



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**INTERACCIÓN DE NEMATODOS Y
HONGOS ENTOMOPATÓGENOS
COMO REGULADORES DE
*Phyllophaga polyphylla***

Alejandro Martínez Hernández

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

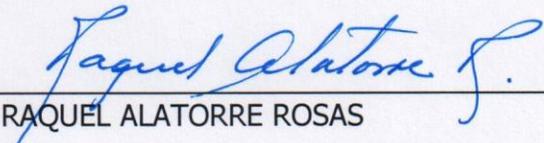
2014

La presente tesis titulada: **INTERACCIÓN DE NEMATODOS Y HONGOS ENTOMOPATÓGENOS COMO REGULADORES DE *Phyllophaga polyphylla*** realizada por el alumno: **ALEJANDRO MARTÍNEZ HERNÁNDEZ** 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
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

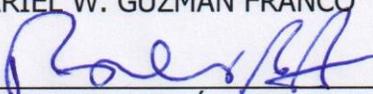
CONSEJERO


DRA. RAQUEL ALATORRE ROSAS

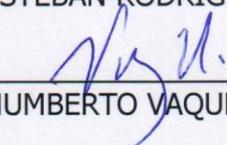
ASESOR


DR. ARIEL W. GUZMÁN FRANCO

ASESOR


DR. ESTEBAN RODRÍGUEZ LEYVA

ASESOR


DR. HUMBERTO VAQUERA HUERTA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre de 2014

INTERACCIÓN DE NEMATODOS Y HONGOS
ENTOMOPATÓGENOS COMO REGULADORES DE *Phyllophaga*
***polyphylla*.**

Martínez-Hernández Alejandro

Colegio de Postgraduados, 2014

RESUMEN

Phyllophaga polyphylla (Coleoptera: Scarabaeidae) es una plaga importante del maíz y otros cultivos en México. En informes anteriores se ha reportado que esta plaga fue altamente resistente a la infección por hongos y nematodos cuando cada patógeno se inoculó por separado; en este estudio se evaluó si la inoculación mixta de los hongos y nematodos, en todas las combinaciones y órdenes de la inoculación posibles aumentarían la mortalidad en larvas de *P. polyphylla*. Los patógenos fueron dos aislados de Heterorhabditis bacteriophora aplicados a una concentración de 50 juveniles infectivos mL⁻¹, una cepa de *Beauveria pseudobassiana* y una cepa de *Metarhizium pingshaense* aplicados a una concentración de 1x10⁸ conidios mL⁻¹; todos los patógenos se aplicaron en concentraciones con las cuales se espera alcanzar el 10% de muertes aplicados de forma individual. Cuando los patógenos fueron inoculados en combinación la mortalidad fue de 13 %, aunque significativamente más altos que los tratamientos inoculados solo con motilidad de 8%, esto mostro una interacción antagónica entre los agentes patógenos; ninguna combinación de patógenos (cuatro) o el orden de la inoculación (tres) pudieron alcanzar una mortalidad mayor que 20%, como cabría esperar en un efecto aditivo o

interacción sinérgica. La comprensión de los mecanismos de interacción requiere un mayor estudio, pero, para el control biológico práctico, sugerimos que son necesarios aislando más virulentos de hongos y de nematodos para lograr el control de *P. polyphylla*.

Palabras clave: gallina ciega, infección mixta, *Heterorhabditis bacteriophora*,
Metarhizium pingshaense, *Beauveria pseudobassiana*

NEMATODES AND FUNGI INTERACTION AS REGULATORS

ENTOMOPATHOGENIC OF *Phyllophaga polyphylla*.

Martínez-Hernández Alejandro

Colegio de Postgraduados, 2014

ABSTRACT

Phyllophaga polyphylla (Coleoptera: Scarabaeidae) is an important pest of maize and other crops in Mexico. Previous reports showed that this pest was highly resistant to fungal and nematode infection when each pathogen was inoculated separately; in this study we evaluated whether dual-inoculating fungi and nematodes, in all possible pair-wise combinations and orders of inoculation, would increase mortality in *P. polyphylla* larvae. The pathogens were two isolates of *Heterorhabditis bacteriophora* applied at a concentration of 50 infective juveniles mL⁻¹, one isolate of *Beauveria pseudobassiana* and one isolate of *Metarhizium pingshaense* both applied at a concentration of 1x10⁸ conidia mL⁻¹; all pathogens were applied at concentrations expected to achieve 10% kill when applied individually. The combined mortality when pathogens were dual inoculated (13%), although significantly higher than single inoculated treatments (8%), demonstrated that antagonistic interactions were ongoing between the pathogens; no pathogen combination (four) or order of inoculation (three) tested achieved mortalities greater than 20%, as would be expected in an additive or synergistic interaction. Understanding the mechanisms for the interaction requires further study but, for practical biological control, we suggest that more virulent fungal and nematode isolates are necessary to achieve control of *P. polyphylla*.

Keywords: white grub, mixed infection, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Metarhizium pingshaense*, *Beauveria pseudobassiana*

DEDICATORIA

A mis padres:

Que siempre han estado a mi lado aún en la distancia, porque ellos son la inspiración de este camino que he seguido, por ser los mejores padres y dar todo por sus hijos.

A mis hermanas:

A ti Naye, que me has acompañado todos estos años en el mismo camino, por ser mi compañera de vida.

A ti Keza, que le brindas tanta felicidad a la familia, porque desde que llegaste siempre le has dado felicidad a nuestras vidas.

A mi abuelo Rogaciano el que me enseñó todo lo que sé del campo. A Carmen e Isabel que siempre me demuestran su cariño y apoyo. A ti León Hernández Gómez porque siempre serás un ejemplo a seguir y te recordare donde quiera que estés.

A todos mis tíos y primos que siempre me reciben de una forma cálida y feliz, por seguir disfrutando siempre esos momentos de estar en familia.

A tod@s mis amig@s y a mis hermanos, los de Oaxaca, los de Chapingo, los del Colegio y los que he conocido en este andar.

AGRADECIMIENTOS

A tod@s l@s luchador@s sociales, porque gracias a su sacrificio he tenido la fortuna de poder desarrollarme en escuelas públicas, a todas esas personas obreros, estudiantes y profesionistas que forman esta gran nación, gracias a México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado para la realización de la Maestría en Ciencias.

Al Colegio de Postgraduados (CP) por darme la oportunidad de seguir desarrollándome de manera profesional.

A la Doctora Raquel Alatorre Rosas por brindarme sus conocimientos y saberes de una forma desinteresada, por confiar en mí, por ayudarme en estos años en mi formación personal y académica, por creer en mí y alentarme a desarrollar mis capacidades, por darme la oportunidad de poder desarrollarme en la Maestría en los campos que desconocía y mucho más en la Patología, por eso y mucho mas, GRACIAS.

Al Comité Estatal de Sanidad Vegetal Guanajuato (CESAVEG) por brindarnos el apoyo con la identificación de sitios y la colecta de larvas en campo.

Al M.C. Fernando Tamayo Mejía por todo su apoyo y dirección brindada en los viajes a Guanajuato y por sus conocimientos otorgados en las charlas donde coincidimos.

Al Doctor Ariel W. Guzmán Franco por todo su apoyo en la parte experimental y redacción de este trabajo.

Al Doctor Esteban por el apoyo y puntuales observaciones en la revisión de este trabajo.

A mis padres que siempre han estado a mi lado, apoyándome incondicionalmente.

A mis hermanas por estar siempre conmigo y en mi corazón.

A Isis Jaimez Ruiz, Balthazar Rendón Espíritu, Carlos Patricio Illescas Riquelme, Abraham Domínguez Madrigal por el apoyo para la realización este trabajo.

A todos los integrantes del laboratorio, Fabián, Jorge, Nico, Jhony, Carmen, Sarah Augusto, por esas platicas y consejos de apoyo, en especial a Lupita y Nuvia, por estar al pendiente de los trabajos y ayudar siempre a que todo marche bien.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
DEDICATORIA	vii
AGRADECIMIENTOS	viii
ÍNDICE DE CUADROS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	3
Insectos	3
Hongos entomopatógenos	4
Nematodos entomopatógenos	5
Estimación de la CI50 de los aislamientos de <i>H. bacteriophora</i> en larvas de <i>P. polyphylla</i>.	5
Análisis estadístico	6
Interacción hongos-nematodos entomopatógenos en larvas de <i>P. polyphylla</i>.	7
Análisis estadístico	9
RESULTADOS	10
Estimación de la CL50 de los aislamientos de <i>H.</i>	10

bacteriophora en larvas de *P. polyphylla*.

Interacción hongos-nematodos entomopatógenos en 11

larvas de *P. polyphylla*.

DISCUSIÓN 12

LITERATURA CITADA 17

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Concentración letal 50 (CL50) de aislamientos del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* sobre larvas de tercer ínstar de *Phyllophaga polyphyla*.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mortalidad causada por los tratamientos solos o en interacción, la mortalidad con aislamientos solos fue de 0.075 (7.5%) mientras que la mortalidad en interacciones fue de 0.11 (11%).

Figura 2. Proporción de mortalidad de larvas de *Phyllophaga polyphylla* por interacciones de dos entomopatógenos (eje Y: 1=100%).

INTRODUCCIÓN

El complejo de plagas denominado “gallina ciega” (Coleoptera: Scarabaeoidea) incluye especies rizófagas de importancia económica con distribución mundial (Aragón & Morón, 1997; Theurkar et al. 2012). Este complejo ataca a más de 40 cultivos de importancia económica donde destacan los cereales, leguminosas y hortalizas (Argüello et al. 1999). En Latinoamérica sólo en el cultivo de maíz ocasiona pérdidas anuales mayores del 15% en la producción (Argüello et al. 1999). En cultivos de maíz en México en el complejo gallina ciega pueden coexistir especies de al menos tres géneros (*Phyllophaga*, *Cyclocephala* y *Anomala*) (Marín & Bujanos, 2008; Lugo-García et al. 2012). Las especies del género *Phyllophaga* son las de más amplia distribución e importancia (Aragón et al. 2005; Hidalgo, 2001), y *Phyllophaga polyphylla* se encuentra entre las especies económicamente más importantes (Morón et al. 1997; Marín, 2001; Marín & Bujanos, 2008).

El control del complejo gallina ciega es difícil debido a sus hábitos subterráneos, estacionalidad y patrón de ataque en manchones ya que, en la mayoría de los casos, su detección sucede cuando el daño al cultivo ya ocurrió. Se ha demostrado que especies de *Phyllophaga* y *Cyclocephala* presentan resistencia a algunos insecticidas (Loera-Gallardo et al, 2010), lo que demanda el desarrollo de métodos de control alternativos y selectivos para el control de estas plagas, en particular dentro del control cultural y el control biológico (Pérez-Consuegra, 2004).

Los agentes de control biológico para el complejo de gallina ciega incluyen nematodos (NEP) y hongos entomopatógenos (HE), algunas de estas especies son efectivas contra un amplio rango de insectos plaga incluyendo especies dentro del orden Coleoptera (Barbercheck & Kaya, 1990; Wang et al. 1995; Shapiro-Ilan et al. 2004; Ansari et al.

2006; Jabbour et al. 2011). Existen reportes de especies de gallina ciega con susceptibilidades diferentes hacia los nematodos, las cuales pueden ir desde altamente susceptibles a moderadamente resistentes. Por ejemplo *P. japonica* mostró mortalidades de hasta 70 % (Ansari et al. 2003), y especies como *Exomala (Anomala) orientalis*, *Rhizotrogus majalis*, *Maladera castanea*, *P. crinita* y *P. congrua* que pueden ser muy susceptibles a *Steinernema scarabei* (Stock y Koppenhofer), pero también con una baja susceptibilidad hacia *H. bacteriophora* (Poinar) y *S. glaseri* (Steiner) (Koppenhofer et al. 2000; Koppenhofer & Fuzy 2003; Grewal et al. 2005; Koppenhofer et al. 2006). Algunos ensayos preliminares demostraron que *P. polyphylla* es poco susceptible hacia *S. carpocapse* (mortalidades <5%), pero más susceptible a la infección por *H. bacteriophora* (40% de mortalidad) (Martínez-Hernández., 2012).

Por otro lado los hongos entomopatógenos son importantes ya que infectan a los insectos por contacto, persisten en el ambiente por largo período de tiempo y presentan un amplio rango de hospederos (Glare et al. 2012). En algunos trabajos se reporta la capacidad infectiva de aislamientos de *Beauveria bassiana* s.l. (Balsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* s.l. (Metschnikoff) Sorokin sobre larvas de *P. crinita*, *P. menetriesi*, *P. vicina* y *P. polyphylla* (Poprawski & Yule, 1991; Shannon et al. 1993; Najera-Rincón et al. 2005; Guzmán-Franco et al. 2012; Carrillo-Benítez et al. 2013). Trabajos específicos sobre *P. polyphylla* indicaron baja susceptibilidad de esta especie hacia la infección por aislamientos de *B. bassiana* s.l. y *M. anisopliae* s.l., con mortalidades máximas de 20% (Enríquez-Vara et al. 2012; Guzmán-Franco et al. 2012). A pesar de que individualmente estos entomopatógenos (hongos y nematodos) no logran infecciones superiores al 50% en larvas de *P. polyphylla*, un método potencial para lograr un mayor porcentaje de infección es la combinación de ambos patógenos. Se ha

reportado que los niveles de infección de ambos patógenos pueden incrementarse usando combinaciones de estos agentes biológicos, y que el incremento puede deberse a efectos sinergistas o aditivos (Barbercheck & Kaya, 1990; Lacey et al. 2001; Ansari et al. 2004; Acevedo et al. 2007; Ansari et al. 2008). Los mecanismos involucrados en estas interacciones no son claros, Ansari et al. (2008) sugieren que un agente puede estresar y alterar el comportamiento del hospedero haciéndolo más susceptible al otro agente. Insectos infectados con *M. anisopliae* son debilitados haciéndolos más susceptibles a los NEP (Ansari et al. 2004; Ansari et al. 2006). Por lo que la combinación de estos agentes de control biológico pudieran ser una herramienta adicional dentro del manejo integrado de diferentes especies de gallinas ciegas o de otros insectos (Ansari et al, 2006; Wu et al. 2014). Con base en estos escenarios el objetivo de este trabajo fue conocer el efecto de las interacciones entre aislamientos de *Metarhizium pingshaense* (GC01) y *Beauveria pseudobassiana* (GC03) con dos aislamientos de *Heterorhabditis bacteriophora*, (HbB) y (HbCP), sobre larvas de tercer ínstar de *P. polyphylla*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Insectos

Se utilizaron larvas de *Phyllophaga polyphylla* de tercer ínstar que se recolectaron en campo, todas procedían de cultivos de maíz recolectadas de agosto a octubre del 2013 en San Lorenzo, Jerécuaro, Guanajuato, México. Las larvas se colocaban en recipientes con Peat Moss estéril (GrowingMix®, Canadá) para transportarlas al laboratorio de Patología de Insectos en el Colegio de Postgraduados, Texcoco. En el laboratorio los individuos se separaron por género, en base a las características de la palidia presente en

el último segmento abdominal (Morón, 2003). Las larvas se almacenaron individualmente en recipientes de plástico transparente de 100 mL, cada recipiente tenía 22 gr de Peat Moss, humedecido al 60%, y una rodaja de zanahoria que sirvió como alimento, la zanahoria se reemplazaba cada 10 días. Todas las larvas se mantuvieron a $24^{\circ}\text{C}\pm 2$ por 30 días antes de usarse en los experimentos; durante este periodo las larvas se revisaron periódicamente y las que tuvieran algún signo de enfermedad o daño mecánico se eliminaron antes de iniciar los ensayos.

Hongos entomopatógenos

Se utilizaron dos aislamientos que se aislaron originalmente de larvas de *Phyllophaga* sp., un aislamiento fue de *Metarhizium pingshaense* (GC01) y el otro de *Beauveria pseudobassiana* (GC03) (Carrillo-Benítez et al. 2013).

Los hongos se cultivaron en Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) en cajas Petri de 90 mm de diámetro, y se incubaron a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, GC01 por 15 días y GC03 por 25 días, hasta su completa esporulación. Los conidios se suspendieron en 20 mL de una solución de Tween al 0.03% contenida en un tubo de centrifuga de 50 mL, esta suspensión se filtró para remover restos de micelio, se usó una doble capa de pañalina colocada en un embudo de cristal, y se recolectó nuevamente en otro tubo estéril de 50 mL. La concentración de conidios se estimó usando una cámara Neubauer y se ajustó a 1×10^8 conidios mL^{-1} . Se determinó el porcentaje de conidios viables por la técnica de recuento en placas con ADS (Goettel & Inglis, 1997), y la viabilidad siempre fue mayor al 95 %.

Nematodos entomopatógenos

En el caso de nematodos se usaron dos aislamientos de *Heterorhabditis bacteriophora*, el aislamiento HbB lo proporcionó originalmente el Dr. Harry Kaya de la Universidad de California, Davis, EE.UU., y el aislamiento HbCP que se obtuvo de muestras de suelo de campos de maíz en Montecillo, Texcoco, Estado de México. Ambos aislamientos se reprodujeron en larvas del último estadio de *Galleria mellonella* (L.), de una cría de laboratorio, mantenidas a $24 \pm 2^\circ \text{C}$ (Kaya & Stock, 1997). Los juveniles infectivos (JI) se obtuvieron de las larvas de *G. mellonella* después de 11 días de la infección, para ello se emplearon trampas White (Kaya & Stock, 1997). Los nematodos se esterilizaron en cloruro de benzalconio al 0.01%, para esto los JI se mantuvieron durante cinco minutos en esta solución, este proceso se repitió en tres ocasiones y posteriormente se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril. Los JI se almacenaron en frascos de cultivo de tejidos de 250 cc a $9 \pm 1^\circ \text{C}$ durante un máximo de dos semanas antes de usarse en los experimentos. Previo a su uso en cada experimento, los JI se mantuvieron por 4 horas a temperatura ambiente. Se tomó una muestra de 100 μl y se contabilizaron los nematodos para determinar la concentración de JI en la suspensión, se tomaron cinco muestras más, se promediaron y se estimó la concentración presente en el volumen total.

Estimación de la CL50 de los aislamientos de *H. bacteriophora* en larvas de *P. polyphylla*

Con el fin de determinar la CL_{50} , la cual se empleó en los experimentos de interacción con hongos, se realizó este experimento donde larvas de *P. polyphylla* del tercer ínstar se expusieron a diferentes dosis de los dos aislamientos de *H. bacteriophora*. Se utilizaron 6 dosis de JI (50, 100, 300, 500, 700 y 1000 JI/mL⁻¹) más un testigo sin nematodos. Para cada concentración se emplearon 20 larvas con el procedimiento siguiente. Se utilizaron recipientes de plástico transparente de 100 mL para colocar, de manera individual, 1 mL de agua destilada estéril conteniendo las diferentes concentraciones de JI. Después de 24 horas, las larvas de *P. polyphylla* se depositaron de manera individual en cada uno de los recipientes. En el testigo únicamente se colocaron 1 mL de agua destilada estéril. La mortalidad se evaluó cada tercer día desde el día 6 hasta el día 24 posteriores a la inoculación. Los experimentos se mantuvieron en cámaras de cría a 25°C en total oscuridad.

Análisis estadístico

El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar, todos los tratamientos se realizaron el mismo día y el experimento completo se repitió en tres ocasiones diferentes. Para estimar la concentración letal media (CL_{50}) se empleó un análisis Probit de modelos paralelos, el cual primero ajusta todos los datos de mortalidad a una sola línea Probit, después permite que las ordenadas al origen varíen entre las líneas Probit generada para cada aislamiento, y finalmente permite variación entre las pendientes de estas líneas. El mejor modelo se seleccionó con base en pruebas parciales de F. La CL_{50} para cada aislamiento de *H. bacteriophora* se estimó a partir del mejor modelo seleccionado. Los intervalos de confianza para cada valor de CL_{50} se calcularon de acuerdo al teorema de Fieller (Fieller, 1944). Se permitió una mayor variación que los datos esperados bajo una distribución binomial cuando fue necesario comparando la

desviación media de los tratamientos y la desviación media residual contra una distribución F, en lugar de hacer la comparación normal de la desviación media de los tratamientos contra una distribución de χ^2 . Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico GenStat ver 8.0 (Payne et al. 2005).

Interacción hongo-nematodos entomopatógenos en larvas de *P. polyphylla*

Este experimento consistió en evaluar el efecto de la interacción de los dos aislamientos de *H. bacteriophora* usando una concentración de 50 JI mL⁻¹ (< CL₅₀) para cada uno con los dos aislamientos de hongos. No se estimó CL₅₀ para los hongos, ya que experimentos previos demostraron que usando una concentración de 1x10⁸ conidios mL⁻¹, con estos mismos aislamientos, nunca se obtuvo mortalidades superiores del 20% (Guzmán-Franco et al. 2012). Por esta razón se utilizó esta concentración (1x10⁸ conidios mL⁻¹) en los experimentos de interacción. Los entomopatógenos se evaluaron en todas las combinaciones posibles, de esta forma se obtuvieron cuatro combinaciones (GC01+HbB, GC01+HbCP, GC03+HbB y GC03+HbCP). En cada una de las combinaciones de patógenos se evaluaron tres tratamientos, 1) ambos patógenos inoculados de manera simultánea, 2) primero el nematodo y después el hongo y 3) primero el hongo y después el nematodo.

La metodología fue la misma para cada combinación. Para el tratamiento 1 (inoculación simultánea), las larvas se sumergieron en una suspensión de hongo (1X10⁸ conidios mL⁻¹), siguiendo la metodología descrita por Guzmán-Franco et al. (2012), posteriormente se colocaron en los recipientes de 100 mL con Peat Moss estéril, con 60% humedad, luego se colocaron los 50 JI/mL y el dispositivo se mantuvo a 25±1°C en completa obscuridad. Para el segundo tratamiento, primero nematodo y después hongo, las larvas

de tercer ínstar se colocaron de manera individual en los recipientes de plástico conteniendo el Peat Moss previamente inoculado con 50 JI, las larvas se dejaron en estos recipientes durante 72 horas. Posteriormente, las larvas se retiraron de estos vasos y se inocularon con el hongo con la misma metodología descrita anteriormente, y se depositaron en nuevos recipientes de plástico con Peat Moss estéril (60% humedad) y se incubaron. En el tercer tratamiento (primero hongo y después nematodo), las larvas se inocularon primero con hongos y se mantuvieron a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ en Peat Moss, con 60% de humedad, por 72 horas. Después de esto las larvas se cambiaron a un recipiente de plástico (100 mL) con Peat Moss estéril en donde se había colocado previamente la suspensión de nematodos, y se mantuvieron bajo las condiciones arriba mencionadas. Adicionalmente, diferentes grupos de larvas (21 larvas) se inocularon con cada patógeno de manera individual (testigos positivos), y un grupo de larvas se sumergieron únicamente en agua destilada (testigo absoluto) con la misma metodología descrita anteriormente para cada patógeno, todo el material se incubó a las mismas condiciones ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$ y oscuridad total).

Todos los tratamientos se realizaron el mismo día, el experimento completo se repitió en tres diferentes ocasiones. Para cada combinación de patógenos se usaron tres unidades experimentales (tres tratamientos de inoculación dual) con 21 larvas cada uno (63 larvas por combinación) con cuatro combinaciones, cuatro testigos positivos y dos testigo absolutos) con 21 larvas cada uno (105 larvas), y tres repeticiones del experimento, dando un total de 1,134 larvas. En todos los tratamientos la mortalidad se registró cada tercer día, el registró comenzó al tercer día posterior a la inoculación del último patógeno, y se concluyó en el día 39. Las larvas muertas, en cualquiera de las unidades experimentales, se separaron y se mantuvieron en observación por un periodo de 15

días para verificar causa de muerte. En los tratamientos de inoculación dual, las larvas muertas se colocaron en cinco categorías, muertas por hongo, muertas por nematodo, muerta por ambos patógenos, muerta por causas no determinadas y vivas.

Análisis estadístico

Los datos de interacción entre nematodos y hongos se analizaron usando regresión logística, asumiendo que los datos tuvieron una distribución binomial, donde cada número de larvas muertas fue una proporción del total de larvas evaluadas. Cuando fue necesario, la presencia de mayor dispersión de los datos bajo el supuesto de la distribución binomial se permitió, comparando la proporción de la desviación media de los tratamientos y la desviación media residual contra una distribución F , en lugar de comparar la desviación de los tratamientos con una distribución de χ^2 . Los resultados obtenidos entre repeticiones en tiempo fueron comparados para poder ser combinados. Primeramente, se comparó entre todos los tratamientos con inoculación de un solo patógeno (combinando ambos patógenos) contra todos los tratamientos de inoculación dual (independientemente de la combinación). Posteriormente, considerando únicamente los tratamientos de inoculación dual, se comparó entre las cuatro combinaciones (conjuntando los tres tratamientos dentro de cada combinación), para finalmente comparar entre los tres tratamientos: 1) inoculación simultánea, 2) primero hongo y después nematodo y 3) primero nematodo y después hongo, independientemente de la combinación. El análisis se realizó en el programa GenStat v. 8 (Payne et al. 2005).

RESULTADOS

Estimación de la CL50 de los aislamientos de *H. bacteriophora* en larvas de *P. polyphylla*

No se encontraron diferencias entre las ordenadas al origen ($F_{1,26}=0.72$, $P=0.403$) ni las pendientes ($F_{1,26}=0.07$, $P=0.799$) de las líneas Probit de cada aislamiento, esto sugiere que la virulencia de ambos aislamientos del nematodo *H. bacteriophora* fue similar sobre las larvas de *P. polyphylla*. La CL₅₀ estimada para cada aislamiento se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Concentración letal 50 (CL50) de aislamientos del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* sobre larvas de tercer ínstar de *Phyllophaga polyphylla*.

Aislamiento	LC50 JI/Larva	Limites fiduciales	Ordenada al origen	Pendiente
HbB	70.25	19.91 - 131.2	-2.292	1.201
HbCP	93.83	31.3 - 164.8	-2.292	1.201

Interacción hongo-nematodos entomopatógenos en larvas de *P. polyphylla*

No se detectaron diferencias entre repeticiones en el tiempo ($F_2, 44=0.18, P=0.839$), por esta razón todos los datos se combinaron para los análisis posteriores. La proporción de mortalidad de las larvas de *P. polyphylla*, fue mayor en los tratamientos de inoculación dual (independientemente de la combinación) comparado con los tratamientos de inoculación con un solo patógeno independientemente del patógeno ($F_1, 44=4.29, P=0.044$) (Fig. 1). A pesar que la combinación de nematodos y hongos (HbB+GC01) proporcionó una mortalidad ligeramente superior (13%) que el resto de combinaciones, no se encontró diferencia entre la proporción de mortalidad de larvas de *P. polyphylla* en las cuatro combinaciones de entomopatógenos ($F_3, 22=0.36, P=0.789$). Tampoco se encontró diferencia entre el orden de inoculación de cada patógeno ($F_8, 22=0.13, P=0.997$).

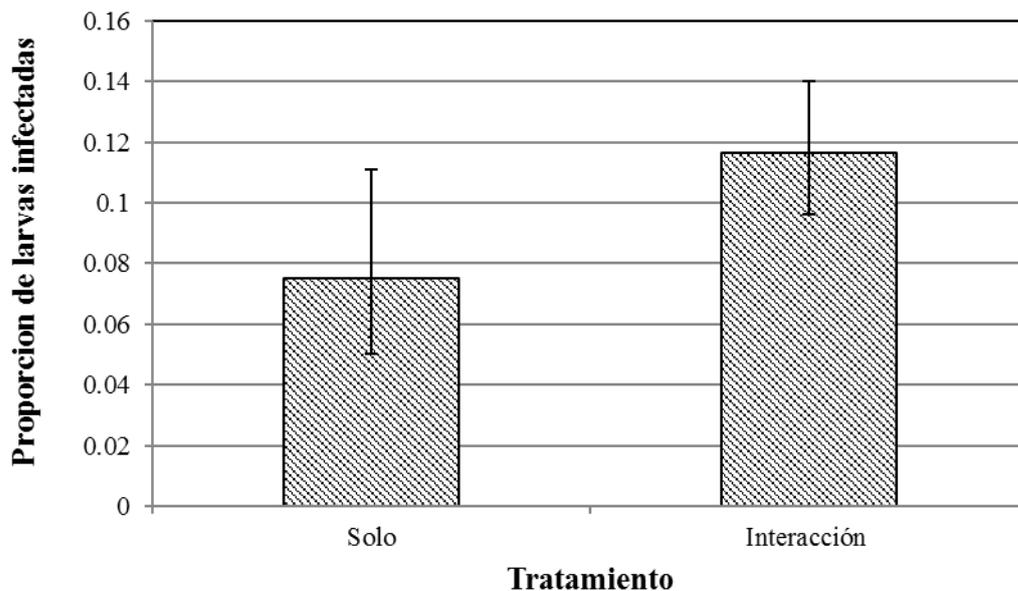


Figura 1. Mortalidades causadas por los tratamientos en grupos, solos contra interacciones, la mortalidad con aislamientos solos fue de 0.075 mientras que las mortalidad en interacciones fue de 0.11 donde 1 =100%.

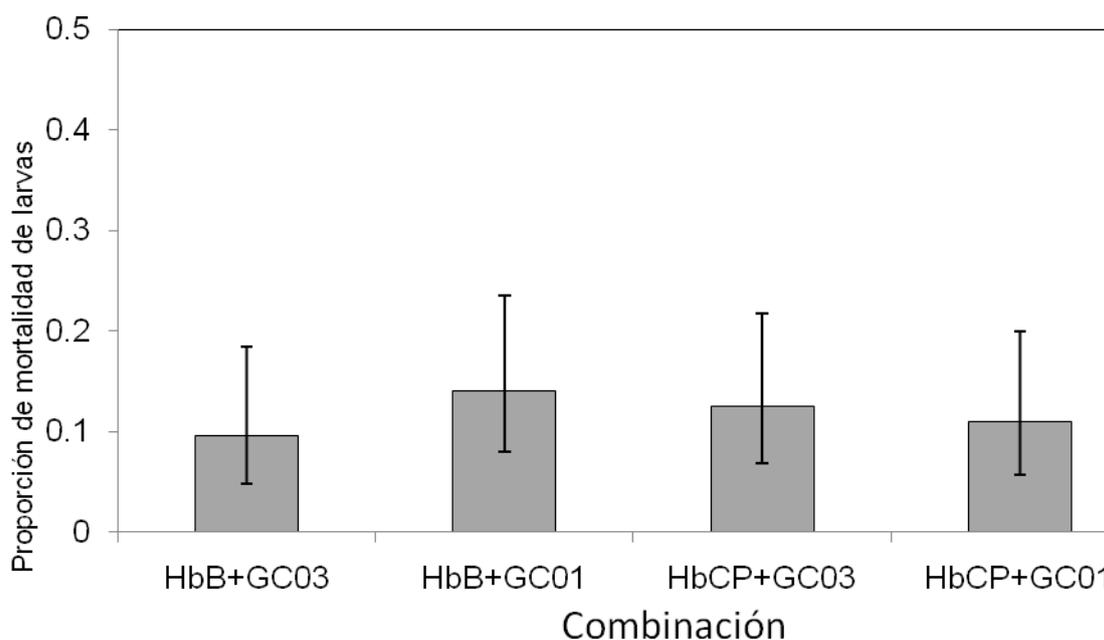


Figura 2. Proporción de mortalidad de larvas de *Phyllophaga polyphylla* por interacciones de dos entomopatógenos (eje Y: 1=100%).

DISCUSIÓN

En este estudio se investigó el efecto de combinar aislamientos de hongos con baja virulencia hacia larvas de tercer ínstar de *P. polyphylla* con dosis subletales de dos cepas de *Heterorhabditis bacteriophora* (50 JI mL⁻¹); la inoculación se realizó de manera simultánea o con diferente orden de inoculación. Los tratamientos con *Beauveria*

pseudobassiana (GC03) y *Metarhizium pingshaense* (GC01) por si solos no tuvieron efecto significativo sobre la mortalidad de larvas de *P. polyphylla*, lo cual confirma resultados previos con esta especie de insecto y estos aislamientos de hongos (Enríquez-Vara et al. 2012; Guzmán-Franco et al. 2012). Sin embargo, cualquiera de las cuatro combinaciones de patógenos produjeron mayor mortalidad que las inoculaciones individuales (Fig. 1), aunque esa mortalidad no fue diferente entre ninguna de las combinaciones (Fig. 2), la mortalidad en los tratamientos duales fue significativamente mayor (13 %) a la mortalidad causada por un solo patógeno (8 %); esto sugiere que la combinación de estos grupos de patógenos, tiene el potencial de causar mayor mortalidad en larvas de *P. polyphylla* a diferencia de la inoculación individual con un organismo a pesar de que las diferencias en % de mortalidad son bajas.

Los resultados de las inoculaciones individuales con cualquiera de los hongos entomopatógenos confirmaron los reportes anteriores, ya que se logró una tasa de infección del 10% aproximadamente (Guzmán-Franco et al, 2012; Enríquez-Vara et al, 2012) (Fig. 1). Los aislamientos de nematodos mostraron una virulencia similar contra larvas de *P. polyphylla* (Cuadro 1) lo que nos permitió utilizar la misma dosis experimental de JIs para ambos aislamientos. La mortalidad lograda con las inoculaciones individuales en ambos aislamientos también fue como se predijo (50 JIs) (Martínez-Hernández, 2012). Se utilizó intencionalmente dosis bajas con la finalidad de poder detectar los cambios en la tasa de mortalidad entre tratamientos, con lo cual sería posible detectar si existe un potencial aditivo (las mortalidades esperadas en inoculaciones dobles serían de 20%), sinérgico (mortalidad en inoculaciones duales >20%) o interacciones antagónicas (mortalidad en inoculaciones <20%). Nuestros resultados muestran un claro efecto antagonista, ya que las inoculaciones dobles nunca

alcanzaron un 20% o >20% de mortalidad como se esperaba si hubiera estado actuando de forma aditiva o sinérgica respectivamente. El análisis mostró que la mortalidad alcanzada cuando cada patógeno se inoculó de forma individual eran todos similares (8% aproximadamente) lo que estaba cerca del 10% esperado. El efecto antagonista que encontramos ocurrió independientemente de las combinaciones de los agentes patógenos o el orden de la inoculación. Estudios previos sobre este tipo de interacciones han reportado efectos sinérgicos cuando se aplicaron *Metarhizium anisopliae* y nematodos entomopatógenos *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema feltiae* y *S. krussei* sobre larvas de *O. sulcatus* (Ansari *et al.*, 2008); los autores utilizaron la CL₅₀ estimada para cada patógeno en la inoculación dual, obteniendo mortalidades en las inoculaciones dobles de 60 y 100% las cuales deben de ser consideradas antagónicas (menos del 100%) o aditivo (100%) en lugar de efectos sinérgicos (lo cual no sería posible determinar con la CL₅₀), sin embargo, los autores encontraron un efecto significativo del tiempo de residencia de los nematodos antes de los hongos entomopatógenos, el efecto aditivo se observa en donde el tiempo de residencia del nematodo antes de la aplicación de hongos es el más largo (tres semanas). Esto sugiere que, a mayor tiempo de residencia (más de 72 horas) podríamos obtener potencialmente mayor mortalidad, tal vez cercanos a un efecto aditivo.

Los mecanismos del efecto de la interacción no son claros, pero es posible que el sistema inmune de la larva juegue un papel importante, ya que si los insectos se exponen a ambos microorganismos, su sistema inmune podría estar actuando para evitar la infección, lo que eventualmente debilitaría al insecto incrementando con esto su

mortalidad. También es importante considerar la posibilidad de que los nematodos, al estar en contacto con las larvas de gallina ciega, podrían provocar heridas que favorezcan la entrada de los hongos entomopatógenos (Lewis & Clarke, 2012).

La reproducción de ambos organismos entomopatógenos en el hospedero fue deficiente, para los nematodos en interacciones y en las infecciones solas; los hongos en las larvas que infectaron mostraron mayor esporulación cuando se encontraban solos que cuando se encontraban en la interacción, en las infecciones donde se encontraron signos de presencia de ambos organismo se vio disminuida la producción de esporas. Thomas et al. (2003) mencionaron que es posible que se reduzca significativamente la reproducción de patógenos cuando se mejora la mortalidad en la infección mixta, esto se observó en el experimento para el caso de los hongos, la mortalidad en interacciones aumentó pero la esporulación del hongo disminuyó sobre la larva. Staves y Knell (2010) mencionaron que la capacidad competitiva está determinada por la naturaleza de la infección, la competencia entre organismos similares (hongo con hongo) puede ser menor que entre nematodos y hongos, los hongos tiene la capacidad de producir toxinas para inhibir al organismo en competencia, esta producción de toxinas por parte de los hongos contra los nematodos pudiera afectar la reproducción de los nematodos en las larvas, y provocar competencia por el espacio dentro de la larva. Se observó entonces que la interacción de hongos y nematodos favorece la mortalidad de larvas, pero el desarrollo y reproducción de los agentes patógenos se redujo, esto puede deberse a la acción del sistema inmune del hospedero y la competencia entre bacteria simbionte y el hongo dentro del hospedero.

En conclusión, nuestros resultados muestran que la mortalidad de larvas de *P. polyphylla* puede incrementarse al combinar hongos y nematodos, este incremento fue indistinto de la especie de hongo o cepa de nematodo, esta aplicación combinada es significativamente mayor en mortalidad que si se aplica solo un organismo, pero el efecto general de esta interacción fue antagónico en lugar de aditivo o sinérgico. La reproducción de los nematodos fue deficiente o nula en todos los tratamientos y la esporulación de los hongos disminuyó en los tratamientos con interacciones, esto limita la diseminación y establecimiento de los organismos patógenos. Para el control biológico desde un punto de vista práctico se sugiere que aislamientos más virulentos de hongos y nematodos deben ser evaluados, esto puede proporcionar mayores oportunidades de obtener resultados aditivos o sinérgicos y un mejor control de plagas.

LITERATURA CITADA

Acevedo J.P.M., Samuels R.I., Machado I.R. and Dolinski C. (2007) Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 96, 187-192.

Ansari, M. A., Tirry L. and Moens M. (2003) Entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria for the biological control of *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biol. Control*, 28, 111–117.

Ansari M. A., Shah F. A. and Butt T. M. (2008) Combined use of entomopathogenic nematodes and *Metarhizium anisopliae* as a new approach for black vine weevil, *Otiorrhynchus sulcatus*, control. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 129, 340–347.

Ansari M. A., Shah F. A., Tirry L. and Moens M. (2006) Field trials against *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae) with a combination of an entomopathogenic nematode and the fungus *Metarhizium anisopliae* CLO 53. *Biological Control* 39: 453-459.

Ansari M. A., Tirry L. and Moens M. (2004) Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for the control of *Hoplia philanthus*. *Biological Control*, 31, 172-180.

Aragón G. A., Morón M. A., López-Olguín J. F. and Cervantes-Peredo L. M. (2005) Ciclo de vida y conducta de adultos de cinco especies de *Phyllophaga Harris*, 1827 (Coleoptera: Melolonthinae; Melolonthidae). *Acta Zoológica Mexicana*, 21, 87-99.

Aragón G. A. and Morón M. A. (1998) Evaluación del daño ocasionado por el complejo gallina ciega (Coleoptera: Melolonthidae) en el estado de Puebla, México. *Avances en el estudio de la diversidad, importancia y manejo de los coleópteros edáficolas americanos*. (eds. M.A. Morón & A. Aragón), pp. 143-149. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y Sociedad Mexicana de Entomología, Puebla, México.

Argüello H., Cáceres O. y Morón M. A. (1999) Guía ilustrada para identificación de especies de gallina ciega (*Phyllophaga* spp.) presentes en las principales zonas agrícolas de Nicaragua. *PROMIPAC–Nicaragua, Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras*. 18 p.

Barbercheck E. M. and Kaya H. K. (1990) Interactions between *Beauveria bassiana* and the Entomopatogenous Nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis heliothidis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 55, 225-234.

Carrillo-Benítez M. G., Guzmán-Franco A. W., Rosas R. A. and Enríquez-Vara J. N. (2013) Diversity and genetic population structure of Fungal pathogens infecting white grubs larvae in agricultural soils. *Microb. Ecol.*, 65, 437-449.

Enríquez-Vara J. N., A. Córdoba-Aguilar, A. W. Guzmán-Franco, R. Alatorre-Rosas, and J. Contreras-Garduño. 2012. Is Survival After Pathogen Exposure Explained by Host's Immune Strength? A Test with Two Species of White Grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) Exposed to Fungal Infection. *Environmental Entomology*, 41, 959-965.

Fieller E. C. (1944) A fundamental formula in the statistics of biological assay and some applications. *Quarterly Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 17, 117-123.

Glare, T., Caradus J., Gelernter W., Jackson T., Keyhani N., Kohl J., Marrone P., Morin L. and Stewart A. (2012) Have biopesticides come of age?. *Trends in Biotechnology*, 30, 250-258.

Goettel S. and Inglis G. D. (1997) Fungi: Hyphomycetes. *Manual of Techniques in Insect Pathology* (eds. L. A. Lacey & H. K. Kaya), pp. 213-249. Academic Press, San Diego.

Grewal, P. S., Ehlers R. U. and Shapiro-Illan D. I. (2005) Critical issues and research needs for expanding the use of nematodes in biocontrol. *Nematodes as Biocontrol Agent* (eds. P. S. Grewal, R. U. Ehlers & D. Shapiro-Illan), pp. 479-489. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Guzmán-Franco A. W., Hernández-López J., Enríquez-Vara J. N., Alatorre-Rosas R., Tamayo-Mejía F. and 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.

Hidalgo E. (2001) Uso de microorganismos para el control de *Phyllophaga* spp. *CATIE Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, Hoja Técnica 37, 60.

Jabbour R., Crowder D. W., Aultman E. A. and Snyder W. E. (2011) Entomopathogen biodiversity increases host mortality. *Biological Control*, 59, 277-283.

Kaya H. K. and Stock S. P. (1997) Techniques in insect Nematology. *Manual of Techniques in Insect Pathology* (ed. L. A. Lacey), pp. 281-324. Academic Press, New York.

Koppenhofer A. M., Grewal P. S. and Fuzy E. M. (2006) Virulence of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis zealandica*, and *Steinernema scarabaei* against five white grub species (Coleoptera: Scarabaeidae) of economic importance in turfgrass in North America. *Biological Control*, 38, 397-404.

Koppenhofer A. M. and Fuzy E. M. (2003) *Steinernema scarabaei* for the control of white grubs. *Biological Control*, 28, 47-59.

Koppenhofer A. M., Grewal P. S. and Kaya H. K. (2000) Synergism of imidacloprid and entomopathogenic nematodes against white grubs: The mechanism. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 94, 283-293.

Lacey L. A., Frutos R., Kaya H. K. and Vail P. (2001) Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biological Control*, 21, 230-248.

Lewis E. E. and Clarke D. J. (2012) Nematode parasites and entomopathogens. *Insect Pathology*, 2nd ed. (eds. F. E. Vega & H. K. Kaya), pp. 394-424. Amsterdam. The Netherlands.

Loera-Gallardo J., Pérez-Domínguez J. F. and Rodríguez del Bosque L. A. (2010) Control Químico. *Plagas del suelo* (eds. L. A. Rodríguez del Bosque & M. A. Morón), pp. 197-214. INIFAP, México.

Lugo-García G. A., Ortega-Arenas L. D., Aragón-García A., González-Hernández H., Romero-Nápoles J., Reyes-Olivas A. y Morón M. A. (2012) Especies de gallina ciega (Coleoptera: Scarabaeoidea) asociados al cultivo de maíz en Ahome, Sinaloa, México. *Agrociencia*, 46, 307-320.

Marín, J. A. (2001) Abundancia del complejo "Gallina Ciega" (Coleoptera: Melolonthidae) asociado al cultivo de maíz en el centro de México. *Agricultura Técnica en México*, 27, 119-131.

Marín J. A. y Bujanos M. R. (2008) Especies del complejo "gallina ciega" del género *Phyllophaga* en Guanajuato, México. *Agricultura Técnica en México*, 34(3), 349-355.

Martínez-Hernández A. 2012. Infectividad de seis nematodos del género *Steinernema* spp. Y *Heterorhabditis* spp. en *Galleria mellonella* y *Phyllophaga polyphylla*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo, México 52 p.

Morón, M. A., Ratcliffe B. C and Deloya C. (1997) *Atlas de los escarabajos de México. Coleoptera: Lamellicornia Vol. I Familia Melolonthidae*. Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad y sociedad mexicana de entomología. México, D. F. 280 p.

Morón M. A. 2003. Diversidad, distribución e importancia de las especies de *Phyllophaga* Harris en México (Coleoptera: Melolonthidae). *Estudios sobre coleópteros del suelo en América* (eds. A. A. García, M. A. Morón, and A. J. Marín), pp. 23–27. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.

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

Payne R.W., Murray D.A., Harding S.A., Baird D.B. and Soutar D.M. (2005) GenStat for Windows (8th Edition) Introduction. *VSN International*, Hemel Hempstead.

Pérez-Consuegra N. (2004) *Manejo ecológico de plagas*. CEDAR. San José, La Habana, Cuba. PP: 43-114

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

Shannon, P. J., Smith S. M. and Hidalgo E. (1993) Evaluación en el laboratorio de aislamientos costarricenses y exóticos de *Metarhizium* spp. y *Beauveria* spp. contra larvas de *Phyllophaga* spp. (Coleoptera:Scarabaeidae). *Diversidad y manejo de plagas subterráneas*. Publicación Especial Soc. Mex. Entomología e Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz, México, pp. 203-215.

Shapiro-Ilan D. I., Mizell R. F., Cottrell T. E. and Horton D. L. (2004) Measuring field efficacy of *Steinernema feltiae* and *Steinernema riobrave* for suppression of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar* larvae. *Biological Control*, 30, 496–503

Staves A. P. and Knell R. J. (2010) Virulence and competitiveness: testing the relationship during inter - and intraspecific mixed infections. *Evolution*, 64 (9), 2643-2652.

Theurkar S. V., Patil S.B., Ghadage M. K., Zaware Y. B. and Madan S. S. (2012) Distribution and Abundance of White grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) in Khed Taluka, part of Northern Western Ghats, MS, India. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1, 58-60

Wang Y, Campbell J.F. and Gaugler. R. (1995) Infection of entomopathogenic nematodes *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis bacteriophora* against *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 66, 178–184.

Wu, S., Youngman R. R., Kok L. T., Laub C. A. and Pfeiffer D. G. (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.