para inocular las larvas en cada temperatura permitió hacer una comparación válida entre temperaturas. La mortalidad de las larvas se registró cada tres días durante 33 días.

2.8.2 Diseño experimental y análisis de datos

Los tratamientos se dispusieron en un diseño completamente al azar y se realizaron tres replicas en días diferentes. El análisis de los datos se realizó como se describió en la sección 2.7.1. y se consideraron al aislamiento y temperatura como variables principales y su posible interacción.

2.9 Virulencia de aislamientos de hongos entomopatógenos hacia larvas de gallina ciega y su interacción con el género del insecto

En este experimento se usaron los mismos aislamientos empleados en el experimento anterior (Sección 2.8). El procedimiento para la obtención de larvas y suspensiones de conidios fueron los mismos descritos en las secciones 2.6.1 y 2.6.2 respectivamente. El procedimiento de inoculación fue el mismo descrito en la sección 2.8.1 con ciertas modificaciones, por cada unidad experimental se usaron 24 larvas, 120 larvas de *P. polyphylla* y 120 de *Anomala sp.*, dando en un total de 240 larvas.

2.9.1 Diseño experimental y análisis de datos

Los tratamientos se dispusieron en un diseño completamente al azar y se realizaron tres replicas en días diferentes. Los datos se analizaron con la misma metodología descrita en la sección 2.7.1 y se consideraron al aislamiento de hongo y género de gallina ciega como variables principales y su posible interacción.

2.10 Interacción de diferentes tipos de suelos en la virulencia de *Metarhizium anisopliae* y larvas de *Anomala sp.*

El objetivo del presente experimento fue estudiar la virulencia de aislamientos de hongos entomopatógenos contra larvas de gallina ciega en diferentes tipos de suelos. Para realizar las

pruebas, y como sujetos de experimentación se selecciono el aislamiento de *M. anisopliae* (GC01) que en resultados previos manifestó mayor virulencia y larvas de tercer instar de *Anomala* sp.

2.10.1 Colecta y localización de los suelos empleados

Los suelos empleados en estos experimentos provenían de los municipios de Jerécuaro (San Lorenzo), Valle de Santiago, Pénjamo y Comonfort, todas pertenecientes al estado de Guanajuato. En cada localidad, se colectaron cinco muestras de 3 kg de suelo a una profundidad de 30 cm. Las muestras se llevaron al Laboratorio de Patología de Insectos donde se conservaron a 4 °C hasta su uso.

2.10.1.1 Determinación de abundancia y diversidad de hongos entomopatógenos en cada uno de los suelos experimentales

Esta determinación se realizo para confirmar la presencia o ausencia de aislamientos nativos en las muestras de suelo, que pudieran modificar los resultados. Tres larvas de *G. mellonella*, previamente sumergidas en agua destilada estéril a 56 °C durante 15 segundos, para evitar que formaran su capullo, se introdujeron en un vaso de plástico transparente de 100 mL de capacidad con tapa que contenía 100 gr de suelo de cada una de las localidades como medio de soporte. En total se realizaron cinco replicas por suelo y localidad. Los vasos se incubaron a 25°C por 15 días en oscuridad total. Las larvas se revisaron cada 24 horas para detectar signos y síntomas de enfermedad. Las larvas enfermas se aislaron en forma individual y colocaron en cajas de Petri de 9 cm de diámetro conteniendo un círculo de papel filtro estéril Whatman No. 1 humedecido con agua estéril, y se incubaron a 25°C hasta que se expresara el agente causal de la enfermedad.

2.10.1.2 Determinación de poblaciones microbianas presentes en los suelos experimentales

Dentro de cuatro días posteriores a la colecta de los suelos, estos se analizaron para estimar los niveles de poblaciones microbianas presentes. Muestras de 10 g de suelo de cada localidad se suspendieron en un recipiente con 90 mL de agua destilada estéril. Las muestras se agitaron durante 18 minutos en un agitador orbital, para posteriormente preparar las diluciones seriadas. Las diluciones realizadas para cuantificar bacterias fueron $1^{-4} - 1^{-6}$, $1^{-2} - 1^{-4}$ para actinomicetos y $1^{-1} - 1^{-3}$ para hongos. Una alícuota de 100 μ L de cada una de las diluciones se distribuyó con una varilla de vidrio sobre la superficie de medio contenida en una caja Petri. Se emplearon placas de agar nutritivo para bacterias, Papa Dextrosa Agar (PDA) con rosa de Bengala para hongos y medio Czapeck con pH de 8 para actinomicetos. Por cada dilución se hicieron tres repeticiones. Las placas de agar se incubaron a 28 °C. La cuantificación de bacterias se realizó cuatro días después de la incubación, a los cinco días los hongos y los actinomicetos a los 15 días. Para realizar los conteos se seleccionó una sola dilución para cada grupo de microorganismos y muestra de suelo, y estos se expresaron en unidades formadoras de colonias (UFC). Las UFC por gramo de suelo seco al aire se calcularon al multiplicar el promedio aritmético del número de colonias/caja por el factor de dilución y el resultado se dividió entre el peso de suelo seco presente en la alícuota.

Los análisis para determinación de parámetros físico-químicos fueron llevados a cabo por personal del Laboratorio de Física de Suelos del Programa de Edafología, Colegio de Postgraduados.

2.10.2 Procedimiento de bioensayo

Las larvas de *Anomala* sp., y suspensión de conidios de *M. anisopliae*, aislamiento GC01 (Cuadro 1 y 2) se obtuvieron aplicando las metodologías descritas en las secciones 2.6.1 y 2.6.2. La inoculación de las larvas se realizó mediante la metodología descrita en la sección 2.8.1 con algunas modificaciones. En este experimento se emplearon 12 larvas del género *Anomala* sp. por unidad experimental. Una vez que los diferentes grupos de 12 larvas fueron inoculadas con la metodología descrita en la sección 2.8.1, estas fueron depositadas de manera individual en cada uno de los contenedores que representaron los diversos tratamientos (Cuadro 3). Cada tratamiento tuvo su respectivo testigo donde las larvas se expusieron a Tween 80 al 0.03%.

Cuadro 3. Tratamientos en los que los diferentes grupos de larvas inoculadas con conidios de *Metarhizium anisopliae* fueron incubadas.

Tratamiento	Método de incubación
Tratamiento 1	Cajas de cultivo de tejidos con 12 orificios.
Tratamiento 2	Vasos de plástico transparente conteniendo PeetMoos estéril.
Tratamiento 3	Vasos de plástico transparente conteniendo suelo de la localidad de San Lorenzo, Jerécuaro, Gto.
Tratamiento 4	Vasos de plástico transparente conteniendo suelo de la localidad de Valle de Santiago, Gto.
Tratamiento 5	Vasos de plástico transparente conteniendo suelo de la localidad de Pénjamo, Gto.
Tratamiento 6	Vasos de plástico transparente conteniendo suelo de la localidad de Comonfort, Gto.

Los tratamientos uno y dos fungieron como testigos positivos a la infección. El tratamiento uno consistió en incubar las larvas tratadas en cajas de cultivo de tejidos con 12 orificios, método que se empleó en todos los experimentos anteriores, y permitió corroborar la actividad biológica de los conidios sobre las larvas. El tratamiento dos consistió en incubar las larvas tratadas en PeetMoos estéril, el cual permitió confirmar que no existió interferencia por incubar las larvas tratadas en un sustrato parecido al que normalmente la larva está expuesta pero sin la presencia de microorganismos. Los demás tratamientos fueron suelos provenientes de campo sin esterilizar, y que por lo tanto contenían su población microbiana original.

Todo el experimento fue incubado a 25 °C por 33 días y las evaluaciones se realizaron cada tercer día.

2.10.3 Diseño experimental y análisis de datos

El experimento se instaló en un diseño completamente al azar y se realizaron tres repeticiones en diferentes ocasiones. Los análisis se realizaron mediante la misma metodología descrita en la sección 2.7.1. Los datos se analizaron empleando el método de incubación (tipo de suelo) como un factor, y su efecto en los niveles de infección logrados por un aislamiento en poblaciones de larvas de *Anomala* sp.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

3.1 Experimento inicial para estimar niveles de virulencia de aislamientos de hongos entomopatógenos de los géneros *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* hacia larvas de *Phyllophaga polyphylla*. y *Anomala* sp.

En este experimento no se realizó ningún análisis puesto que se tiene únicamente una sola repetición con dos pseudo-replicas. Sin embargo, nos permitió tener criterios de selección de un número menor de aislamientos para experimentos posteriores. De manera general podemos observar que las mayores mortalidades se obtuvieron en las larvas de *Anomala* sp. comparadas con las mortalidades logradas en larvas de *P. polyphylla* (Fig. 1). Dentro de los resultados obtenidos con larvas de *P. polyphylla*, podemos observar que la máxima mortalidad fue lograda con el aislamiento BbGC07 de *B. bassiana* con una proporción de 0.43, pero ninguno de los insectos muertos mostró signos visibles de infección por hongos, y la menor mortalidad por el aislamiento BbGC11 también de *B. bassiana* con una proporción de mortalidad de 0.03 (Fig. 1A). En el caso de las larvas de *Anomala* sp., las mayores mortalidades se obtuvieron con los aislamientos de MaMGC06, MaGC02 y MaMGC07 con una proporción de mortalidad de 1 (100%). Los niveles de esporulación en cada caso variaron, por ejemplo, los aislamientos MaGC02 y MaMGC07 ocasionaron una proporción de mortalidad de uno y, los niveles de esporulación tuvieron proporciones de esporulación de 0.7 y 0.1 respectivamente (Fig. 1B).

Considerando estos resultados y los niveles de esporulación *in vitro* (observación personal), se seleccionaron siete aislamientos para experimentos posteriores (Cuadro 2).

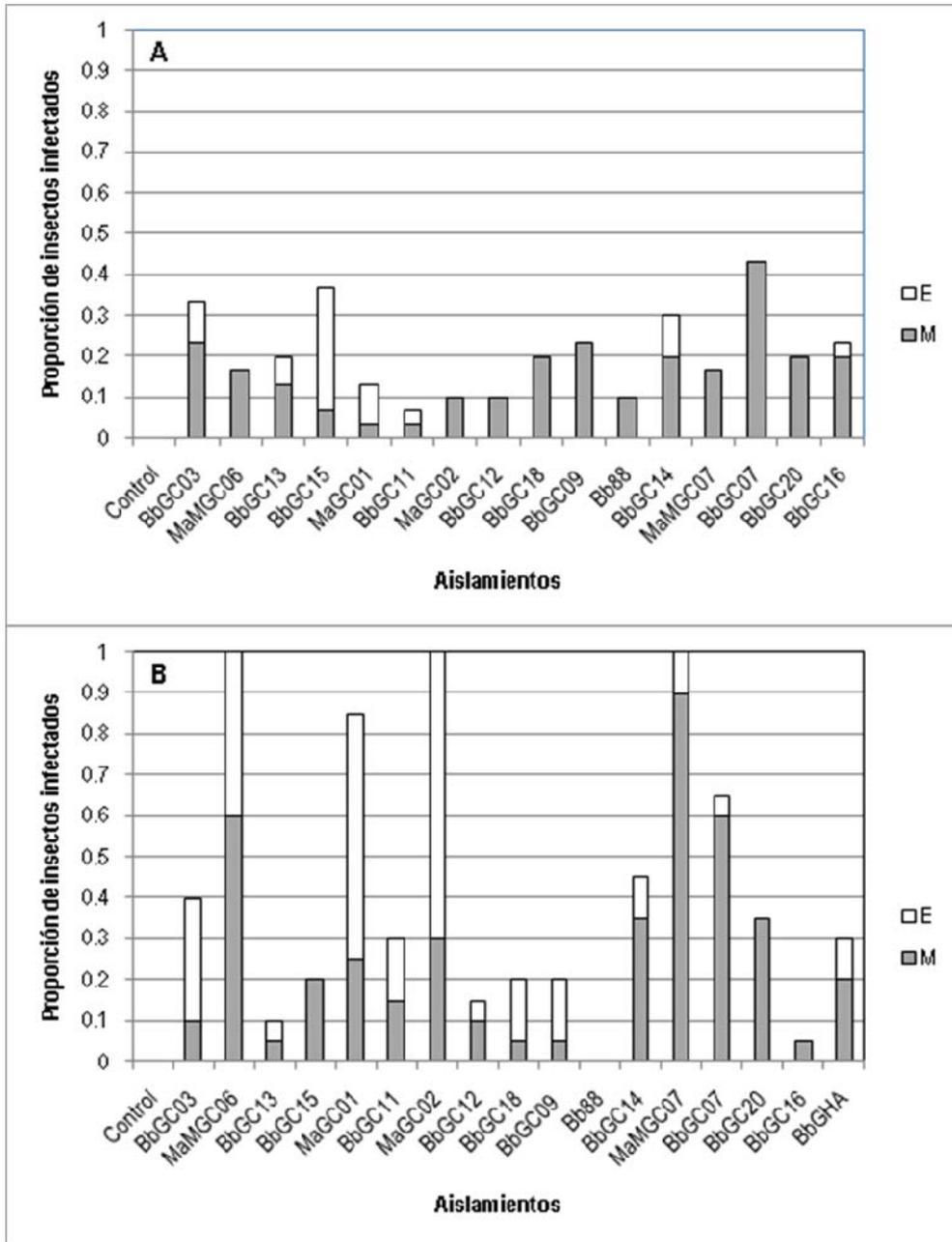


Figura 1. Proporciones de mortalidad y esporulación logradas con diferentes aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en larvas de *Pyllophaga polyphylla* (A) y *Anomala* sp. (B). E= Insectos muertos con signos visibles de esporulación. M=Insectos muertos por causas no determinadas.

3.2 Virulencia de siete aislamientos de hongos entomopatógenos contra larvas de *Phyllophaga polyphylla*

No existieron diferencias significativas entre los niveles de mortalidad ocasionados en larvas de *P. polyphylla* por los diferentes aislamientos empleados ($F_{6,14}=0.77$, $P=0.605$). La proporción máxima de mortalidad lograda fue del 0.08 obtenido con el aislamiento BbGC03 de *B. bassiana*, dicha proporción corresponde aproximadamente a un 8% de mortalidad y la proporción mas baja de mortalidad fue del 0.01 obtenida con el aislamiento MaGC01 de *M. anisopliae*, y dicha proporción corresponde a un 1% de mortalidad (Fig. 2).

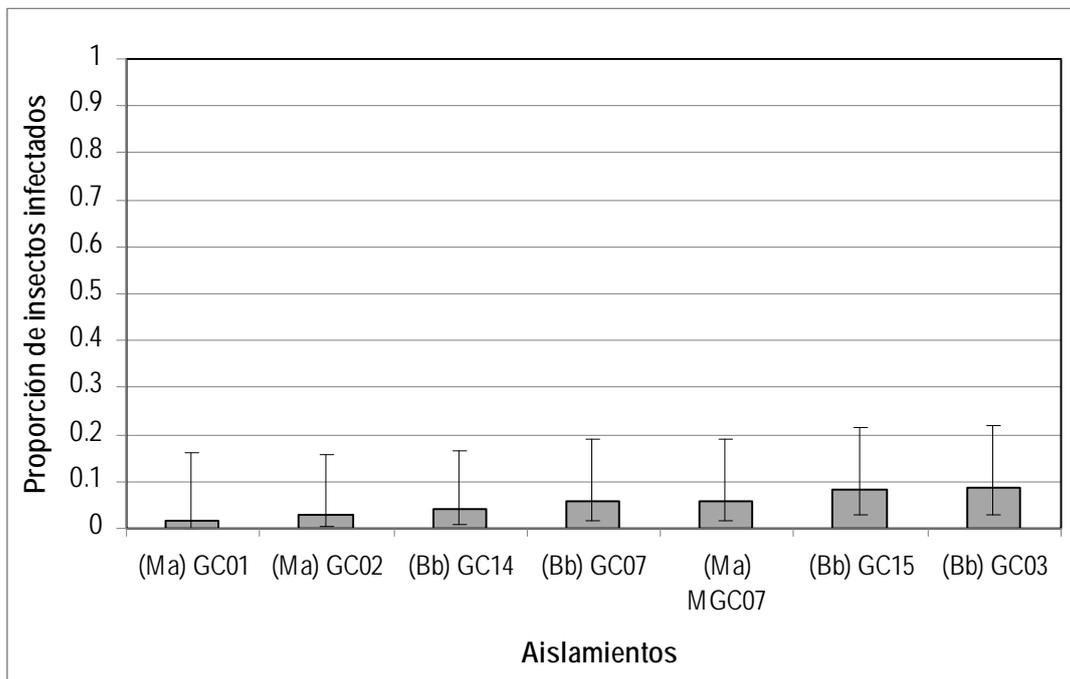


Figura 2. Proporciones de mortalidad obtenidas con cada uno de los aislamientos en larvas de *Phyllophaga polyphylla*. Las barras de error representan límites de confianza del 95%, transformadas a partir de la escala logística.

3.3 Efecto de la temperatura en la virulencia de aislamientos de hongos entomopatógenos en larvas del género *Phyllophaga polyphylla*

No se encontraron diferencias significativas entre las proporciones de mortalidad logradas con los aislamientos empleados y promediados sobre las tres temperaturas de incubación ($F_{3,24}=0.33$, $P=0.804$). La máxima proporción de mortalidad obtenida fue de 0.38 obtenida con el aislamiento BbGC03, y la mínima proporción obtenida fue de 0.11 con el aislamiento MaGC02 (Fig. 3).

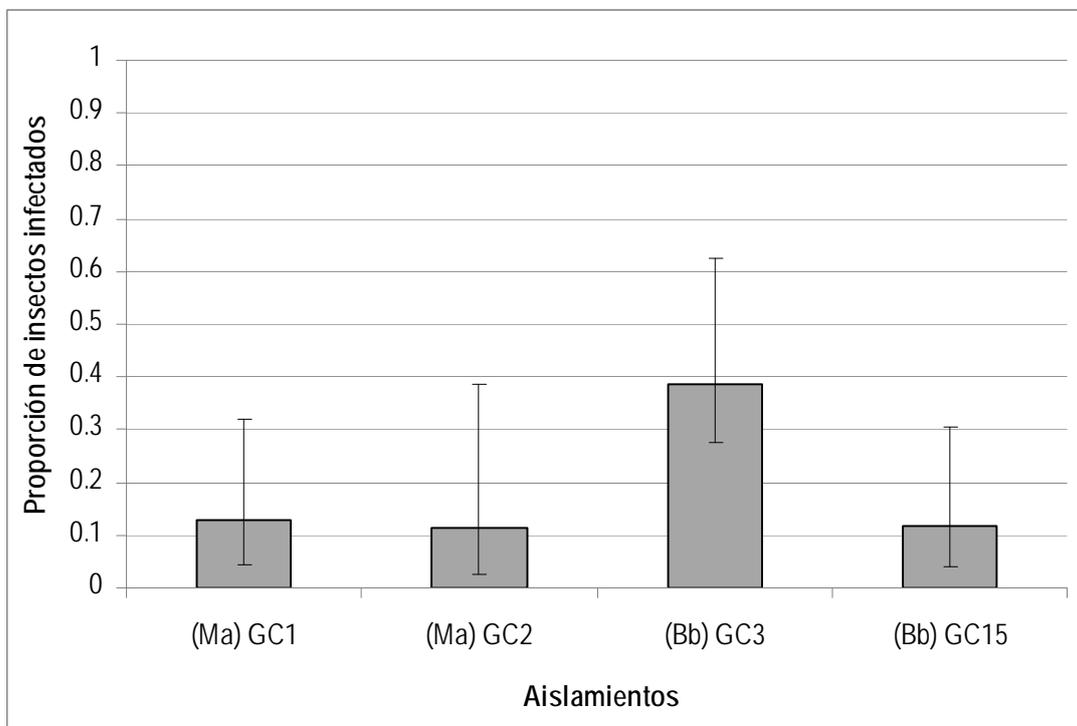


Figura 3. Proporciones de mortalidad obtenidas con cada uno de los aislamientos en larvas de *Phyllophaga polyphylla*, las proporciones son el promedio obtenido bajo las tres temperaturas de incubación. Bb= *Beauveria bassiana*, Ma= *Metarhizium anisopliae*. Las barras de error representan límites de confianza al 95%, transformadas de la escala logística.

No se encontraron diferencias significativas entre las proporciones de mortalidad generales, promediada sobre todos los aislamientos, logradas en cada temperatura de incubación ($F_{3,24}=1.60$, $P=0.911$). La proporción máxima de mortalidad lograda fue de 0.15 a 25 °C, seguida por 0.11 logradas con las temperaturas 20 y 30 C (Fig. 4).

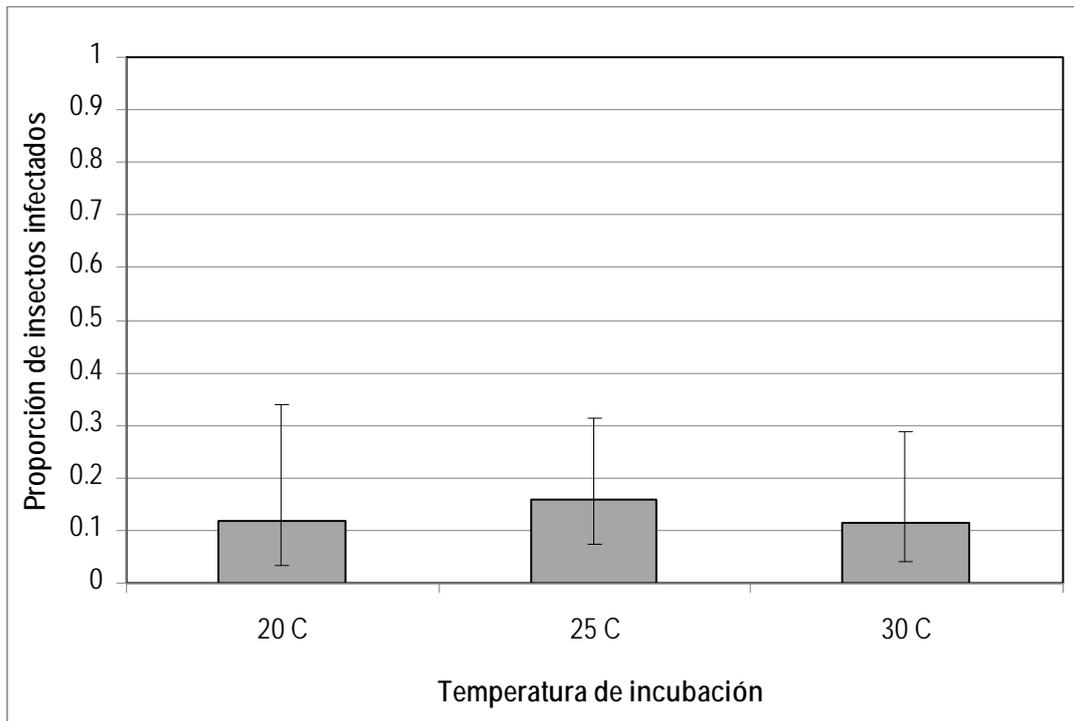


Figura 4. Proporciones de mortalidad obtenidas en cada una de las temperaturas de incubación. Las proporciones reportadas en cada temperatura son el promedio de mortalidad obtenido con todos los aislamientos. Las barras de error representan límites de confianza al 95%, transformadas de la escala logística.

Finalmente, tampoco se obtuvo una interacción significativa entre los factores aislamiento y temperatura ($F_{6,24}=1.60$, $P=0.192$), lo que significa que las proporciones de mortalidad obtenidas con cada aislamiento no varió por efecto de la temperatura de incubación (Fig. 5).

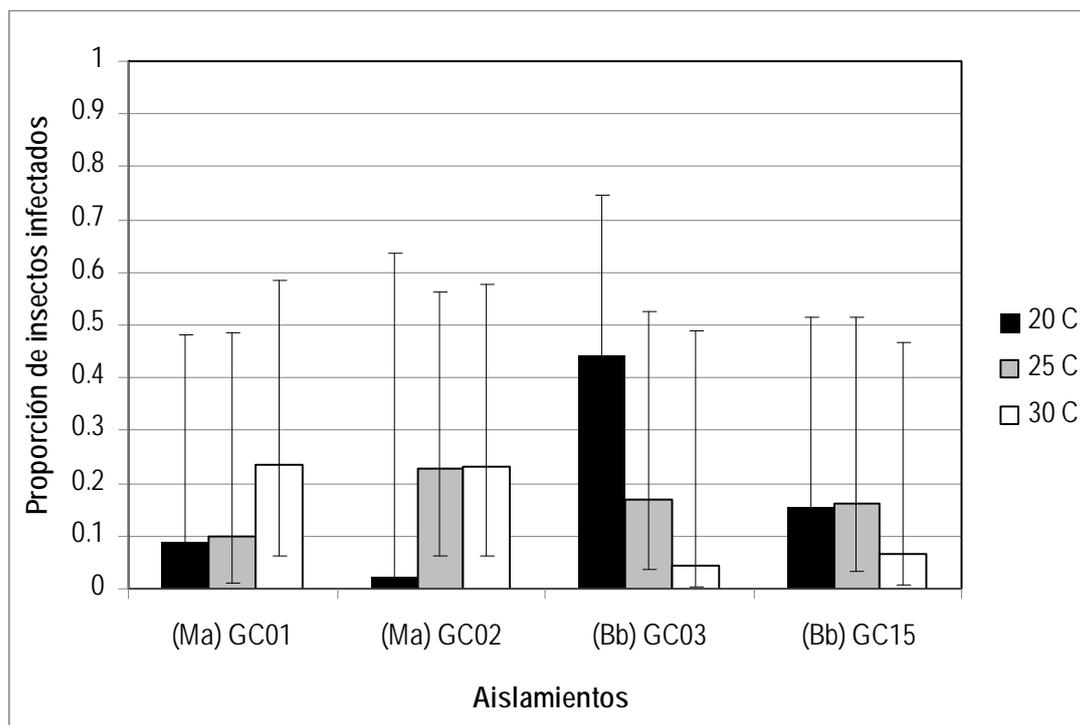


Figura 5. Proporciones de mortalidad obtenidos con los 4 aislamientos evaluados y bajo las tres temperaturas de incubación. Las barras de error representan límites de confianza al 95%, transformadas de la escala logística.

3.4 Virulencia de aislamientos de hongos entomopatógenos hacia larvas de gallina ciega y su interacción con el género del insecto

Las proporciones de mortalidad, promediadas sobre todos los aislamientos, logradas en larvas de *P. polyphylla* y del género *Anomala* sp. fueron significativamente diferentes ($F_{1,16} = 41.37$, $P < 0.001$). Las larvas del género *Anomala* sp. fueron mucho más susceptibles a la infección por hongos entomopatógenos comparadas con las larvas de *P. polyphylla* (Fig 6).

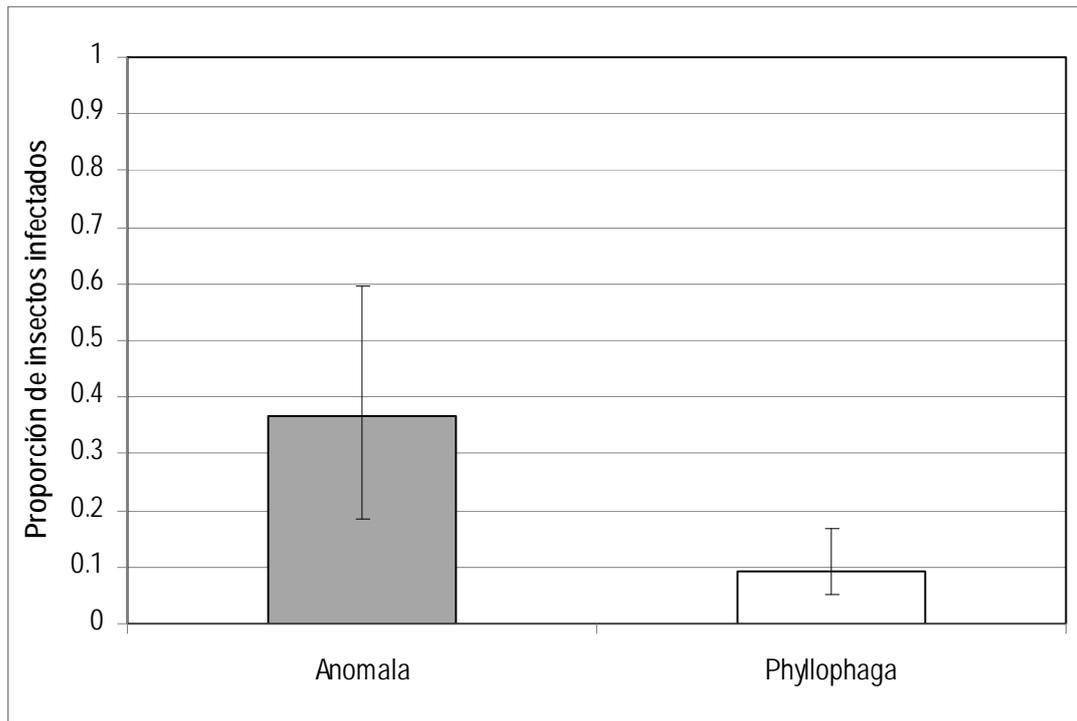


Figura 6. Proporciones de mortalidad obtenidos en larvas de los géneros *Anomala* sp y *Phyllophaga polyphylla*. Los resultados presentados son el promedio de mortalidades obtenidos con todos los aislamientos. Las barras de error representan límites de confianza al 95, transformadas de la escala logística.

Diferencias significativas fueron encontradas en las proporciones de mortalidad, promediados sobre los resultados en larvas de ambos géneros, logradas por los diferentes aislamientos evaluados ($F_{3,16}=26.16$, $P<0.001$). El aislamiento que mayor mortalidad ocasiono indistintamente del género de larva empleado fue MaGC01 de *M. anisopliae*, seguido por MaGC02 de la misma especie de hongo, BbGC15 de *B. bassiana* y finalmente BbGC03 también de la especie *B. bassiana* (Fig. 7).

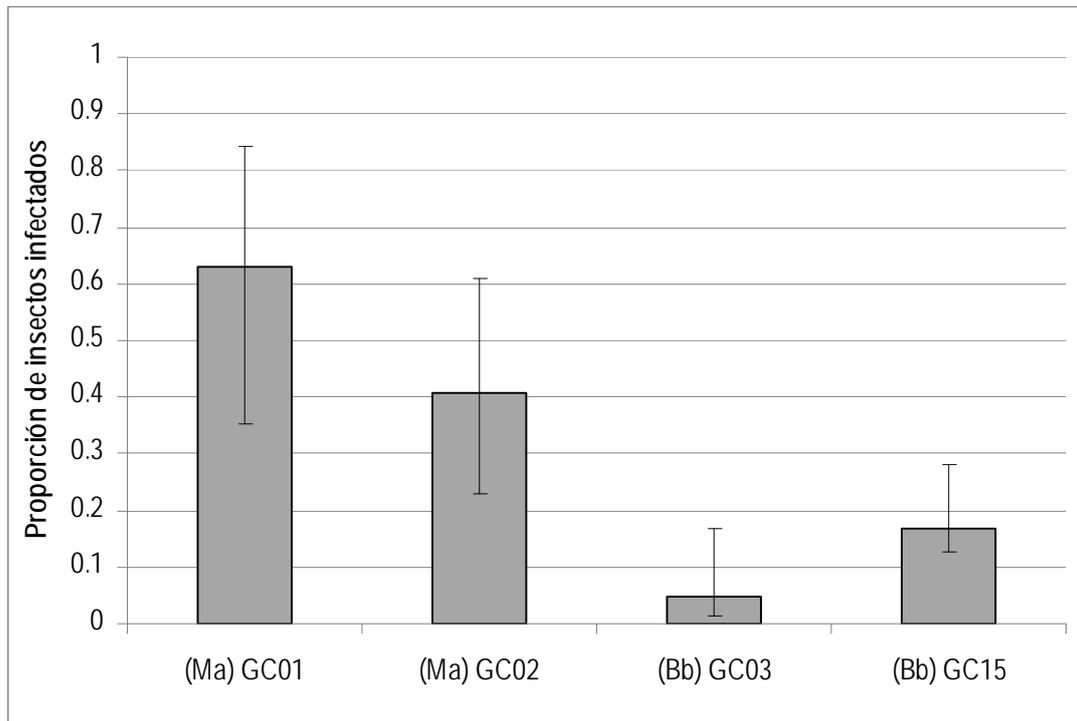


Figura 7. Promedio de proporciones de mortalidad de larvas de *P. polyphylla* y *Anomala* sp. obtenidas con cada uno de los aislamientos evaluados. Las barras de error representan límites de confianza al 95 %, transformadas de la escala logística.

Una interacción significativa entre los factores aislamiento y género de gallina ciega fue encontrado ($F_{3,16}=9.46$, $P < 0.001$). Esto indica que el patrón en el comportamiento de los aislamientos, mostrado en la Figura 7, fue diferente dependiendo del género de larva empleado. Por ejemplo, en larvas del género *Anomala* sp. el aislamiento MaGC01 de *M. anisopliae* logró la mayor mortalidad y el aislamiento BbGC03 de *B. bassiana* la menor mortalidad; sin embargo, en larvas de *P. polyphylla* el aislamiento BbGC15 de *B. bassiana*, logró la mayor mortalidad y el aislamiento MaGC02 de *M. anisopliae* la menor mortalidad (Figura 8).

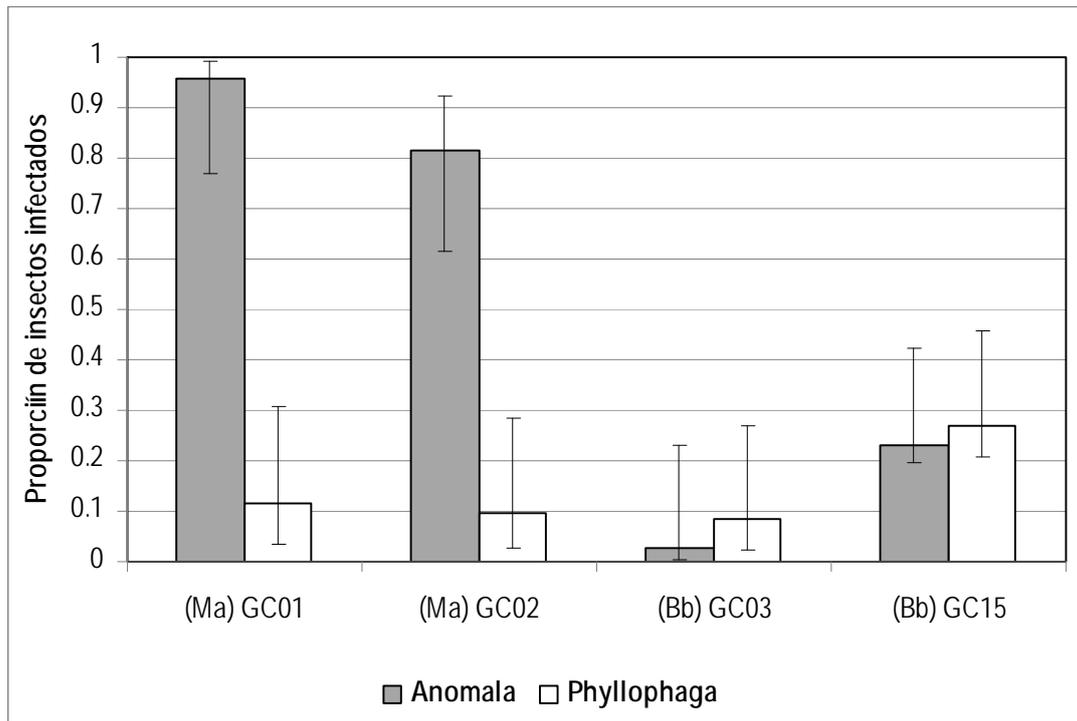


Figura 8. Proporciones de mortalidad obtenidos con los 4 aislamientos evaluados y en larvas de los géneros *Anomala* sp y *Phyllophaga polyphylla*. Las barras de error representan límites de confianza al 95%, transformadas de la escala logística.

3.5 Interacción de diferentes tipos de suelos en la virulencia de *Metarhizium anisopliae* y larvas de *Anomala* sp.

3.5.1 Características físico-químicas de los suelos experimentales

Las características físico-químicas de los suelos empleados en estos experimentos fueron determinados por personal del Laboratorio de Física de Suelos, del Colegio de Postgraduados y se presentan en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Características físico-químicas de los suelos experimentales.

Localidad	pH	DA	DR	MO	CE	NT	P	K	CIC	Textura (%)			Clase
		g cm ⁻³	g cm ⁻³	%	dS m ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	cmol kg ⁻¹	meq/100g	Arena	Limo	Arcilla	
Pénjamo	6.84	1.37	2.28	2.95	0.26	0.14	40.5	0.12	23.2	26	26	48	Arcilla
Jerécuaro	5.61	1.61	2.41	1.74	0.52	0.09	4.2	0.68	11.1	60	8	32	MAA
Valle de Santiago	7.26	1.45	2.24	2.14	1.20	0.12	21.3	1.35	38.0	14	14	72	Arcilla
Comonfort	7.37	1.48	2.39	1.47	1.18	0.09	47.8	2.35	19.7	46	26	28	MAA

DA= Densidad aparente, DR= Densidad real, MO= Materia orgánica, CE= Conductividad eléctrica, NT= Nitrógeno total, P= Fosforo, K= Potasio, CIC= Capacidad de intercambio catiónico. MAA= Migajón arcillo arenoso.

3.5.2 Población microbiana de los suelos experimentales

Las poblaciones microbianas totales obtenidas para cada muestra de suelo y localidad se ilustran para hongos y actinomicetos en la Figura 9 y para bacterias en la Figura 10.

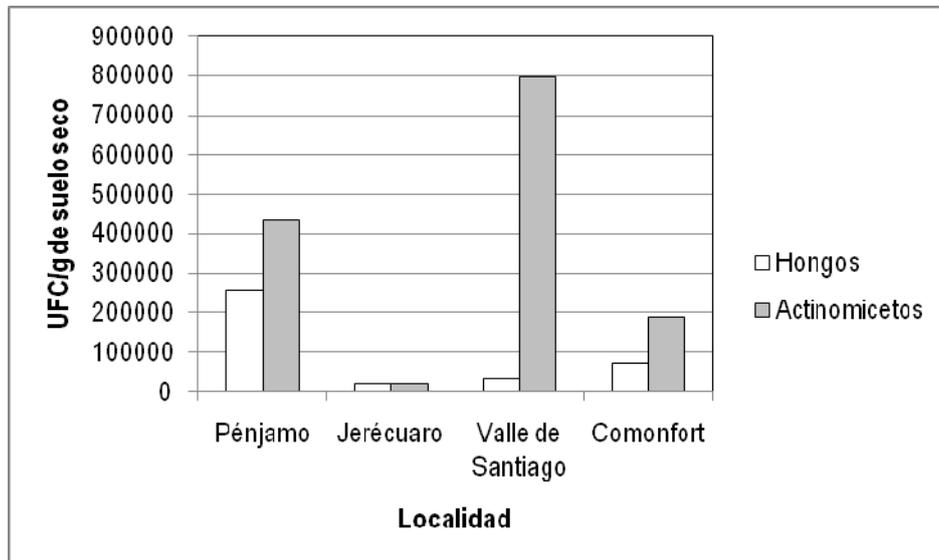


Figura 9. Poblaciones totales de hongos y actinomicetos estimadas en muestras de suelo provenientes de las localidades bajo estudio.

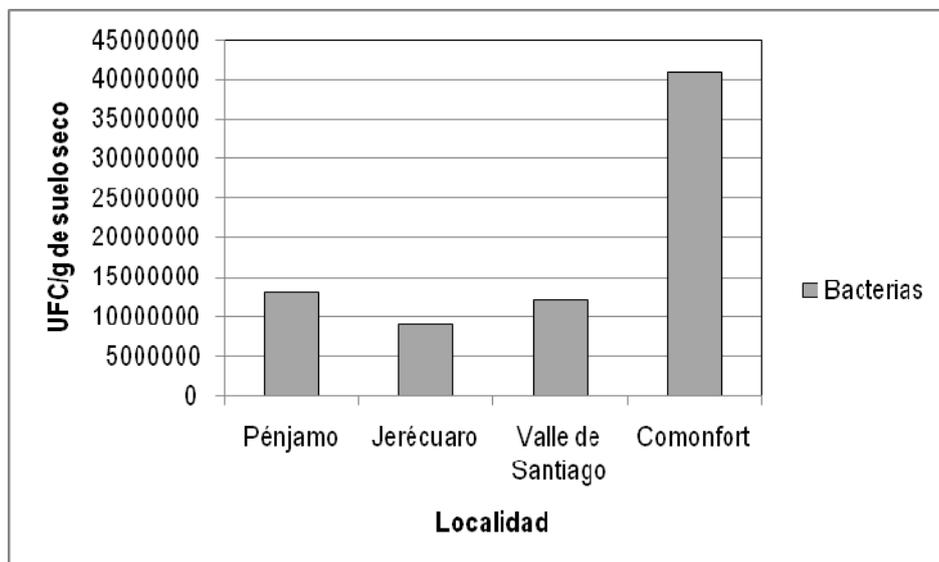


Figura 10. Poblaciones totales de bacterias estimadas en muestras de suelo provenientes de las localidades bajo estudio.

3.5.3 Efecto del tipo de suelo en la virulencia de *Metarhizium anisopliae* (MaGC02) hacia larvas de *Anomala* sp.

El análisis estadístico sugiere que existe una diferencia, no de muy alta significancia, entre las proporciones de mortalidad obtenidas en larvas de *Anomala* sp inoculadas con el aislamiento MaGC02 de *M. anisopliae* e incubadas en diferentes tipos de suelo ($F_{5,12}=3.04$, $P=0.053$). La mayor mortalidad se obtuvo en larvas incubadas en suelo proveniente del municipio de Pénjamo, con una proporción de 1 (100% de mortalidad). En los demás tipos de suelo se obtuvieron proporciones de mortalidad de aproximadamente 0.9, a excepción de las larvas incubadas en suelo proveniente del municipio de Jerécuaro, con una proporción de mortalidad de 0.65 (Fig. 11).

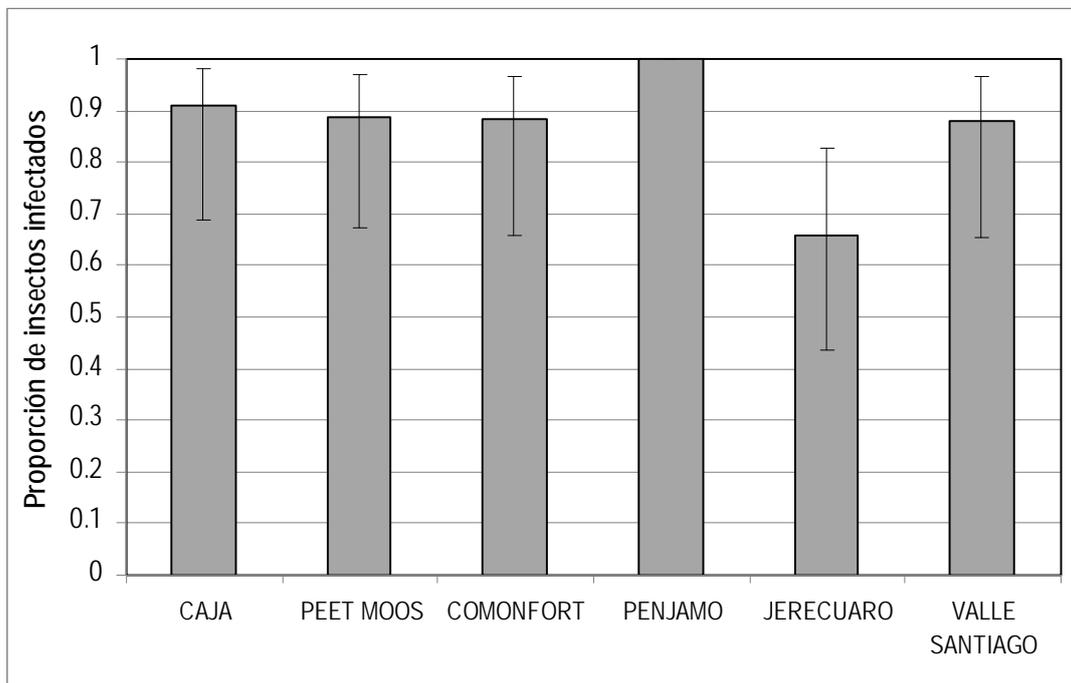


Figura 11. Proporciones de mortalidad obtenidos en larvas del género *Anomala* sp, inoculadas con el aislamiento GC02 de *M. anisopliae*, e incubadas en suelos provenientes de 4 diferentes localidades descritas en el Cuadro 3. Las barras de error representan límites de confianza al 95%, transformadas de la escala logística.

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

Los niveles de infección logrados en larvas de gallina ciega con aislamientos de hongos entomopatógenos de las especies *B. bassiana* y *M. anisopliae* resultaron bajos (Figs. 1 y 2), comparados con los niveles de infección reportados por otros autores (Rodríguez-del-Bosque *et al.*, 2005; Berón & Díaz, 2005). Es importante mencionar que es difícil realizar una comparación válida entre los resultados obtenidos en esta investigación, y la reportada por otros autores ya que estos últimos trabajaron con especies diferentes del género *Phyllophaga*, como por ejemplo *P. crinita* con mortalidades arriba del 60% en 10 días (Rodríguez-del-Bosque *et al.*, 2005) o inclusive otro género y especie diferente de gallina ciega como *Cyclocephala signaticollis* donde aislamientos de *M. anisopliae* causaron mortalidades arriba del 70% en 40 días (Berón & Díaz, 2005). En nuestro caso se trabajó con la especie *P. polyphylla* (Marín Jarillo, A., comunicación personal). Así mismo, tampoco se trabajó con los mismos aislamientos, a pesar de que son de la misma especie.

La hipótesis de trabajo de esta investigación, fue el que aislamientos nativos podrían ocasionar mortalidades por arriba del 50%, dicha hipótesis se generó con base en la premisa de que el empleo de aislamientos nativos provee una mayor probabilidad de éxito en el establecimiento de programas de manejo microbiano (Bidochka, 2001). Los resultados de los primeros experimentos en larvas de *P. polyphylla*, mostraron mortalidades máximas del 20% (Fig. 1), no obstante estos aislamientos obtuvieron mortalidades mayores que los no nativos. Esto confirma la hipótesis de que los aislamientos nativos tienen un mejor desempeño. Existen reportes donde se ha demostrado que poblaciones de insectos, cuya generación parental fue expuesta a

poblaciones de entomopatógenos y potencialmente ser infectados, pueden incrementar su resistencia a los patógenos presentes en el mismo sistema (Moret, 2006), lo que sugiere que una exposición continua de una población de insectos a patógenos prevaecientes en el mismo hábitat, daría como consecuencia un incremento en la resistencia a la infección en generaciones subsecuentes de la población insectil. Se ha sugerido que la exposición de insectos a poblaciones de patógenos nativos es mayor cuando el hábitat del insecto es el suelo (Tunaz & Stanley, 2009), que es el caso de las larvas de *P. polyphylla*. La modificación en el sistema inmune del insecto, haciéndolo más tolerante al ataque de patógenos, puede limitar la eficacia de los agentes de control biológico (Stanley & Miller, 2006). Existen diversas líneas de defensa por parte del insecto a la infección por patógenos, primeramente, el patógeno debe superar barreras como el integumento, membranas peritróficas y epitelios del intestino medio, posteriormente, el patógeno debe enfrentar varias barreras humorales y celulares. Las barreras humorales involucran la síntesis de proteínas anti-microbiales, pero estas aparentemente hacen presencia hasta después de 6 a 12 horas posteriores a la penetración del patógeno en el hemocele del insecto (Stanley & Miller, 2006), lo cual sugiere que es una respuesta tardía para poder defender adecuadamente al insecto de la infección. Las defensas celulares tienen una respuesta inmediata y tienen mecanismos como fagocitosis, micro-agregación y nodulación (Stanley & Miller, 2006). Existen varios estudios donde describen aspectos del funcionamiento del sistema inmune para evitar infección por parte del insecto (Gillespie *et al.*, 1997; Hoffmann, 2003; Leulier *et al.*, 2003; Moret, 2006; Stanley, 2006; Stanley & Miller, 2006;). La investigación generada señala a los eicosanoides como las principales sustancias en mediar la respuesta inmune de las células hacia el ataque de

microbios (Stanley, 2006), lo cual ha generado que otros autores investiguen el uso de inhibidores de la producción de eicosanoides para modificar la susceptibilidad de insectos al ataque de entomopatógenos (Stanley & Shapiro, 2009). En el caso de *P. polyphylla*, todavía es necesaria investigación para primero determinar cuál es la principal fuente de resistencia de *P. polyphylla* al ataque de hongos entomopatógenos, ya que como se ha mencionado puede ser de tipo morfológico, humoral y celular (Stanley & Miller, 2006). Este conocimiento ayudaría a desarrollar una mejor estrategia de manejo de esta plaga mediante hongos entomopatógenos.

Si la hipótesis de que la exposición continua de larvas de *P. polyphylla* hacia poblaciones nativas de hongos entomopatógenos ha hecho que estas desarrollen cierta tolerancia hacia la infección, entonces surge la duda del porque las larvas de *Anomala* sp., que también se encontraron en el mismo hábitat de *P. polyphylla*, y por consecuencia expuestas a las mismas poblaciones de patógenos, tuvieron una susceptibilidad mayor, obteniéndose mortalidades cercanas al 100%, especialmente con aislamientos de *M. anisopliae* (Fig. 6). Es probable que la aparición de ambas especies de larvas en esa localidad no hayan sido simultánea, es decir, que la población de *P. polyphylla* haya arribado primero y después *Anomala* sp., lo que dio lugar a que la primera desarrollara tolerancia antes que *Anomala*; sin embargo, esta idea queda como hipotética, ya que no se cuenta con datos históricos que confirmen esta situación, y lo más complicado, no hay reportes que indiquen del número de generaciones en que una población expuesta modifique su susceptibilidad. Es posible también que las larvas de *Anomala* sp, carezcan de algún componente que el sistema inmune de las larvas de *P. polyphylla* posee, lo cual haya

hecho que ambas poblaciones de gallina ciegas presenten susceptibilidad diferencial; sin embargo, es necesaria mayor investigación a este respecto.

Las larvas de *Anomala* sp, fueron más susceptibles a la infección por parte de los aislamientos de *M. anisopliae* que por aislamientos de *B. bassiana* (Fig. 6), esto concuerda con lo reportado por otros autores que mencionan una mayor susceptibilidad de larvas del complejo de gallina ciega hacia aislamientos de *M. anisopliae* comparados con aislamientos de otras especies (Paprawski & Yule 1991; Flores *et al.*, 2002; Ansari *et al.*, 2004; Rodríguez-del-Bosque *et al.*, 2005), lo cual confirma la premisa de que *M. anisopliae* está mejor adaptado para infectar larvas de hábitos subterráneos (Klein *et al.*, 2000). Sin embargo, también se han reportado mayor virulencia por parte de aislamientos de *B. bassiana* comparados con otras especies (Berón & Díaz, 2005). Esto enfatiza la importancia de la selección de aislamientos específicos para el control de plagas particulares.

La temperatura es uno de los factores abióticos más importantes que afecta la biología de los hongos entomopatógenos (Tanada & Kaya, 1993), considerando esto, se realizaron experimentos para determinar si la temperatura modificaba la virulencia de aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* hacia larvas de *P. polyphylla*. La virulencia no se modificó, ya que las mortalidades seguían siendo aproximadamente del 20% (Fig. 5). El efecto de la temperatura en la virulencia de hongos entomopatógenos hacia su hospedante, ya ha sido documentada por otros autores en otros sistemas de estudio, específicamente en insectos y ácaros cuyo hábitat es aéreo (Tefera *et al.*, 2003; Dimbi *et al.*, 2004; Bugeme *et al.*, 2008; Bugeme *et al.*, 2009). Los estudios de este tipo para insectos de hábitat subterráneo son prácticamente inexistentes, y solo se conoce un

reporte donde se evaluó la virulencia de dos aislamientos de *M. anisopliae* hacia larvas de *Hoplia philanthus* (Füessly) de la familia Scarabeidae, y su relación con la temperatura (Ansari *et al.*, 2004). Algunos trabajos reportan que no existen diferencias significativas en los niveles de mortalidad obtenidos bajo diferentes temperaturas de incubación, lo cual concuerda con lo encontrado en esta investigación; sin embargo, encontraron diferencias en las velocidades de mortalidad, donde a mayor temperatura mayor velocidad de mortalidad (Tefera *et al.*, 2003; Ansari *et al.*, 2004). Es probable que la poca mortalidad obtenida por los aislamientos en larvas de *P. polyphylla* empleados en este experimento haya enmascarado el efecto de la temperatura, ya que en los trabajos antes mencionados, los aislamientos ocasionaron mortalidades arriba del 70% en su hospedante, por lo que cualquier modificación de este porcentaje de mortalidad a causa de la temperatura fue detectada. Sería importante repetir estos experimentos con aislamientos más virulentos para poder determinar con mayor precisión el efecto de la temperatura en su relación con larvas de *P. polyphylla* o también con el género *Anomala* que es más susceptible. Es importante mencionar que se hace énfasis en el estudio de la temperatura, ya que este factor ha sido determinante en la selección de aislamientos (Fargues *et al.*, 1997).

En los experimentos realizados para estudiar el efecto del suelo en los niveles de mortalidad ocasionados por un aislamiento de *M. anisopliae* (GC02) en larvas del género *Anomala* sp., considerando únicamente los resultados de las 4 muestras de suelo de diferentes localidades, la mayor mortalidad se obtuvo cuando las larvas inoculadas se incubaron en suelo proveniente de la localidad de Pénjamo, y la menor mortalidad en suelo proveniente de Jerécuaro (Fig. 11). Las otras dos muestras de suelo ocasionaron mortalidades similares a los obtenidos en caja de cultivo de cultivo de tejidos (Caja) y

Peet Moos. El nivel bajo de significancia de las diferencias encontradas por el análisis estadístico, sugiere que el suelo tuvo poco efecto en los resultados obtenidos, y probablemente la diferencia obtenida se deba a los niveles de mortalidad obtenidos al incubar las larvas inoculadas en suelo de la localidad de Jerécuaro. Se tienen referencias que indican que el pH, contenido de materia orgánica y textura del suelo son de los factores que podrían modificar la sobrevivencia, y por lo tanto la estructura poblacional de hongos entomopatógenos, específicamente *B. bassiana* y *M. anisopliae* (Quesada-Moraga *et al.*, 2007). Con base en esto, el análisis físico-químico de las muestras de suelo (Cuadro 4) muestran que el pH del suelo proveniente de Jerécuaro resultó ser el más ácido con un valor 5.61, existen estudios que mencionan que *M. anisopliae* soporta mejor las condiciones ácidas (Quesada-Moraga *et al.*, 2007), por lo que se esperaría una mayor mortalidad de larvas bajo este valor de pH, pero no fue así (Fig. 11); sin embargo, es necesario realizar experimentos específicos para poder determinar el pH óptimo para este aislamiento, ya que diferentes aislamientos pueden tener diferentes rangos de pH óptimos (Rath *et al.*, 1992; Issaly *et al.*, 2005; Quesada-Moraga *et al.*, 2007). Se ha mencionado que el contenido de materia orgánica tiene efecto en la abundancia de hongos entomopatógenos en el suelo (Mietkiewski *et al.*, 1997; Quesada-Moraga *et al.*, 2007), lo cual sugiere que podría tener algún efecto en la germinación y capacidad infectiva de los conidios de *M. anisopliae* hacia las larvas de gallina ciega. En este estudio se observó que Jerécuaro presentó un porcentaje bajo de contenido de materia orgánica, con un valor de 1.74%; sin embargo, suelo de la localidad de Comonfort presentó un porcentaje aún más bajo (1.47%), pero los niveles de mortalidad obtenidos, después de incubar las larvas inoculadas en este suelo, fueron más altos (Fig. 11), esto sugiere que el contenido de

materia orgánica podría no tener un efecto directo en los niveles de mortalidad. En general, es difícil saber si alguno de los parámetros reportados en el Cuadro 4, pudieran tener algún efecto en los resultados obtenidos, pero es evidente que el suelo de la localidad de Jerécuaro, donde se presentó la menor mortalidad (Fig. 11) también presentó los niveles más bajos en la mayoría de los parámetros cuantificados (Cuadro 4). Discutir con base en esta información, tendría un alto porcentaje de especulación, y para una conclusión más definitiva, es necesario realizar experimentos diseñados específicamente para este fin; sin embargo, es probable que este suelo posea ciertas características físico-químicas que podrían tener un efecto negativo en la germinación y capacidad infectiva de los conidios de *M. anisopliae*.

La mayor población de actinomicetos se encontró en suelo de la localidad de Valle de Santiago; estos microorganismos son considerados como antagonistas para las poblaciones de hongos entomopatógenos (Vänninem *et al.*, 2000), por lo que se esperaría que la germinación e infección de los conidios de *M. anisopliae* en este suelo fuera menor, pero no fue así, ya que las mortalidades reportadas son similares a los controles positivos (Fig. 11), la menores poblaciones de actinomicetos se encontraron precisamente en suelo proveniente de Jerécuaro, donde se reporto la menor mortalidad de larvas de *Anomala* sp. (Fig. 11). La mayor población de hongos en general se reporto para el suelo proveniente de Pénjamo y la menor para Jerécuaro (Fig. 9), esto concuerda con los niveles de mortalidad encontrados, ya que la mayor y menor mortalidad de todos los tratamientos con suelo, corresponden a Pénjamo y Jerécuaro respectivamente. Es difícil poder tener una conclusión definitiva del efecto real del suelo en los niveles de mortalidad obtenidos, diversos autores concuerdan en que el mayor efecto en las

poblaciones de hongos entomopatógenos son los factores bióticos y en menor proporción los factores abióticos (Lingg & Donaldson, 1981; Rath *et al.*, 1992), ya que se ha demostrado que hongos como *Penicillium urticae* (Bainier) que son habitantes frecuentes en suelo (Lingg & Donaldson, 1981) pueden producir metabolitos que inhiben la germinación de conidios de *B. bassiana* (Shields *et al.*, 1981). Es importante mencionar que el suelo de Jerécuaro, posee ciertas características bióticas y/o abióticas que podrían tener un efecto sobre las poblaciones generales de microorganismos, ya que en este suelo se reportan las menores poblaciones de microorganismos (Figs. 9 y 10), lo cual también pudiera repercutir en los niveles más bajos de mortalidad reportados en esta muestra de suelo (Fig. 11). Hasta donde se sabe, este es el primer trabajo donde se reporta el efecto del suelo en los niveles de infección logrados por *M. anisopliae* sobre larvas de *Anomala* sp. u otra especie de gallina ciega. Existe un reporte que indica que los antagonistas presentes en suelo no-estéril, modificaron los niveles de virulencia de *B. bassiana* al infectar a la hormiga *Solenopsis invicta* (Pereira *et al.*, 1993). La mayoría de los trabajos reportados describen el efecto de factores bióticos y abióticos del suelo en la persistencia de hongos entomopatógenos (Fargues *et al.*, 1983; Vänninen *et al.*, 2000; Kessler *et al.*, 2003; Enkerli *et al.*, 2004), o en la distribución y abundancia de hongos entomopatógenos (Rath *et al.*, 1992; Vänninen, 1995; Keller *et al.*, 2003; Quesada-Moraga *et al.*, 2007). Sin embargo, mas experimentos deben realizarse para determinar factores específicos presentes en el suelo de Jerécuaro, que pudieran modificar los niveles de infección logrados en comparación con los obtenidos en los otros suelos experimentales (Fig. 11), esto información sería importante y aportaría información al estudio de la ecología de estos microorganismos.

En conclusión, se puede decir que la relación de aislamientos de hongos entomopatógenos con poblaciones de larvas de gallina ciega, ambas provenientes del estado de Guanajuato es muy compleja. Los niveles de mortalidad logrados por los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en larvas de *P. polyphylla* fueron menores del 20%, pero los mismos aislamientos, especialmente los de la especie *M. anisopliae* lograron mortalidades cercanas al 100 % en larvas del género *Anomala* sp. Los resultados logrados en *P. polyphylla* no fueron afectados por la temperatura. La germinación, y quizá la capacidad infectiva de los conidios de *M. anisopliae* fue afectada por algún factor, biótico y/o abiótico, del suelo de Jerécuaro, ya que también afecto a las poblaciones microbianas en general de este suelo. Los resultados logrados en este trabajo, no proporcionan respuestas claras a que factores del suelo pudieran tener efectos negativos en los conidios de *M. anisopliae*, por lo que se recomienda realizar experimentos específicos para este fin. Sin embargo, los resultados reportados en este trabajo, aportan mayor información a la ecología de estos microorganismos, y confirma la necesidad de estudiar más a fondo la relación hongos entomopatógenos-insectos-suelo para esclarecer el potencial real de estos microorganismos como agentes de control biológico.

CAPÍTULO 5. LITERATURA CITADA

- Ansari MA, Vestergaars S, Tirry L & Moens M, 2004. Selection of a highly virulent isolate, *Metarhizium anisopliae* CLO 53, for controlling *Hoplia philanthus*. *J. Inv. Pathol.* 85: 89-96.
- Berón CM & Díaz BM, 2005. Pathogenicity of hyphomycetous fungi against *Cyclocephala signaticollis*. *BioControl*, 50: 143-150.
- Bidochka MJ, 2001. Monitoring the fate of biocontrol fungi. In: *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential*. Butt TM, Jackson CW, Magan N (Eds.). Wallingford, UK: CABI Publishing, pp 193-218.
- Bugeme DM, Maniania NK, Knapp M & Boga HI, 2008. Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates against tetranychus evansi. *Exp. Appl. Acarol.*, 46: 275-285.
- Bugeme DM, Knapp M, Boga HI, Wanjoya AK & Maniania NK, 2009. Influence of temperature on virulence of fungal isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the two-spotted mite *Tetranychus urticae*. *Mycopathologia*, 167: 221-227.
- Chandler D, Hay D & Reid AP, 1997. Sampling and occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in UK soils. *Appl. Soil Ecol.*, 5: 133-141.
- Dimbi S, Maniania NK, Lux SA & Mueke JM, 2004. Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. *BioControl*, 49: 83-94.
- Dolci P, Guglielmo F, Secchi F & Ozino OI, 2006. Persistence and efficacy of *Beauveria brongniartii* strains applied as biocontrol agents against *Melolontha melolontha* in the Valley of Aosta (northwest Italy). *J. Appl. Microbiol.*, 100: 1063-1072.
- Enkerli J, Widmer F & Keller S, 2004. Long-term field persistence of *Beauveria brongniartii* strains applied as biocontrol agents against European cockchafer larvae in Switzerland. *Biol. Control*, 29: 115-123.
- Fargues J, Reisinger O, Robert PH & Aubart C, 1983. Biodegradation of Entomopathogenic Hyphomycetes: Influence of Clay Coating on *Beauveria bassiana* Blastospore Survival in Soil. *J. Inv. Pathol.*, 41: 131-142.
- Fargues J, Goettel MS, Smits N, Ouedrago A & Rougier M, 1997. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia*, 89: 383-392.

- Flores AG, de la Rosa W, Rojas JC, Castro-Ramírez AE, 2002. Evaluation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Mitosporic) against species of the “white grub complex” in the South of Mexico. *Southw. Entomol.*, 27: 73-83.
- García *et al*, 2009. Plagas del Suelo en Guanajuato. p 299-305. *In*: Plagas del Suelo. Ángel Rodríguez del Bosque, L. y M. Ángel Morón (eds). Plagas del suelo. Mundi Prensa. México.
- Gillespie JP, Kanost MR & Trenczek T, 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.*, 42: 611-643.
- Guzman-Franco AW, 2005. Interactions between *Zoophthora radicans* and *Pandora blunckii* isolates in *Plutella xylostella* populations. PhD Thesis. The University of Nottingham. UK
- Hoffmann JA, 2003. The immune response of *Drosophila*. *Nature*, 426: 33-38.
- Humber RA, 1997. Fungi: Preservation of cultures. *In*: L.A. LACEY ed. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. California, USA: Academic Press, Inc. 269-279
- Issaly N, Chauveau H & Aglevor F, 2005. Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviridae* Mf189 blastospores in submerged batch culture. *Process Biochem.*, 40: 1425-1431.
- Keller S, Schiweizer C, Keller E & Brenner H, 1997. Control of white grubs (*Melolontha melolontha* L) by treating adults with the fungus *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci. Technol.* 7: 105-116.
- Keller S, Schweizer C & Shah P, 1999. Differential susceptibility of two *Melolontha* populations to infections by the fungus *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci. Technol.* 9: 441-446.
- Keller S, Kessler P & Schweizer C, 2003. Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *BioControl*, 48: 307-319.
- Kessler P, Matzke H & Keller S, 2003. The effect of application time and soil factors on the occurrence of *Beauveria brongniartii* applied as a biological control agent in soil. *J. Inv. Pathol.*, 84: 15-23.
- Kessler P, Enkerli J, Schweizer C & Keller S, 2004. Survival of *Beauveria brongniartii* in the soil after application as a biocontrol agent against the European cockchafer *Melolontha melolontha*. *BioControl*, 49: 563-581.

- Klein MG, Grewal PS & Jackson TA, 2000. Lawn, turf and grassland pests. In Lacey, LA, Kaya HK (Eds.), *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Kluwer Academic Publisher, pp. 681-706.
- Koppenhöfer AM, Fuzy EM, Crocker R, Gelernter W & Polavarapu S, 2004. Pathogenicity of *Steinernema scarabaei*, *Heterorhabditis bacteriophora* and *S. glaseri* to twelve white grub species. *Biocontrol Sci. Technol.*, 14: 87-92.
- Koppenhöfer AM, Rodriguez-Solana CR, Polavarapu S & Holdcraft RJ, 2008. Entomopathogenic nematodos for control of *Phyllophaga georgiana* (Coleoptera: Scarabeidae) in cranberries. *Biocontrol Sci. Technol.* 18: 21-31.
- Leulier F, Parquet C, Pili-Floury S, Ryu J-H, Caroff M, Lee WJ, Mengin-Lecreulx D & Lemaitre B, 2003. The *Drosophila* immune system detects both Gram-positive and Gram-negative bacteria through specific peptidoglycan recongnition. *Nature Immunology*, 4: 478-484.
- Lingg AJ & Donaldson MD, 1981. Biotic and Abiotic Factors Affecting Stability of *Beauveria bassiana* Conidia in Soil. *J. Inv. Pathol.*, 38: 191-200.
- Loera-Gallardo *et al.*, 2010. In: Plagas del Suelo. Ángel Rodríguez del Bosque, L. y M. Ángel Morón (eds). Plagas del suelo. Mundi Prensa. México.
- Loesh A, Hutwimmer S & Strasser H, 2010. Carbon utilization pattern as a potential quality control criterion for virulence of *Beauveria brongniartii*. *J. Inv. Pathol.* 104: 56-65.
- Marin Jarillo, A. y Bujanos Muñiz, R. 2008. Especies del complejo “Gallina Ciega” del género *Phyllophaga* en Guanajuato, México. *Agricultura Técnica en México*. 34: 349-355.
- Meyling, NV & Eilenberg J, 2006. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agric. Ecosys. Environ.*, 113: 336-341.
- Mietkiewski RT, Pell JK & Clark SJ, 1997. Influence of Pesticide use on the Natural Occurrence of Entomopathogenic Fungi in Arable Soils in the UK: Field and Laboratory Comparisons. *Biocontrol Sci. Technol.*, 7: 565-575.
- Moret Y, 2006. “Trans-generational immune priming”: specific enhancement of the antimicrobial immune response in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proc. R. Soc. B*, 273: 1399-1405.
- Morón, M.A. 1986. El género *Phyllophaga* en México: morfología, distribución y sistemática supraespecifica (Insecta: Coleoptera) Publ. 20, Instituto de Ecología, México.

- Morón, 2010. *In: Plagas del Suelo. Ángel Rodríguez del Bosque, L. y M. Ángel Morón (eds). Plagas del suelo. Mundi Prensa. México.*
- Núñez-Valdez ME, Calderon MA, Aranda E, Hernandez L, Ramirez-Gama RM, Lina L, Rodríguez-Segura Z, Gutierrez MD & Villalobos FJ, 2008. Identification of a putative Mexican strain of *Serratia entomophila* pathogenic against root-damaging larvae of scarabeidae (Coleoptera). *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 802-810.
- Paprawski TJ & Yule WN, 1991. Incidence of fungi in natural populations of *Phyllophaga* spp. and susceptibility of *Phyllophaga anxia* (Leconte) (Col, Scarabeidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina). *J. App. Entomol.* 112: 359-365.
- Pereira RM, Stimac JL & Alvez SB, 1993. Soil Antagonism Affecting the Dose-Response of Workers of the Red Imported Fire Ant, *Solenopsis invicta*, to *Beauveria bassiana* Conidia. *J. Inv. Pathol.* 61: 156-161.
- Quesada-Moraga E, Navas-Cortes JA, Maranhao EAA, Ortiz-Urquiza A & Santiago-Alvarez C, 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycol. Res.*, 111: 947-966.
- Rath AC, Koen TB & Yip H, 1992. The influence of abiotic factors on the distribution and abundance of *Metarhizium anisopliae* en Tasmanian pasture soils. *Mycol. Res.*, 96: 378-384.
- Rodríguez-del-Bosque LA, Silvestre F, Hernández VM, Quiroz H & Throne JE, 2005. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Phyllophaga crinita* and *Anomala flavipennis* (Coleoptera: Scarabeidae). *J. Entomol. Sci.* 40: 67-73.
- Ryan *et al.*, 2002. Phenotypic degeneration occurs during sector formation in *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Applied Microbiology.* 93:163-168.
- Sevim A, Demir I, Höfte M, Humber RA & Demibarg Z, 2010. Isolation and characterization of entomopathogenic fungi from hazelnut-growing region of Turkey. *BioControl*, 55: 279-297.
- Shields MS, Lingg AJ & Heimsch RC, 1981. Identification of a *Penicillium urticae* Metabolite Which Inhibits *Beauveria bassiana*. *J. Inv. Pathol.*, 38: 374-377.
- Stanley D, 2006. Prostaglandins and Other Eicosanoids in Insects. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 25-44.

- Stanley DW & Miller JS, 2006. Eicosanoid actions in insecto cellular immune functions. *Entomol. Exp. Appl.* 119: 1-13.
- Stanley DW & Shapiro M, 2009. Eicosanoids influence insecto susceptibility to nucleopolyhedroviruses. *J. Inv. Pathol.* 102: 245-249.
- Tanada Y & Kaya HK, 1993. *Insect Pathology*. California, U.S.A.: Academic Press, Inc.
- Tefera T & Pringle K, 2003. Germination, radial growth and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates and their virulence to *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) at different temperatures. *Biocontrol Sci. Technol.*, 13: 699-704.
- Tunaz H & Stanley D, 2009. An immunological axis of biocontrol: infections in field-trapped insects. *Naturwissenschaften*, 96: 1115-1119.
- Vänninen I, 1995. Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. *Mycol. Res.*, 100: 93-101.
- Vänninen I, Tyni-Juslin J & Hokkanen H, 2000. Persistence of augmented *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Finnish agricultural soils. *BioControl*, 45: 201-222.