



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN ORIGINAL

**PATOGENICIDAD DE *Metarhizium anisopliae*
(Metschnikoff) Sorokin (HYPOCREALES:
CLAVICIPITACEAE) SOBRE *Triodonyx lalanza* Saylor
(COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE) EN NAYARIT, MÉXICO**

Kenedy Antonio Cortez-Isiordia¹
Jackeline Lizzeta Arvizu-Gómez²
Néstor Isiordia-Aquino³✉
Octavio Jhonathan Cambero-Campos³
Raúl Medina-Torres³
Gabriel Antonio Lugo-García⁴

¹Estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit (UAN)

²Secretaría de Investigación y Posgrado (UAN)
Ciudad de la Cultura, 63000, Tepic, Nayarit, México

³Unidad Académica de Agricultura (UAN)

⁴Colegio de Ciencias Agropecuarias, Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte, Universidad Autónoma de Sinaloa.

✉ nisiordia@uan.edu.mx

^{1,3} kilometro 9 carretera Tepic-Compostela, 63780, Xalisco, Nayarit, México.

²Ciudad de la Cultura, 63000, Tepic, Nayarit, México.

⁴Calle 16 y Av. Japaraqui, Juan José Ríos, 81110, Ahome, Sinaloa, México.

Folia Entomológica Mexicana (nueva serie), 2021, 7: e0081005.







Recibido: 22 de julio 2021

Aceptado: 19 de octubre 2021

Publicado en línea: 13 de diciembre 2021

PATOGENICIDAD DE *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin
(HYPOCREALES: CLAVICIPITACEAE) SOBRE *Triodonyx lalanza* Saylor
(COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE) EN NAYARIT, MÉXICO

Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin
(Hypocreales: Clavicipitaceae) on *Triodonyx lalanza* Saylor (Coleoptera:
Melolonthidae) in Nayarit, Mexico

Kenedy Antonio Cortez-Isiordia¹ , Jackeline Lizzeta Arvizu-Gómez² , Néstor Isiordia-Aquino^{2*} 
Octavio Jhonathan Cambero-Campos³ , Raúl Medina-Torres³  y Gabriel Antonio Lugo-
García⁴ .

¹Estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit (UAN), Km 9 carretera Tepic-Compostela, 63780, Xalisco, Nayarit, México. ²Secretaría de Investigación y Posgrado (UAN), Ciudad de la Cultura, 63000, Tepic, Nayarit, México. ³Unidad Académica de Agricultura (UAN), Km 9 carretera Tepic-Compostela, 63780, Xalisco, Nayarit, México. ⁴Colegio de Ciencias Agropecuarias, Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte, Universidad Autónoma de Sinaloa, calle 16 y Av. Japaraqui, Juan José Ríos, 81110, Ahome, Sinaloa, México.

*Autor de correspondencia: nisordia@uian.edu.mx

Recibido: 22/VII/2021

Aceptado: 19/X/2021

Publicado en línea: 13/XII/2021

Editor Asociado: Haidel Vargas Madriz

RESUMEN. La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es el cultivo agroalimentario de mayor importancia socioeconómica en Nayarit, México, con base en su superficie, volumen de producción y generación de empleos; sin embargo, su rendimiento y calidad se ven amenazados por la presencia de "gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae). El uso de insecticidas sintéticos como principal alternativa propician la contaminación ambiental y eliminación de la fauna benéfica del suelo, para cuyo caso, los insecticidas microbiales se ofrecen como una alternativa ecológicamente segura para su control. El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar a las cepas de hongos entomopatógenos presentes en suelos cultivados con caña de azúcar en el municipio de Tepic, Nayarit y conocer su potencial como agentes de control biológico contra *Triodonyx lalanza* Saylor, especie de plaga rizófaga principal sobre el cultivo en la entidad. Mediante la técnica de insecto trampa, con larvas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), se obtuvieron 14 aislamientos del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, de los cuales, mediante pruebas de concentración y viabilidad de conidios, se consideraron cinco para la prueba de patogenicidad. Todos los aislamientos mostraron mortalidad sobre larvas de tercer instar de *T. lalanza*; sin embargo, el mejor tratamiento fue MGmT12, con 33.7 % de mortalidad corregida, mostrando diferencias significativas contra el resto de los tratamientos. Las cepas de *M. anisopliae* obtenidas presentaron baja virulencia sobre el insecto plaga.

Palabras clave: Hongos entomopatógenos, gallina ciega, *Galleria mellonella*, caña de azúcar.

ABSTRACT. Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is the agri-food crop of greatest socioeconomic importance in Nayarit, Mexico, based on its surface area, production volume and job creation; however, its yield and quality are threatened by the presence of "white grub" (Coleoptera: Melolonthidae). The use synthetic insecticides as

the main alternative leads to environmental contamination and the elimination of beneficial fauna from the soil, for which case, microbial insecticides are offered as an ecologically safe alternative for their control. The objective of this work was to study the strains of entomopathogenic fungi present in sugarcane soils in the municipality of Tepic, Nayarit and to know their potential as biological control agents against *Triodonyx lalanza* Saylor, a species of rhizophagous pest on the crop. in the entity. By means of the insect trap technique, using larvae of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), 14 isolates of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin were obtained, of which, by concentration and viability tests of conidia, five were considered for the pathogenicity test. All isolates showed mortality on third instar larvae of *T. lalanza*; however, the best treatment was MGmT12, with 33.7% corrected mortality, showing significant differences against the rest of the treatments. The *M. anisopliae* strains obtained showed low virulence on the pest insect.

Keywords: Entomopathogenic fungi, white grub, *Galleria mellonella*, sugarcane.

INTRODUCCIÓN

En México el cultivo de caña de azúcar, *Saccharum officinarum* L., reviste gran importancia económica por la cantidad de empleos y divisas que genera (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2020). Sin embargo, la presencia de larvas del género *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae) ha afectado la calidad y rendimiento de este cultivo (Romero-López et al., 2010). El complejo “gallina ciega” está integrado por especies de los géneros *Phyllophaga*, *Cyclocephala* y *Paranomala*, cuyas larvas se alimentan de la raíz, ocasionando pérdidas económicas sobre diversos cultivos, entre los que sobresalen maíz (*Zea mays* L.) y caña de azúcar (Morón et al., 1997).

Este complejo se encuentra con frecuencia en terrenos cultivados, donde sus efectos nocivos se asocian a la expansión de monocultivos y a la quema de rastrojos, condiciones que limitan la disponibilidad de alimento (Castro-Ramírez et al., 2004). El único dato de evaluación de daño de gallina ciega (*Triodonyx lalanza* Saylor) en caña de azúcar en Nayarit, data de la zafra 1993 a 1995, donde para la zona cañera de Tepic se reportó una disminución de la producción del 20-70 % por la destrucción del 70-100 % del sistema radicular, lo que originó una pérdida aproximada de 14,900 t (Morón et al., 1996).

Actualmente, los hongos entomopatógenos (HE) son una alternativa de control biológico

para minimizar los daños causados por plagas. Las especies más importantes se agrupan en los géneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Isaria* (= *Paecilomyces*), *Hirsutella*, *Lecanicillium* y *Fusarium* (Vega et al., 2012). En lo que respecta a la evaluación de su capacidad como agentes de control biológico contra gallinas ciegas en México, las especies más estudiadas han sido *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin, sobre especies del género *Phyllophaga*, entre las que destacan, *Phyllophaga vetula* (Horn), *P. ravidata* (Blanchard), *P. obsoleta* (Blanchard) y *P. polyphylla* (Bates), en las cuales, han ocasionado porcentajes de mortalidad del 77 al 100 % (Sotelo-Galindo et al., 2008; Enríquez-Vara et al., 2014; Solís-Pérez et al., 2016).

Referente al estudio de hongos entomopatógenos en Nayarit, Morón et al. (1996) reportaron gallinas ciegas micosadas por hongos en suelos cultivados con caña de azúcar en los alrededores de Tepic, sin embargo, no determinaron el género o especie de hongo, mientras que Estrada-Virgen et al. (2014), documentaron a las especies *M. anisopliae*, *M. robertsii* (Bischoff, Rehner y Humber), *M. pinghaense* (Chen y Guo) y *B. bassiana* en suelos cultivados con maíz en las localidades de Chacalilla, Tepic y San Pedro Lagunillas.

Por lo anterior, y con la finalidad de incrementar el conocimiento acerca de las cepas de hongos entomopatógenos que se encuentran presentes en suelos cultivados con

caña de azúcar en la entidad y de conocer su patogenicidad sobre insectos plaga, el objetivo del presente estudio fue evaluar su potencial como agentes de control biológico contra la gallina ciega *T. lalanza*.

MATERIALES Y MÉTODO

El estudio se realizó en el municipio de Tepic, Nayarit, México, durante el periodo agosto a octubre de 2019, en las localidades Los Fresnos, El Aguacate, Francisco I. Madero y Santiago de Pochotitán. Para la obtención de HE se recolectaron muestras de suelo en parcelas cultivadas con caña de azúcar, de acuerdo a la metodología propuesta por Galán-Franco et al. (2011) donde se obtuvo aproximadamente un kilogramo de suelo por parcela. Las muestras se depositaron en bolsas de plástico debidamente etiquetadas, y se trasladaron al Laboratorio de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma de Nayarit (UAN) para su procesamiento.

Para la detección de hongos se utilizó la técnica del “insecto cebo” propuesta por Zimmermann (1986), con larvas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) obtenidas a partir de una cría en laboratorio. Para ello se confinaron cinco larvas de quinto instar por cada recipiente plástico de 1,000 ml de capacidad, con aproximadamente 500 g de suelo húmedo obtenido a partir de cada parcela muestreada. Los recipientes se taparon e invirtieron, y se colocaron en un cuarto de incubación a total oscuridad con una temperatura de 25 ± 2 °C por siete días, para favorecer la infección de las larvas por hongos.

Las larvas con signos de infección se extrajeron de los frascos y se sometieron a proceso de esterilización con hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.1 %, luego se colocaron en cámaras húmedas y se sometieron a incubación a 25 °C por siete días, para propiciar el desarrollo del patógeno. El descartar las larvas enfermas, además de reponer el alimento y mantener la humedad del

aislamiento de hongos se realizó por raspado directo sembrándose en medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) (Monzón, 2001), luego se mantuvieron en incubación a una temperatura de 25 ± 2 °C por dos días para favorecer la germinación de los conidios. Posteriormente se realizaron los cultivos monospóricos (Cañedo y Ames, 2004), los cuales se mantuvieron en incubación a una temperatura de 25 °C por 15 días para favorecer el desarrollo del hongo. La identificación morfológica se llevó a cabo con las claves dicotómicas propuestas por Humber (2012).

Las larvas de *T. lalanza* que se consideraron para la prueba de patogenicidad se obtuvieron a partir de muestreos de suelo en una parcela de caña de azúcar altamente infestada. Estas se depositaron individualmente en bolsas de plástico de 8 x 25 cm, con una pequeña porción de suelo del sitio de recolecta para su traslado al laboratorio. En su procesamiento, las larvas se pasaron a recipientes plásticos de 40 x 40 x 10 cm, con aproximadamente 4 kg de suelo previamente esterilizado en microondas (Aragón-García y Morón, 2004), con 10 días de anterioridad, procurando una capa de suelo de aproximadamente 6 cm de espesor por cada recipiente.

La determinación de la especie de gallina ciega se logró mediante la descripción de Morón et al. (1999). Para la alimentación de las larvas se adicionaron pequeñas rodajas de zanahoria de aproximadamente diez gramos, debidamente esterilizadas con NaClO al 0.1%. La humedad del suelo, se mantuvo con ayuda de un atomizador manual adicionándole al mismo aproximadamente 200 ml de agua destilada por cada recipiente, cada tercer día.

Posteriormente las gallinas ciegas se sometieron a un proceso de “cuarentena” en un cuarto con total oscuridad a una temperatura de 25 ± 2 °C, con observaciones cada 72 hora por un periodo de 30 días para suelo. Así mismo, las larvas que resultaron sanas se consideraron para el bioensayo.

Del total de aislamientos obtenidos, solamente cinco cepas de *M. anisopliae* (Cuadro 1), se consideraron para la prueba de patogenicidad. El criterio de selección se basó en los parámetros de calidad (concentración y viabilidad de conidios) establecidos por Castro-Ramírez y Ramírez-Salinas (2010) y Douglas-Ingliš et al. (2012); los cuales consisten en una concentración igual o mayor a 1×10^7 conidios/ml y un porcentaje de germinación igual o mayor al 95 %.

El bioensayo de patogenicidad se llevó a cabo conforme a la metodología propuesta por Sotelo-Galindo et al. (2008), para tal propósito, grupos de 10 larvas de tercer instar de *T. lalanza* previamente esterilizadas con NaClO al 0.1 % con 30 min de anterioridad, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se asperjaron con 10 ml de la suspensión del hongo a la concentración mencionada (Díaz-Mederos et al., 2014). La cuantificación de conidios y ajuste de las concentraciones se realizaron en la cámara de Neubauer, con base en la metodología propuesta por Douglas-Ingliš et al. (2012).

Las larvas inoculadas se colocaron individualmente en vasos plásticos de 200 ml de capacidad con aproximadamente 100 g de suelo migajón arenoso estéril y humedecido con 20 ml de agua destilada. A cada larva se le suministró una rodaja de zanahoria esterilizada de 10 g para su alimentación; los vasos se cubrieron con un trozo de papel aluminio con pequeños orificios para permitir el paso de oxígeno, luego se sometieron a incubación en total oscuridad a una temperatura de 25 ± 2 °C para propiciar la infección del hongo.

El registro del número de larvas muertas se realizó a partir de los dos días después de la inoculación, con observaciones cada 48 h, por 30 d. El criterio de mortalidad se determinó conforme a la aplicación del estímulo físico (Sotelo-Galindo et al., 2008) las larvas con

ausencia de movimiento se pasaron a cámaras húmedas para confirmar su mortalidad por el hongo. Se consideró un diseño experimental completamente al azar, con 10 larvas por unidad experimental con cinco repeticiones, para un total de 50 larvas por tratamiento.

El tratamiento testigo solo incluyó 50 larvas tratadas con 50 ml de agua destilada + Tween® 80 al 0.5 %. Se realizó una corrección de los porcentajes de mortalidad obtenidos con respecto al testigo con la fórmula de Schneider-Orelli (Püntener, 1981) para el cálculo del porcentaje de eficacia del hongo en el bioensayo, posteriormente, se realizó una prueba de normalidad de datos. El análisis estadístico de la variable porcentaje de larvas muertas por el hongo entomopatógeno, se llevó a cabo en el programa SAS (2002), donde se realizó una comparación de medias con la prueba de Tukey (HSD) con un (α 0.05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron un total de 14 aislamientos de hongos correspondientes a *M. anisopliae*, esto con base en el análisis de las características macroscópicas tales como colonias redondas con anillaciones verdes oliváceas amarillentas, blancas algodonosas, verdes oliváceas y polvorientas por la esporulación; y el análisis de las características microscópicas tales como conidios ramificados, filídes con ápices redondeados a cónicos en forma de botella, conidios cilíndricos a ovoides que forman cadenas en masas de color verde oliváceo y masas solidas de cadenas paralelas verde pálido a amarillo claro.

Lezama-Gutiérrez et al. (2004) reportaron la predominancia de *M. anisopliae* en suelos cultivados con caña de azúcar en Colima. La alta incidencia de este hongo en los suelos cañeros puede deberse a que sus conidios están adaptados a la perturbación por actividades agrícolas como la quema de caña

Cuadro 1. Aislamientos evaluados de *Metarhizium anisopliae* obtenidos a partir de larvas de *Galleria mellonella* en suelos cañeros de Tepic, Nayarit, México.

Aislamiento	Localidad	Fecha de recolecta	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)	Concentración (conidios/mL)	Viabilidad (% gc/48 h)
MGmT3	Santiago de Pochotitán	20-09-19	21°35'27"N	104°44'01"O	894	1.36 x 10 ⁷	96
MGmT7	El Aguacate	22-09-19	21°29'35"N	104°54'58"O	1065	1.66 x 10 ⁷	97
MGmT8	Santiago de Pochotitán	25-09-19	21°35'43"N	104°44'18"O	897	1.58 x 10 ⁷	100
MGmT11	Francisco I. Madero (Puga)	29-09-19	21°34'44"N	104°50'40"O	690	1.65 x 10 ⁷	100
MGmT12	Francisco I. Madero	29-09-19	21°35'24"N	104°50'42"O	681	1.10 x 10 ⁷	100

% gc = porcentaje de germinación de conidios.

y una mayor resistencia a la incidencia de rayos ultravioleta, lo que lo hace recomendable para el control de plagas rizófagas como la gallina ciega en comparación con el hongo *B. bassiana*, ya que éste se adapta de mejor manera a suelos naturales sombreados de clima templado con menor perturbación por actividades agrícolas y sus conidios son más susceptibles a las actividades de quema y la radiación de rayos UV (Lezama-Gutiérrez et al., 2004; Meyling y Eilenberg, 2007).

Otro factor que puede influir en la abundancia de *M. anisopliae* es su asociación con las raíces del cultivo de caña de azúcar, por tener la particularidad de desarrollar una actividad saprófita y endofítica en la rizosfera de poáceas como maíz y caña; la primera la desarrolla al alimentarse de los exudados y sustrato orgánico generado por la descomposición de sus raíces o bien, refugiarse hasta la espera de un insecto hospedero susceptible para infectarlo, desarrollarse y completar su ciclo de vida (Meyling y Eilenberg, 2007). Mientras que su actividad endofítica consiste en infectar las raíces de gramíneas (poáceas), posicionar sus endófitos fúngicos en los vasos vasculares y desarrollar una actividad simbiótica mutualista al obtener su fuente de alimento directamente de la planta, ejerciendo una defensa indirecta contra insectos que propicia el desarrollo de la caña (Bruck, 2010).

El análisis estadístico de datos obtenidos de mortalidad de larvas mostró una distribución normal ($P = 0.125 > 0.05$, Kolmogorov-Smirnov). En cuanto al porcentaje de mortalidad corregida, el análisis de comparación de las medias entre tratamientos mostró diferencias significativas ($P = 0.0009 < 0.05$, Tukey HSD), donde destaca el aislamiento MGmT12 con el mayor porcentaje de mortalidad (34.7) con respecto a los demás tratamientos y el testigo, a excepción del aislamiento MGmT11, siendo estadísticamente iguales (Cuadro 2).

El testigo registró una mortalidad de 4 % a los 12 días de iniciado el experimento y con una mortalidad máxima del 10 % a partir de los 24, para permanecer sin cambio hasta el término del experimento; cabe destacar que la mortalidad de larvas se debió a causas naturales y de manejo, totalmente ajeno a la infección por cualquier otro agente entomopatógeno.

Todos los tratamientos ocasionaron mortalidad de larvas en un rango de 6 a 44 % en cuanto a la mortalidad obtenida, con un 20 % de mortalidad acumulada, respecto al total de larvas evaluadas por todos los tratamientos a los 30 días después de la inoculación. Los primeros porcentajes de larvas muertas se obtuvieron a los seis días después de la inoculación, con un 3.2 % de mortalidad acumulada, incrementándose gradualmente al

Cuadro 2. Porcentaje de mortalidad de larvas de tercer instar de tercer instar de *Triodonyx lalanza* por tratamientos.

Tratamiento	% de larvas muertas/días después de la inoculación					
	6	12	18	24	30	Mc
MGmT12	8.0	20.0	26.0	38.0	44.0	34.7 a
MGmT11	2.0	12.0	18.0	24.0	28.0	18.3 ab
MGmT7	4.0	4.0	16.0	22.0	22.0	12.3 b
MGmT8	0.0	2.0	12.0	12.0	12.0	6.1 b
MGmT3	2.0	4.0	4.0	6.0	6.0	4.0 b
Testigo	0.0	4.0	4.0	10.0	10.0	10.0 b

Literales diferentes muestran diferencias significativas, de acuerdo con la prueba de Tukey HSD ($\alpha = 0.05$). Mc = mortalidad corregida.

transcurso de los días después de la inoculación. Los resultados de mortalidad de larvas por tratamientos obtenidos en nuestro estudio fueron similares a los reportados por Solis-Perez et al. (2016) donde al evaluar cepas de *M. anisopliae* aisladas a partir de *G. mellonella* a una concentración de 1×10^8 conidios/ml obtuvieron un rango de efectividad bajo, el cual osciló entre 0 al 20 % de mortalidad de larvas de tercer instar de *Phyllophaga vetula* (Horn).

La efectividad baja de los aislamientos obtenida en nuestro estudio puede deberse a dos factores, el primero al grado de virulencia de las cepas de hongos en función a su especificidad patógeno-hospedero, es decir, las cepas aisladas a partir de larvas de *G. mellonella* presentan una menor virulencia en comparación con las obtenidas a partir de gallinas ciegas infectadas desde campo, las cuales ocasionan altos índices de mortalidad que fluctúan entre 60 a 90 %, sobre algunas larvas de tercer instar del género *Phyllophaga* (Flores et al., 2002; Nájera-Rincón et al., 2005; Solis-Perez et al., 2016).

El segundo factor que pudo haber influido en la baja mortalidad obtenida es la capacidad inmune que presenta la gallina ciega *T. lalanza*, en relación a su tamaño y peso, es decir, las larvas de tercer instar de esta especie presentan un tamaño de 8 mm de anchura de cápsula cefálica, y un peso fresco que alcanza hasta los 3.5 g, valores que superan hasta cinco veces más el tamaño de las larvas del complejo *Phyllophaga*.

Este gran tamaño le confiere el desarrollo de una cutícula más gruesa y quitinizada que actúa como una barrera inmune, para minimizar su susceptibilidad por la infección de agentes entomopatógenos (Morón et al., 2010).

CONCLUSIÓN

Los hongos entomopatógenos que habitan de manera natural los suelos cañeros de la zona bajo estudio de Tepic, Nayarit, México, pertenecieron a la especie *M. anisopliae*, mientras que, en la prueba de patogenicidad, el tratamiento más efectivo contra larvas de tercer instar de *T. lalanza* fue MGmT12 con un 34.7 % de mortalidad corregida. Las cepas del hongo *M. anisopliae* obtenidas a partir de larvas de *G. mellonella* presentaron una baja virulencia contra la gallina ciega *T. lalanza*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al personal de la campaña fitosanitaria contra la gallina ciega en caña de azúcar del Ingenio El Molino, S.A de C.V. de Tepic, Nayarit, por el apoyo ofrecido para la ubicación de predios infestados y recolecta de larvas necesarias para el bioensayo, así como al CONACYT por la beca de posgrado otorgada para el desarrollo de este trabajo.

LITERATURA CITADA

- Aragón-García A. y Morón, M. A. (2004). Un método de cría para “gallinas ciegas” rizófagas del género *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae). En: Bautista-Martínez, N., Bravo-Mojica, H. y Chavarín-Palacio, C. (Eds.), Cría de insectos plaga y organismos benéficos (pp. 109–118). Colegio de Postgraduados.
- Bruck, D. J. (2010). Fungal entomopathogens in the rhizosphere. *Biocontrol*, 55, 103–112. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9236-7>
- Cañedo, V. y Ames, T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=QP2007000094>
- Castro-Ramírez, A. E., Ramírez-Salinas, C. y Pacheco-Flores, C. (2004). *Guía ilustrada sobre “gallina ciega” en la región Altos de Chiapas*. El Colegio de la Frontera Sur y Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Castro-Ramírez, A. E. y Ramírez-Salinas, C. (2010). Control biológico de tres especies de *Phyllophaga* mediante el uso de *Beauveria bassiana* bajo condiciones de invernadero. En: Rodríguez del Bosque, L. A. y Morón, M. A. (Eds.), *Ecología y control de plagas edafícolas* (pp. 283–291). Instituto de Ecología A.C.
- Díaz-Mederos, P., Nájera-Rincón, M. B., Lezama-Gutiérrez, R. y Rebolledo-Domínguez, O. (2014). Abundancia y distribución de gallina ciega, hongos y nematodos entomopatógenos en los Altos de Jalisco, México. En: Aragón-García, A. y Pérez-Domínguez, J. F. (Eds.), *Diversidad importancia agrícola de coleópteros edafícolas* (pp. 87–112). Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias.
- Douglas-Inglis, G., Enkerli, J. and Goettel, M. S. (2012). Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. En: Lacey, L. A. (Ed.), *Manual of techniques in invertebrate pathology* (pp. 189–253). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2-00007-5>
- Enríquez-Vara, J. N., Guzmán-Franco, A., Alatorre-Rosas, R., González-Hernández, H., Córdoba-Aguilar, A. and Contreras-Garduño, J. (2014). Immune response of *Phyllophaga polyphylla* larvae is not an effective barrier against *Metarhizium pinghaense*. *Invertebrate Survival Journal*, 11, 240–246. <https://www.isj.unimo.it/index.php/ISJ/article/view/325>
- Estrada-Virgen, O., Cambero-Campos, J., De Dios-Ávila, N., Ríos-Velasco, C., Carvajal-Cazola, C. R. y Robles-Bermúdez, A. (2014). Diversidad de hongos entomopatógenos aislados de suelo de agroecosistemas de maíz en el estado de Nayarit. *Entomología mexicana*, 1, 246–250.
- Flores, A. G., De la Rosa, W., Rojas, J. C. y Castro-Ramírez, C. A. (2002). Evaluation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Mitosporic) against species of the “white grub complex” in the Southwestern of México. *Southwestern Entomologist*, 27, 73–83.
- Galán-Franco, L. A., Morales-Loredo, A., Álvarez-Ojeda, G., López-Arroyo, J. I., Arévalo-Niño, K., Sandoval-Coronado, C. y Quintero-Zapata, I. (2011). Isolation and characterization of entomopathogenic fungi obtained from citrus-growing areas of Mexico. *Southwestern Entomologist*, 36(4), 443–449. <https://doi.org/10.3958/059.036.0406>
- Humber, R. A. (2012). Identification of entomopathogenic fungi. En: Lacey, L. A. (Ed.), *Manual of techniques in invertebrate pathology* (pp. 151–187). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2.00006-3>
- Lezama-Gutiérrez, R., Liñán-Valadez, W., Ángel-Sahagún, L. A., García-Zamora, R., Alcaraz-Tapia, P. A., Tirado-Plascencia, E., Molina-Ochoa, J., Galindo-Velasco, E. y López-Lavín, M. (2004). Presencia de hongos y nematodos entomopatógenos (Hyphomycetes) en suelos cultivados con caña de azúcar, del área de abasto del Ingenio Quesería [Resumen de presentación de la conferencia]. Memorias del XXVII Congreso Nacional de Control Biológico. 8-13 de noviembre de 2004. Los Mochis, Sinaloa, México.
- Meyling, N. V. y Eilenberg, J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43, 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.007>
- Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicara-

- gua. Avance en el fomento de productos fitosanitarios no sintéticos. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 63, 95–103.
- Morón, M. A., Hernández, R. S. y Ramírez, C. A. (1996). El complejo “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae) asociado con la caña de azúcar en Tepic, Nayarit, México. *Folia Entomológica Mexicana*, 98, 1–44.
- Morón, M. A., Ratcliffe, B. C. y Deloya, C. (1997). *Atlas de los Escarabajos de México (Coleoptera: Lamellicornia) volumen 1, familia Melolonthidae*. CONABIO-Sociedad Mexicana de Entomología, A. C.
- Morón, M. A., Hernández-Rodríguez, S. y Ramírez-Campos, A. (1999). Description of immature stages of *Phyllophaga (Triodonyx) lalanza* Saylor (Coleoptera: Melolonthidae, Melolonthinae). *The Pan-Pacific Entomologist*, 75(3), 153–158.
- Morón, M. A., Hernández-Rodríguez, S. y Ramírez-Campos, A. (2010). “Gallina ciega” en Nayarit. Estudios de caso. En: Rodríguez-del Bosque, L. A. y Morón, M. A. (Eds.), *Plagas del suelo*. (pp. 285–298). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma Chapingo, Mundi Prensa.
- 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(1), 33–36.
- Püntener, W. (1981). Manual for field trials in plant protection second edition. Agricultural Division, Ciba-Geigy Limited. Disponible en: <http://www.ehabsoft.com/ldpline/onlinecontrol.htm#SchneiderOrelli>, consultado el 22 de junio de 2020.
- Romero-López, A. A., Morón, M. Á., Aragón-García, A. y Villalobos, F. J. (2010). La “gallina ciega” vista como un “ingeniero del suelo”. *Southwestern Entomologist*, 35(3), 331–343. <https://doi.org/10.3958/059.035.0312>
- Statistical Analysis Systems (2002) SAS Version 9.1. SAS Institute Inc., Cary.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2020). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/#>, consultado el 14 de febrero de 2020.
- Solis-Perez, O., Castillo-Gutierrez, A., Peña-Chora, G., Alvear-García, A., Serrano-Morales, M. M., Suarez-Rodriguez, R. y Hernandez-Velazquez, V. M. (2016). Pathogenicity, virulence and the interaction of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Phyllophaga vetula* (Coleoptera: Melolonthidae). *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 10(4), 2607–2612. <http://doi.org/10.22207/JPAM.10.4.16>
- Sotelo-Galindo, F., Domínguez-Márquez, V. M., Martínez-Alonso, U. y Guerrero-Gómez, T. (2008). Evaluación de cepas nativas de hongos entomopatógenos en *Phyllophaga ravida* (Coleoptera: Melolonthidae) en Guerrero, México. *Entomología mexicana*, 1, 505–508.
- Vega, F. E., Meyling, N. V., Luangsa-Ard, J. J. y Blackwell, M. (2012). Fungal entomopathogens. En: Vega, E. F. y Kaya, H. K. (Eds.), *Insect Pathology* (pp. 172–206). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384984-7.0006-3>
- Zimmermann, G. (1986). The “Galleria bait method” for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology*, 2 (1–5), 213–215. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1986.tb00912>