

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO



FACULTAD DE BIOLOGIA

**MAESTRIA EN CONSERVACION Y MANEJO DE RECURSOS
NATURALES**

**Hongos entomopatógenos para el control de la gallina ciega
Phyllophaga spp. Coleoptera Melolonthidae en dos zonas del
Estado de Michoacán.**

Tesis que presenta

JUAN DANIEL LOPEZ MORA

Como requisito parcial para obtener el Grado de Maestro en Ciencias

Director de Tesis:

Dr. Edmundo Carlos López Barbosa

Laboratorio de Agroecología

Morelia Mich., Agosto de 2008

DEDICATORIA

Con cariño a mi padre que despertó en mi el amor a la naturaleza.

A mi madre por todo el amor, apoyo y paciencia que siempre demostró.

A mis hermanos Arturo, Pepe, Jorge y Toño.

Por todo lo que ha significado a lo largo de mi vida y por todo el cariño demostrado, **a ti Lilia.**

A **Daniela** que con su sonrisa llena de alegría mi vida.

A mi mejor amiga, excelente esposa y mejor madre **Mariana.**

A G R A D E C I M E N T O S.

Este trabajo se realizó gracias al apoyo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Agradezco de manera especial al Biólogo Miguel Bernardo Nájera Rincón por su amistad, tiempo, enseñanza, paciencia, concepción y corrección de este trabajo.

Al Dr. Edmundo López Barbosa por su esfuerzo de revisión, corrección y despertar en mí el interés por el control biológico.

Al grupo de agricultores que además de apoyarme con los trabajos de campo me brindaron su amistad, Don Froilán Rosales, Javier Rosales y Jorge.

Al personal del INIFAP por la ayuda brindada durante los muestreos para la realización del proyecto

A los integrantes de la comisión revisora: Dr. Edmundo C. López Barbosa, MC. Carlos A. Tena Morelos, Dr. Samuel Pineda Guillermo y MC. Gerardo Rodríguez Lozano por su ayuda, correcciones y sugerencias en el trabajo.

A los compañeros de la 11 generación de la Facultad de Biología, Irene, Iris, Paris, Lorena, Rita, Asdrubal, Crisanto.

A mis grandes amigos: Antonio, Elías, Raúl, Ángeles, Rita, todos ellos apoyan con su amistad mis actos.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMEN.....	11
SUMMARY.....	13
1 Introducción.....	15
2. Antecedentes.....	17
2.1. Generalidades de la familia Melolonthidae.....	17
2.1.1. El género <i>Phyllophaga</i> Harris, 1827.....	18
2.1.2. Posición taxonómica del género <i>Phyllophaga</i>	18
2.1.3. Distribución.....	19
2.1.4. Biología.....	20
2.1.5. Ciclo de vida.....	20
2.1.6. Importancia económica.....	21
2.2. Métodos de control.....	22
2.2.1. Control químico.....	22
2.2.2. Control cultural.....	25
2.2.3. Control con feromonas sexuales.....	26
2.2.4. Uso de extractos vegetales.....	27
2.2.5. Mejoramiento genético.....	28
2.2.6. Control biológico.....	29
2.2.6.1. Control de la “gallina ciega” por medio de depredadores y parasitoides.....	30
2.2.6.2. Control microbial de la “gallina ciega”.....	30
2.2.6.2.1. Control a base de bacterias.....	31
2.2.6.2.2. Control a base de hongos entomopatógenos.....	32
2.2.6.2.2.1. Ciclo de la enfermedad.....	33
2.2.6.2.2.2. Condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad.....	35
2.2.6.2.2.2.1. Humedad relativa.....	35
2.2.6.2.2.2.2. Temperatura.....	35
2.2.6.2.2.2.3. Luz.....	36

2.2.6.2.3. Clasificación de los hongos entomopatógenos.....	36
2.2.6.2.4. Especies de hongos más comunes que atacan a la “gallina ciega”.....	37
2.2.6.2.4.1. <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> (Bain, 1907).....	37
2.2.6.2.4.2. <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschn.) Sorok. 1883.....	37
2.2.6.2.4.3. <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill.....	38
3. Descripción del área de estudio.....	39
3.1. Cuenca del Lago de Pátzcuaro.....	39
3.1.1. Localización.....	39
3.1.2. Suelos.....	40
3.1.3. Hidrología.....	41
3.1.4. Clima.....	41
3.1.5. Vegetación.....	42
3.2. Ciénega de Zacapu.....	43
3.2.1. Localización.....	43
3.2.2. Suelos.....	44
3.2.3. Hidrología.....	44
3.2.4. Clima.....	44
3.2.5. Vegetación.....	44
4. Objetivos.....	45
5. Materiales y Métodos.....	46
5.1. Identificación de especies.....	46
5.2. Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos nativos.....	47
5.3. Sobrevivencia de hongos en el suelo.....	47
5.4. Selección de aislamientos.....	48
5.5. Parcelas experimentales.....	49
5.5.1. Producción masiva de hongos entomopatógenos.....	50
5.6. Determinación de abundancia y mortalidad.....	52
5.7. Bioensayos para determinar concentración letal (CL ₅₀).....	52
6. Resultados y Discusión.....	54
6.1. Especies presentes en las zonas de estudio.....	54
6.2. Estimación estacional de hongos entomopatógenos nativos.....	56

6.3. Supervivencia de hongos entomopatógenos aplicados en el campo.....	59
6.4. Selección de aislamientos.....	60
6.5. Muestreo de larvas en las parcelas experimentales.....	63
6.5.1. Producción masiva de hongos entomopatógenos.....	75
6.5.1.1. Concentración de esporas.....	75
6.5.1.2. Germinación.....	76
6.6. Bioensayos con concentraciones determinadas.....	76
7. Conclusiones.....	80
8. Literatura citada.....	82
Anexo I Descripción de especies presentes en las dos zonas de estudio.....	89

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. Insecticidas más comúnmente utilizados en el combate químico de la “gallina ciega”	24
CUADRO 2. Especies de hongos reportados como patógenos de escarabeidos (Jackson 1992).....	33
CUADRO 3 Especies presentes en Cantabria, municipio de Zacapu.....	54
CUADRO 4. Presencia de hongos entomopatógenos nativos en San Francisco Uricho, Pátzcuaro y Cantabria, Zacapu, datos expresados en unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco.....	57
CUADRO 5.- Sobrevivencia de hongos entomopatógenos en un suelo “gris” bajo condiciones de laboratorio. Las concentraciones se presentan en UFC/gr de suelo seco.....	60
CUADRO 6.- Parámetros de regresión lineal de aislamientos de <i>B. bassiana</i> probados contra larvas de tercer estadio avanzado de <i>P. vetula</i>	63
CUADRO 7. Promedio de larvas y colonización del suelo en las parcelas experimentales durante el primer muestreo realizado en San Francisco Uricho, Pátzcuaro.....	64
CUADRO 8. Promedio de larvas y colonización del suelo en las parcelas experimentales durante el primer muestreo realizado en Cantabria, Zacapu.....	65
CUADRO 9. Seguimiento de 30 larvas de <i>Phyllophaga</i> colectadas en San Fco. Uricho, en condiciones de laboratorio.....	66
CUADRO 10. Seguimiento de 30 larvas de <i>Phyllophaga</i> colectadas en Cantabria municipio de Zacapu, en condiciones de laboratorio.....	67
CUADRO 11. Segundo muestreo de larvas en San Francisco Uricho, Pátzcuaro.	69

CUADRO12 Segundo muestreo de larvas en Cantabria, municipio de Zacapu.....	71
CUADRO 13. Seguimiento de 25 larvas de <i>Phyllophaga</i> colectadas en San Francisco Uricho, en condiciones de laboratorio.....	73
CUADRO 14. Seguimiento de 25 larvas de <i>Phyllophaga</i> colectadas en Cantabria municipio de Zacapu, en condiciones de laboratorio.....	74
CUADRO 15. Parámetros de control de calidad obtenidos en la producción de hongos entomopatógenos con base en cepas de <i>B. bassiana</i> para su aplicación en campo contra “gallina ciega”.....	76
CUADRO 16.- Aislamientos, dosis y parámetros de regresión lineal de <i>B. bassiana</i> probados contra larvas de tercer estadio avanzado de <i>P. vetula</i>	78
CUADRO 17. Comparación entre tratamientos seleccionados para la determinación de concentración letal (CL ₅₀) en larvas del tercer estadio de <i>Phyllophaga</i>	79

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Localización geográfica del Lago de Pátzcuaro.....	39
FIGURA 2 Localización geográfica de la Ciénega de Zacapu.....	43
FIGURA 3. Diseño experimental para la aplicación de hongos entomopatógenos en las parcelas experimentales con tres tratamientos y un testigo.	50
FIGURA 4.- Abundancia relativa de adultos de <i>Phyllophaga</i> en la Cantabria, municipio de Ciénega de Zacapu, Michoacán (junio 1999 –febrero 2003).....	55
FIGURA 5.- Abundancia relativa de adultos de <i>Phyllophaga</i> en la parcela experimental de San Francisco Uricho, Pátzcuaro Michoacán.....	56
FIGURA 6. Fluctuación estacional de hongos entomopatógenos nativos en San Francisco Uricho, Pátzcuaro.....	57
FIGURA 7. Fluctuación estacional de hongos entomopatógenos nativos en Cantabria, municipio de Zacapu.....	58
FIGURA 8. Sobrevivencia de hongos entomopatógenos aplicados en campo en la parcela escolar de Cantabria, municipio de Zacapu en condiciones de laboratorio.....	60
FIGURA 9.- Mortalidad acumulada de larvas de tercer estadio avanzado de <i>P. vetula</i> por aislamientos de <i>B. bassiana</i> en ensayo de “prueba máxima”.....	61
FIGURA 10.- Mortalidad acumulada de larvas de tercer estadio avanzado de <i>P. vetula</i> por aislamientos de <i>B. bassiana</i> en ensayo de “prueba máxima” a los 7 días.....	62

FIGURA 11. Colonización del suelo por aislamientos de <i>Beauveria bassiana</i> aplicados en campo en la localidad de San Francisco Uricho, Mich.....	64
FIGURA 12 Colonización del suelo por aislamientos de <i>Beauveria bassiana</i> aplicados en campo en la localidad de Cantabria, Zacapu, Mich.....	65
FIGURA 13. Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Phyllophaga</i> en laboratorio durante el seguimiento de 30 larvas colectadas en las parcelas donde se aplicaron los tratamientos de control biológico en la localidad de San Francisco Uricho, Pátzcuaro.....	67
FIGURA 14. Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Phyllophaga</i> en laboratorio durante el seguimiento de 30 larvas colectadas en las parcelas donde se aplicaron los tratamientos de control biológico en la localidad de Cantabria, municipio de Zacapu.....	68
FIGURA 15. Colonización de <i>B. bassiana</i> en San Francisco Uricho, Pátzcuaro.....	70
FIGURA 16 Porcentaje de mortalidad de <i>B. bassiana</i> en San Francisco Uricho, Pátzcuaro	70
FIGURA 17. Colonización de <i>B. bassiana</i> en Cantabria, municipio de Zacapu.....	72
FIGURA18. Porcentaje de mortalidad <i>B. bassiana</i> en Cantabria, municipio de Zacapu.....	72
FIGURA 19. Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Phyllophaga</i> en laboratorio durante el seguimiento de 25 larvas colectadas en la localidad de San Francisco Uricho, Pátzcuaro.....	74
FIGURA 20. Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Phyllophaga</i> en laboratorio durante el seguimiento de 25 larvas colectadas en la localidad de Cantabria, municipio de Zacapu.....	75
FIGURA 21.-Mortalidad acumulada de larvas de tercer estadio avanzado de <i>P. vetula</i> por aislamientos de <i>B. bassiana</i> en ensayo de concentraciones determinadas.....	77

RESUMEN

La “gallina ciega” (*Phyllophaga* spp.), es una de las principales plagas rizófagas en México, ya que atacan cultivos como caña de azúcar, maíz, sorgo, frijol, hortalizas, frutales, plantas forestales y silvestres. Entre los métodos para el manejo de *Phyllophaga* spp. se encuentra la aplicación de hongos entomopatógenos destacando *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. 1883 y *Paecilomyces fumosoroseus* (Bain, 1907), los cuales pueden ser aplicados con otras tácticas de manejo integrado que sean compatibles.

En este trabajo se llevaron a cabo pruebas de laboratorio y campo con la finalidad de seleccionar el aislamiento más agresivo contra *Phyllophaga* spp. de un total de 12 aislamientos provenientes de las dos zonas de estudio (Cantabria, Zacapu, Michoacán y San Francisco Uricho, Pátzcuaro) se eligieron tres para aplicarlos en parcelas demostrativas, esto en base a características como: patogenicidad, respuesta a la producción en medio sólido y sobrevivencia en suelo. Los tres aislamientos fueron etiquetados como: 12BbGC, 26BbGC y 33BbGC obtenidos de la Ciénega de Zacapu, Michoacán.

El estudio se llevo a cabo en dos zonas agroclimáticas distintas que fueron: Cantabria municipio de Zacapu y San Francisco Uricho municipio de Pátzcuaro. Las especies de “gallina ciega” encontradas en Uricho fueron únicamente: *Phyllophaga ravida* y *P. vetula* en proporción de 2 a 1, mientras que en Cantabria se encontraron un total de 2,568 individuos divididos en tres subfamilias, seis tribus y 17 especies, donde predomino con un 89% el genero *Phyllophaga*.

De la estimación estacional de hongos entomopatógenos nativos se encontró que en la localidad de Uricho el 99.19% de los hongos patógenos presentes pertenecieron al género *Beauveria* y el 0.80% restante a *Metarhizium* presentándose ambos en mayor abundancia durante el verano. En la localidad de Cantabria el hongo con mayor presencia de manera natural en el suelo fue *Metarhizium* con un 60.5%, seguido de hongos del género *Beauveria* con un 39.5%, ambos presentes en mayor abundancia durante el verano.

De los aislamientos aplicados en campo, el que obtuvo mayor sobrevivencia fue el aislamiento marcado como 33BbGC, disminuyendo su concentración de esporas de $3.5E+07$ a $7.21E+04$ en 60 días, seguido del 26BbGC que disminuyó durante este mismo periodo de $2.6E+04$ a $1.5E+04$.

Durante el primer muestreo de larvas en campo (septiembre), no se observó mortalidad a causa de los hongos entomopatógenos aplicados. Esta mortalidad se manifestó hasta el segundo muestreo (diciembre). La localidad de Uricho presentó mortalidad en larvas de 23.8 y 8.3% en los tratamientos donde se aplicaron los aislamientos 33BbGC y 12BbGC respectivamente, en donde se aplicó el tratamiento 26BbGC y la parcela testigo no existió mortalidad a causa de los hongos aplicados. En la parcela de Cantabria la mortalidad a causa de los hongos se hizo más evidente ya que los tratamientos 12BbGC, 33BbGC y 26BbGC mostraron mortalidades del 38.5, 23.1 y 20% existiendo diferencia significativa con respecto al testigo.

La evaluación de la concentración letal (CL_{50}) mostró que el aislamiento 33BbGC fue el que necesito una menor concentración de esporas para matar al 50% de las larvas, con un $1.4E+08$ esporas por ml, seguido del 12BbGC con un $3.2E+08$ y por último el 26BbGC que necesitó la mayor concentración de esporas con un $4.3E+08$ esporas por ml.

SUMMARY

The White grubs (*Phyllophaga* spp.), is one of principal plagues in México because attack cultivations like sugar cane, corn, beans, vegetables, fruit, forestal and wild plants. Among the methods for the managment of the *Phyllophaga* spp. Is founded the application of entomopathogenic fungus, Standing out *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill, *Metarhizium anisopliae* (Metschn) Sorok. 1883 y *Paecilomyces fumosoroseus* (Bain, 1907), Which can be applicated with other management integrated techniques compatibles.

In this work we take laboratory and field proofs with the finality the select the isolation more aggressive against *Phyllophaga* spp. giving a total of 12 isolations coming from two studio zones (Cantabria, Zacapu, Michoacán y San Francisco Uricho, Pátzcuaro three were chosen for the application in demonstrative parcel of land, this based on zone characteristics like: pathogenic answer to the production in solid medium and the surviving in the soil. The three isolations were etiquette like:12BbGC, 26BbGC and 33BbGC obtained from la Ciénega Zacapu, Michoacán.

The studio was taken in two different agroclimatic zones: Cantabria of Zacapu and san Francisco Uricho municipality of Pátzcuaro. The species of White grubs founded in Uricho was only *Phyllophaga ravidia* and *P. vetula* in proportion from 2 to 1, while in Cantabria were founded a total of 2,568 members divided in three subfamilies, six tribes and 17 species, where predominate with 89% the *Phyllophaga*.

Of the esteem of entomopathogenic, native fungus were founded that in the locality of Uricho the 99.19% of the pathogenic fungus be longed to the kind of *Beauveria* and the 0.80% remaining to *Metarhizium* both presenting in abundance greater during the summer. In the locality of Cantabria the fungus with greater presence of the natural manner in the soil was *Metarhizium* with a 60.5% following of fungus of the kind of *Beauveria* with a 39.5% both presents in greater abundance during the summer.

Of the isolations applied in the field, which obtained greater surviving was the isolation marked like 33BbGC, decreasing its concentration of spores of 3.5×10^7 TO 7.21×10^4 in 60 days, following of 26BbGC, which decreased during this same period of 2.6×10^4 to 1.5×10^4 .

During the first sample of larva in field (September), do not observe mortality on account of the entomopathogenic fungus applied. This mortality manifested until the second sample (December). The locality of Uricho presented mortality in larvae of 23.8 % and 8.3% in the treatments where the isolations 33BbGC and 12BbGC respectively were applied, in which the treatment 26BbGC was applied and the parcel of land did not exist mortality on account the fungus applied. In the parcel of land of Cantabria the mortality on account of the fungus was more evident because the treatments 12BbGC, 33BbGC and 26BbGC show mortalities of 38.5, 23.1 and 20%, existing a significant difference with respect to the treatment control.

The evaluation to the lethal concentration (CL₅₀) showed that the isolation 33BbGC was the only which needed a less concentration of spores to kill to 50% of the larvae, with a 1.4×10^8 spores by ml, followed of 12BbGC with a 3.2×10^8 and finally the 26BbGC needed the greater concentration of spores with a 4.3×10^8 spores by ml.

1. INTRODUCCION

Entre las muchas riquezas que Latinoamérica ha dado al mundo se encuentra el maíz, planta originaria de Mesoamérica que sirvió de base alimenticia a las principales culturas prehispánicas de América y cuya importancia económica y cultural perdura hasta nuestros días, sobre todo para el pueblo de México.

Sin duda el maíz es el cultivo de mayor importancia en cuanto a superficie cultivada para el Estado de Michoacán. En 2003 se sembraron 815,799.34 hectáreas de diversos cultivos de las cuales 498, 437 hectárea, (61 %) fueron de maíz, con una producción total de 1, 442,714.9 toneladas de dicho grano, y un rendimiento promedio por hectárea de 3.009 tonelada, (SAGARPA 2005). Con estos datos Michoacán se ubica en el 5° lugar de importancia a nivel nacional, tanto en producción como en superficie sembrada después de Chiapas, Jalisco. México y Puebla.

Dentro de los factores que limitan la producción de maíz están los insectos plaga, los cuales pueden atacar a la planta en todos sus estados de desarrollo incluso después de la cosecha. En Michoacán no se tienen registros precisos de perdidas ocasionadas por plagas, aunque en algunos casos se tiene conocimiento que en algunas regiones pueden observarse pérdidas que van desde el 80% hasta el 100% de la producción total. Las plagas rizófagas son uno de los principales problemas a los que enfrentan los productores de maíz en el estado, sobre todo en zonas templadas, destacando entre ellas varias especies de “gallina ciega” o “yupo”.

Actualmente el control de la “gallina ciega” se realiza en mayor medida con métodos químicos utilizando productos que causan graves daños a los ecosistemas. Es de admitir que cualquier insecticida, no importa su nivel de toxicidad, o si es poco persistente o selectivo, tiene la cualidad de generar rebrotes de la plaga o trastornos en cualquier ecosistema o hábitat dado (De Bach 1979).

Es importante mencionar que el uso de insecticidas ocasiona daños a los insectos benéficos causando así un desequilibrio entre las plagas y sus enemigos naturales en muchos cultivos, lo que ha propiciado que las plagas ataquen con mayor intensidad. Como resultado de estos disturbios, muchos sistemas agrícolas de todo el mundo son reconocidos como no aptos para el desarrollo de enemigos naturales, debido a que se ha afectado la relación enemigo natural-

plaga. Con base en lo anterior es imperante su conservación mediante prácticas que favorezcan su multiplicación, proporcionando un mejor ambiente (Landis *et al.* 2000).

Los métodos disponibles para el control de “gallina ciega” incluyen prácticas de cultivo como labranza y modificaciones de la cobertura del suelo, así como tratamientos preventivos con insecticidas antes o en el momento de la siembra, los cuales son costosos además de provocar una serie de problemas de contaminación.

Una alternativa a los tratamientos con insecticidas químicos es el uso de organismos entomopatógenos que atacan a los diferentes estadios de la “gallina ciega”, reduciendo su población a niveles por debajo de su umbral económico.

Se han utilizado varios entomopatógenos para el control de esta plaga, tales como: los nematodos (Sosa y Hall 1989), bacterias (Klein y Jackson 1992) y hongos (Zhang 1990); sin embargo los resultados indican que es necesario intensificar estudios para conocer más sobre los organismos benéficos y su relación con el medio ambiente.

Una opción viable para el control de esta plaga es la utilización de hongos entomopatógenos los cuales han demostrado un gran potencial de control; sin embargo, se requieren más estudios para determinar los factores que expliquen las bajas infecciones observadas en campo (Poprawski y Yule 1991).

En el ámbito mundial, Glare (1992) cita un total de 23 especies de hongos patógenos de “gallinas ciegas”, entre los que destacan representantes de los géneros *Cordyceps*, *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces*.

Es fundamental continuar con la búsqueda, identificación, evaluación y conservación en las diversas regiones de Michoacán y en general en México, ya que los entomopatógenos representan una de las mejores alternativas de manejo en el ámbito local, regional o nacional, para lo cual, es necesario hacer estimaciones confiables sobre el efecto que tienen las larvas de “gallina ciega” en su entorno, en principio es necesario conocer con la mayor precisión posible la densidad de sus poblaciones, disposición espacial y variación temporal, así como la cantidad de larvas infectadas en campo durante sus diferentes estadios.

Otro aspecto importante es el de conocer cuánto tiempo permanecerá el hongo entomopatógeno aplicado en el suelo de la localidad ya que no se debe olvidar que se aplican organismos y que éstos responden de manera diferente a las condiciones ambientales como la luz, humedad pH, etc. además de presentar competencia, antagonismos, etc. entre ellas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de la Familia Melolonthidae

Los melolóntidos son Coleópteros Lamelicornios que en su forma adulta tienen el escapo antenal mucho más corto que el flagelo, y la maza antenal constituida por tres a siete artejos alargados y aplanados (lamelas). La cabeza es proporcionalmente pequeña, el cuerpo tiene forma ovalada y robusta, rara vez aplanada o esbelta. Los estigmas respiratorios de los últimos tres segmentos abdominales están colocados sobre la porción lateral de los esternitos; los tres pares de patas tienen cinco artejos tarsales. Las larvas son del tipo escarabaeiforme, se distinguen por presentar la galea y la lacinia maxilares completamente fusionada entre sí; palpos maxilares con cuatro artejos; antenas formadas por cuatro artejos, el último de ellos conspicuo y provisto con áreas sensoriales amplias (Morón *et al.* 1997).

Los adultos y las larvas de estos escarabajos son consumidores primarios o degradadores, y en algunos casos son depredadores. Los adultos se alimentan de las hojas, tallos, raíces, exudados, flores, frutos y tubérculos de angiospermas, así como del follaje y las raíces de gimnospermas, y en algunos casos depredan a otros insectos. Las larvas se desarrollan en el suelo, consumiendo raíces, estiércol seco o humus, así como dentro o debajo de troncos podridos, ingiriendo la madera descompuesta para procesarla en su cámara de fermentación. Se conocen especies adaptadas a los suelos inundados, cuyos adultos pueden bucear y se alimentan sólo de las flores de plantas flotantes (Morón y Terrón 1988).

En cuanto a su distribución ecológica, los coleópteros Melolonthidae muestran todo un gradiente, desde especies completamente eurioicas hasta especies muy estenoicas. Al parecer, más que el sustrato de alimentación, la correlación entre temperatura y humedad es el factor que con mayor frecuencia determina la presencia de una u otra especie, aunque es posible que el pH y la textura del suelo tengan gran importancia para el establecimiento y desarrollo de las larvas. Los miembros de esta familia se han encontrado en casi todos los ambientes

continentales e insulares del país, desde el nivel del mar hasta los 3,800 m de altitud (Morón 2001).

La familia Melolonthidae está representada en México por seis subfamilias, 23 tribus, 19 subtribus, 119 géneros y 1,017 especies (Blackwelder 1944, Blackwelder & Arnett 1974, Endrödi 1985, Morón 1984, 1991, 1994, 1996). Con los datos disponibles hasta el momento se puede señalar que los estados con mayor diversidad de Melolonthidae son Oaxaca, Chiapas y Veracruz, en donde se han registrado 223, 222 y 220 especies respectivamente (Morón *et al.* 1997).

2.1.1. El género *Phyllophaga* Harris, 1827

Pertenecen a la subtribu Rhizotrogina de talla pequeña o mediana (8-28 mm), cuerpo alargado u ovalado, esbelto o robusto, glabro o en ocasiones cubierto con sedas o microestructuras cuticulares de diversos tipos; el labro está profundamente marginado; antenas formadas por 8 a 10 artejos; la maza antenal consta de tres a seis lamelas de longitud y grosor variable; meso y metatibias con carinas o proyecciones dentiformes en la parte media externa; cápsula genital masculina compleja, con el edeago frecuentemente provisto de estructuras esclerosadas muy diversas; el dimorfismo sexual se acentúa en las antenas, la vestidura, el abdomen y las uñas tarsales. Se conocen más de 500 especies en todo el Continente Americano (Morón *et al.* 1997), de las cuales 369 especies de *Phyllophaga* han sido registradas en las 32 entidades federativas de la República Mexicana (Morón 2003).

1.1.2. Posición taxonómica del género *Phyllophaga* (de acuerdo con Morón 1984)

REINO: Animalia

SUBREINO: Metazoa

FILO: Arthropoda

SUBFILO: Euarthropoda

SUPERCLASE: Mandibulata

CLASE: Insecta

SUBCLASE: Pterigota

DIVISIÓN: Neoptera

SUBDIVISIÓN: Holometabola

ORDEN: Coleoptera

SUBORDEN: Polyphaga

SUPERFAMILIA: Scarabaeoidea

FAMILIA: Melolonthidae

SUBFAMILIA: Melolonthinae

TRIBU: Melolonthini

SUBTRIBU: Rhizotrogina

GÉNERO: *Phyllophaga* Harris, 1827

2.1.3. Distribución

Las subfamilias de Melolonthidae tienen una amplia distribución mundial, aunque se aprecian ciertas tendencias a restricciones en su representación o diversidad en cada una de las grandes regiones zoogeográficas, por ejemplo los Melolonthinae-Macrodactylini y los Dynastinae-Cyclocephalini son casi exclusivamente neotropicales (Morón 2001).

Las especies de *Phyllophaga* presentes en el territorio mexicano demuestran una gran capacidad de adaptación que les ha permitido colonizar casi todos los biomas ubicados entre el nivel del mar y los 3,500 m de altitud (Morón 1986).

2.1.4. Biología

Las especies de *Phyllophaga* presentes en el territorio mexicano demuestran una gran capacidad de adaptación que les ha permitido colonizar casi todos los biomas ubicados entre el nivel del mar y los 3,500 m de altitud. De acuerdo con cada especie, el comportamiento que exhiben los imagos después de emerger de la cámara pupal es variable; en la mayoría de los casos aparecen primero los machos, los cuales inician sus actividades de vuelo al crepúsculo o las primeras horas nocturnas, dirigiéndose en busca de las plantas con que se alimentan, y una vez localizadas se posan para consumir su follaje, posteriormente retornan al área de partida para refugiarse en el suelo durante todo el día. En la época que las hembras empiezan a emerger, los machos vuelan buscando un punto elevado, como una rama o una simple hierba que sobresalga en la pradera, en donde posarse para percibir las feromonas femeninas y rastrear a su compañera potencial. En las especies con hábitos crepusculares o nocturnos esta búsqueda y el acoplamiento se lleva a cabo en el suelo o en el follaje de las plantas de alimentación; mientras que en las especies prátícolas diurnas o vespertinas los machos sobrevuelan a baja altura (40-90 cm) del terreno, con las lamelas antenales totalmente extendidas para localizar a las hembras incluso antes de que emerjan del suelo (Morón 1986).

2.1.5. Ciclo de vida

La gran mayoría de especies edafícolas de Melolonthidae tienen ciclo de vida anual; bajo ciertas condiciones pueden existir especies bivoltinas del género *Anomala*, y es frecuente la presencia de especies de *Phyllophaga* con ciclos bianuales (Rodríguez del Bosque 1996).

Los huevos son depositados en el suelo húmedo, normalmente durante el final de la primavera o principio del verano, a la sombra de las plantas huésped, o en zonas con alta concentración de materia orgánica. El número promedio de estos huevos varía en razón de la especie, pero para algunas especies de *Phyllophaga* es de siete como en *P. rubella* (Bates) (Islas 1964), 14 en *P. sturmi*, 23 para *P. obsoleta* y 28 para *P. blanchardi*. La eclosión ocurre de dos a seis semanas después, dando lugar a las pequeñas larvas de primer estadio, las cuales se alimentan activamente de raíces finas, tallos subterráneos blandos, bulbos o materia orgánica durante este periodo que varía entre 20 y 60 días, hasta aumentar de 10 a 15 veces su peso inicial antes de la ecdisis para el segundo estadio, durante el cual incrementan de cinco a siete veces su biomasa en el transcurso de 30 a 60 días. De esta manera la ecdisis para el tercer estadio larval

ocurre entre agosto y octubre, originando a la fase más longeva y voraz de estas especies; a finales del otoño o durante la primavera la larva de tercer estadio delimita una celda o cámara ovoide, compactando con sus excrementos las partículas de suelo que le rodean, dentro de la cual se forma la prepupa, y en una o dos semanas da origen a la pupa exarata. La etapa de pupa transcurre durante 30 a 45 días en el otoño o en la primavera, para dar lugar al imago (Morón 1986).

2.1.6. Importancia económica

En la mayoría de los casos las larvas de *Phyllophaga* han sido consideradas como las principales causantes del daño al vegetal, en gran variedad de plantas de interés agrícola y forestal, el cual puede ser leve, moderado o severo dependiendo del cultivo, de las condiciones ambientales y del estado de desarrollo en que se encuentre el insecto. El tercer estadio larval es el que causa el mayor daño pues es más voraz, grande y longevo (Morón 1984).

El mismo autor cita que la “gallina ciega” (*Phyllophaga-Anomala-Cyclocephala*) es la plaga de suelo de mayor impacto económico en Latinoamérica y ha sido mencionada como plaga en más de 40 cultivos alimenticios, en los que puede causar desde un amarillamiento de las plantas, hasta la pérdida total de la cosecha.

Sobre el daño ocasionado por la “gallina ciega” Villalobos (1999), comenta que éste se puede clasificar en tres tipos de acuerdo con la siguiente escala: cuando la larva consume del 1 al 15% de la raíz el daño es leve, si consume del 16 – 40 % se considera moderado, y si el consumo es mayor del 40 % el daño es severo.

Uno de los principales riesgos que se tienen cada año para producir maíz en la Ciénega de Zacapu, Michoacán, lo constituyen las plagas rizófagas, en particular, los estados inmaduros del género *Phyllophaga*, cuyos daños pueden representar entre el 30 y 40 % de la producción e inclusive la pérdida total, ya sea en forma directa, por el consumo total de las raíces del maíz o en forma indirecta por el “acame” que ocasionan a la planta (Nájera *et al.* 2003).

2.2. Métodos de control

2.2.1. Control químico

El control de la “gallina ciega” en la mayoría de los casos se ha llevado a cabo con la utilización de productos químicos que debido a su disponibilidad en el mercado y su relativa “eficacia” proporciona a los campesinos una opción en el control de la plaga sin conocer la desventaja que proporcionan tales productos.

En la actualidad los residuos de los plaguicidas se encuentran dispersos en todo el planeta; así, se han identificado en todos los compartimentos ambientales aire, agua, lluvia, nieve, sedimentos, suelos, en todas las regiones geográficas, incluyendo aquellas muy remotas al sitio original de su liberación ambiental, como en océanos, desiertos y zonas polares, igualmente se ha demostrado su presencia en organismos de todos los niveles tróficos desde plancton hasta las ballenas y los animales del Ártico. Estos compuestos se acumulan en los tejidos de numerosas especies y se han extendido a todas las redes tróficas del mundo (Albert 1996).

Los seres humanos no están exentos de esta contaminación y los plaguicidas persistentes se han podido ubicar en diversos tejidos y secreciones humanas, inclusive en los habitantes de regiones muy distantes a los lugares en que estas sustancias han entrado al ambiente (Albert 1996).

No existen datos precisos en cuanto a daños ocasionados por “gallina ciega” en el estado de Michoacán los datos son muy puntuales refiriéndose a localidades y cultivos diversos, pero todos los reportes coinciden en señalar a esta plaga rizófaga como una de las plagas más importantes, esto ha traído como consecuencia que los productores tengan que recurrir a los insecticidas sintéticos como uno de los medios comunes para tratar de controlar esta plaga. Entre los productos recomendados para el control de esta plaga se encuentran: Azteca 2.1 G, Counter 15 G, Force 1.5 G, Fortress 2.5 G, y Lorsban (Clorpyrifos) 15 G, aplicados en banda o al pie de la planta, sin considerar lo altamente tóxico que son algunos de estos insecticidas, además de que contienen compuestos que se acumulan en el suelo, al grado de que después de tres años de su aplicación aún está presente, ocasionado una alta contaminación en importantes recursos para la agricultura.

Además, es muy notorio que los productores no aplican la dosis recomendada para el insecticida, por ejemplo (Lorsban), ya que han observado que con esa dosis no tienen los resultados esperados en el control de la plaga, por lo que prefieren incrementar la dosis hasta en el doble (50 kg/ha), con el consecuente incremento en el costo económico y ecológico. (Nájera ¹ *com.per.* (2006).

Algunas limitaciones al uso de insecticidas en el control de la “gallina ciega” incluyen:

- En cultivos perenes los picos poblacionales de la plaga ocurren cuando ya no es posible aplicar el producto en el suelo (Badilla 1994, Salguero 1994).
- La localización oportuna de las áreas infestadas es difícil, pues el daño es notorio cuando el periodo vegetativo del cultivo está avanzado. Se dificulta su detección en el muestreo por que las larvas pueden migrar verticalmente el perfil del suelo (Badilla 1994, Salguero 1994).
- La distribución dispareja de la plaga en tiempo y espacio, hace difícil la determinación del sitio apropiado y época de aplicación (King y Saunders 1984). Esto significa que la aplicación preventiva se tiene que hacer en toda el área de cultivo, con consecuencias negativas en cuanto a costos.
- Los huevos son colocados durante un largo periodo, dependiendo de las condiciones climáticas, dando origen a distintas cohortes de larvas y consecuentemente a un periodo largo de daños (Badilla 1994).
- La movilidad de los productos químicos en suelos pesados y orgánicos es mínima y no llegan al sitio de acción (Badilla 1994).

Los insecticidas usados en el combate de *Phyllophaga*, en su mayoría pertenecen al grupo toxicológico de los organofosforados (Cuadro 1), los que se recomienda usar cuando se determina la presencia de larvas o cuando el terreno tenga un historial de infestaciones. Las aplicaciones deben ser dirigidas a la raíz o adheridos a la semilla, lo que reduce la contaminación de aguas subterráneas y disminuye las cantidades de producto aplicado (Salguero1994).

¹ Miguel Nájera Rincón Investigador titular del campo experimental Uruapan perteneciente al Instituto Nacional de investigación Forestales Agrícolas y Pecuarias. INIFAP.

Cuadro 1. Insecticidas más comúnmente utilizados en el combate químico de la “gallina ciega”.

Ingrediente activo	Nombre comercial	Formulación	Modo de:	Grupo toxicológico
Acephate	Orthene	G	Sistémico y contacto	Organofosforado
Phorate	Thimet	G	Contacto	Organofosforado
Phoxim	Volaton	G	Contacto	Organofosforado, nitrilo
Fenamiphos	Nemacur	G	Sistémico	Organofosforado
Ethoprophos	Mocap	G	Contacto	Organofosforado
Diazinon	Diazinon	G	Contacto	Organofosforado, pirimidin
Carbofuran	Furadan	G	Sistémico	Carbamato
Clorpyrifos	Lorsban	G,L	Contacto	Organofosforado, piridina
Aldicarb	Temik	G	Sistémico	Carbamato

G: granulado, L: liquido

La “gallina ciega” se caracteriza por tener una gran diversidad de hospederos y ciclos de vida así como adaptaciones a diferentes condiciones, lo cual provoca dificultad en su manejo. No obstante que el combate químico es el más utilizado en algunos países, no ha proporcionado una protección adecuada a los cultivos (Coto 1993). Se presentan pérdidas totales en rendimiento a nivel local o regional, y son frecuentes los nuevos registros de parcelas infestados en diversos Estados de la República Mexicana.

El uso de productos químicos en la agricultura ocasiona cada vez más problemas que beneficios, sobre todo por el gran daño que se está generando en el ambiente. Entre estos daños se pueden mencionar la contaminación del suelo, de donde pasa a los mantos freáticos y contamina pozos de agua, además de los cuerpos lóticos y lénticos, así como la contaminación directa de los tejidos vegetales y aún del aire. Por esas vías de contaminación, los tóxicos sintéticos repercuten directa y rápidamente en la salud humana, pero también afectan lentamente por rutas más complejas, como las redes o cadenas tróficas, por las cuales los productos químicos están afectando las funciones de toda una serie de organismos que habitan en el suelo, en el agua, y en las plantas, a partir de los cuales se alimenta un gran

número de especies animales integrantes de la red trófica todo un catálogo de animales de todos tamaños, incluyendo a los animales domésticos y a la especie humana.

2.2.2. Control cultural

Los métodos culturales de control implican la alteración física del hábitat en cualquiera de las muchas maneras que pueda hacerse, para dejarlo menos favorable para la reproducción y la supervivencia de la plaga. Los efectos sobre la plaga pueden ser directos o indirectos, tales como favorecer a los enemigos naturales o aumentar la tolerancia de la planta o bien una combinación de ambos (De Bach 1977).

La investigación y aplicación de los métodos culturales debe tener fundamentos biológicos y ecológicos, tantos como cualquier otra técnica, ya que resulta esencial un conocimiento preciso de la biología y costumbres de la plaga, incluyendo una información exacta sobre sus enemigos naturales, así como la etapa en la cual es más vulnerable el insecto plaga (De Bach 1977).

Existen alternativas de control para el manejo de la “gallina ciega”, entre las cuales se mencionan el encalado del suelo, que hace inadecuado el ambiente para el desarrollo. La solarización del suelo, que mediante la radiación solar actúa como un agente letal para el control de esta plaga (Alzugaray *et al.* 1998).

El arado profundo es una alternativa de control cultural en sistemas de laboreo convencional, ya que las larvas son destruidas por el propio laboreo o quedan expuestas y se las comen las aves. Una manera de disminuir las poblaciones es con laboreos tempranos (enero y febrero) ya que los suelos laboreados no son preferidos para la oviposición. La rotación de cultivos es otra posibilidad, si hay una alta infestación de “isocas” (“gallina ciega”) en una pradera vieja se puede sembrar algún cultivo que por ciclo escape al daño como puede ser el caso de avena para pastoreo o un cultivo de verano (Alzugaray *et al.* 1998), realizar barbechos profundos a fines de otoño e invierno, seguidos de rastreo concienzudo desterronado, con el propósito de exponer la mayor parte de las larvas del tercer estadio y prepupas a la acción de aves, mamíferos y factores ambientales, mantener los campos libres de pasto, se logran menos daños, ya que en algunas ocasiones las infestaciones comienzan en los pastos, mantener una buena fertilidad del suelo que asegure un desarrollo más rápido de la planta, lo cual minimiza los estadios susceptibles al ataque y recuperación del daño. (King & Saunders 1984).

El uso de biodinamizados que repelen a los adultos de la misma especie, inhibiendo la oviposición y como consecuencia se disminuye el daño en el cultivo (Alzugaray *et al.* 1998)

La captura de adultos y uso de trampas de luz que reducen el número de adultos (Rodríguez 1997).

2.2.3. Control con feromonas sexuales

El nombre de feromonas es utilizado para designar a las sustancias químicas que son liberadas por un individuo a través de glándulas de secreción y que inducen una respuesta conductual o fisiológica en otro individuo de la misma especie, facilitando el encuentro entre sexos, desbloqueando la inhibición de la copula y favoreciendo el acoplamiento así como la reproducción, siendo expulsadas el ambiente como una forma de comunicación. Estas sustancias no deben de ser vistas como una panacea, sino mas bien se debe buscar integrarlas con otros métodos de control, ya que son compatibles con todos ellos (Rojas 1993).

El primer aislamiento e identificación de feromonas de insectos ocurrió en 1959 por científicos de Alemania, desde entonces cientos quizá miles de feromonas de insectos han sido identificadas al incrementar lo sofisticado de los equipos (Rojas 1993).

En el grupo en el que se han estudiado más ampliamente es en la clase Insecta en donde se han logrado establecer la estructura química de 400 especies aproximadamente (Rojas 1993).

Los trabajos realizados con “gallina ciega” donde son utilizadas las feromonas como atrayente sexual, en su mayoría han sido probadas para trabajos de monitoreo de poblaciones y no para controlar a las plagas (Nájera¹ *com.per.* 2006).

¹ Miguel Nájera Rincón Investigador titular del campo experimental Uruapan perteneciente al Instituto Nacional de investigación Forestales Agrícolas y Pecuarias. INIFAP.

Las feromonas regulan un gran número de funciones en los insectos, tales como: el apareamiento, ovoposición y defensa. El 60% de las feromonas identificadas en la Clase Insecta pertenecen al Orden Lepidoptera (Rojas 1993).

La especificidad de la feromona se logra por variación en el largo de la cadena, el número, naturaleza del grupo funcional y proporción precisa de los componentes feromonales (Metcalf 1990).

El problema en la identificación que presentan tales sustancias es que el material biológicamente activo se encuentra en pequeñas cantidades mezclado con grandes cantidades de material inactivo.

Un inconveniente en la identificación consiste en que no todos los compuestos liberados por los organismos son compuestos feromonales (Rojas 1993).

Existen entre 50 y 100 feromonas sintéticas disponibles comercialmente para la aplicación práctica y su empleo en estudio de campo sobre la detección, vigilancia y control de plagas. Las trampas feromonicas son muy útiles y se están convirtiendo en una herramienta importante en los programas de Manejo Integrado de Plagas (Metcalf 1990).

2.2.4. Uso de extractos vegetales.

Los productos naturales derivados de las plantas, proporcionan una vasta fuente de sustancias bioactivas que se han utilizado a través del tiempo como insecticidas en forma de polvos, cenizas o extractos (Cox 1981).

Durante los últimos 25 años, han sido de gran actividad dirigida al trabajo químico en la extracción e identificación de un extenso orden de productos naturales biológicamente activos que afectan el modo de conducta, desarrollo y reproducción en ciertos insectos nocivos (Cox 1981).

En México, actualmente existe la propuesta de empleo de insecticidas de origen vegetal, como elemento en el manejo integral fitosanitario pues ha sido demostrada su eficiencia en la práctica y también su capacidad de biodegradarse con facilidad sin dejar residuos contaminantes en el medio ambiente.

Los extractos vegetales probados de *Melia azedarach* o árbol del paraíso, también llamado “Paraguas Chino”, originario de China y Norte de la India, actualmente distribuido en nuestro país es considerado una opción para el control de plagas. El principio activo de *M. azedarach*

se localiza en el tallo y frutos, es utilizado como insecticida de contacto en forma de extracto acuoso. Los compuestos de este árbol interrumpen el desarrollo de insectos, y disminuyen el consumo de follaje y raíz provocando desorientación e inquietud continua en los insectos, incrementando el parasitismo al permanecer expuestos y débiles ante sus enemigos naturales (Cox 1981).

2.2.5. Mejoramiento genético

El mejoramiento genético agrupa a todos aquellos mecanismos basados en los caracteres heredados cuya expresión, a pesar de que están influenciados por el medio ambiente, no ha sido disparada por factores ambientales. Normalmente existen en la planta independientemente de que sean provocados por la plaga (La Torre 1990).

Las plantas presentan un grado diferente de sensibilidad al ataque de los insectos, de tal modo que unos prefieren unas plantas mas que otras. La explicación a lo anterior es diversa ya que intervienen en ello características físico-químicas de las plantas, y las condiciones del ambiente como el clima y el tipo de suelo (Metcalf y Lockmann 1990).

Se estima que por cada dólar invertido en investigación sobre este tema se obtiene una ganancia de 20 (Butin 1986), además los estudios de este tipo son necesarios en programas de manejo de poblaciones.

El mejoramiento genético actúa en fenómenos relacionados con la resistencia de la planta como tolerancia, preferencia y antibiosis. La primera es la capacidad de ciertas plantas para recuperar los daños que sufren o para crecer y producir un rendimiento adecuado, a pesar de mantener una población de insectos capaz de dañar a un hospedero más susceptible, la tolerancia por lo general es resultado de uno a más factores como son: vigor general de la planta, crecimiento de los tejidos dañados, fuerza de los tallos y resistencia de albergar a los insectos y producción de ramas adicionales.

La preferencia ocurre cuando los insectos seleccionan ciertas especies, variedades o individuos. Por último, la antibiosis se basa en que las plantas poseen sustancias antagónicas a los insectos o debido a que su estructura física es tal, que se impide por ello que las larvas se alimenten (La Torre 1990).

2.2.6. Control biológico

El campo del control biológico abarca el estudio, importación, incremento y conservación de los organismos benéficos, para la regulación de las densidades de población de otros organismos considerados plaga.

Bajo el estudio del control biológico, se incluyen fases que son básicas a cualquier aplicación del método, pero estas no solamente no reportan resultados utilitarios inmediatos como un objetivo, y no incluyen los efectos directos para utilizar, manipular o conservar los enemigos naturales (De Bach 1968).

La primera fase investiga el comportamiento, la taxonomía, biología, demografía, etc. de los parasitoides, depredadores y patógenos, pero pueden considerarse sus hospederos, así como otros factores ambientales que tengan efectos interactivos. La segunda fase incluye estudios ecológicos de campo, designados para evaluar la importancia relativa de los enemigos naturales, con respecto a otros factores en la regulación de las densidades de poblaciones de hospederos (De Bach 1968).

La introducción controlada de nuevos enemigos naturales, está generalmente basada en el hecho de que muchas, si no es que la mayoría de las plagas agrícolas, han sido accidentalmente introducidas dentro de las áreas en cuestión, mientras que sus enemigos naturales nativos se han quedado en el lugar de origen. Esto, sin embargo, no debe tomarse en cuenta para excluir la posibilidad de controlar plagas nativas, por la introducción de enemigos naturales que existan sobre especies exóticas relacionadas con la plaga (De Bach 1968).

Para llevar a cabo el control de una plaga bajo este método es necesario buscar enemigos naturales cuyos efectos aumenten conforme se incremente la densidad del hospedero y que disminuyan al decrecer el nivel de estos, ya que tienden a reducir la población cada vez que se alcanza cierta densidad (la cual puede ser dañina dependiendo de la tolerancia al daño) y que la presión se atenúe cuando la plaga disminuye.

En la actualidad han sido descubiertos aproximadamente un 15% de los insectos enemigos naturales que existen, de los cuales los más importantes dentro de la lucha biológica son los parasitoides, depredadores y entomopatógenos (De Bach 1981).

2.2.6.1. Control de la “gallina ciega” por medio de depredadores y parasitoides

En la actualidad no se cuentan con suficientes conocimientos para opinar con precisión sobre la importancia de los artrópodos como agentes importantes de regulación de *Phyllophaga* spp. Se sabe que los enemigos naturales juegan un papel importante en la regulación de estas plagas; sin embargo no existen estudios que permitan ofrecer opciones a los agricultores (Hanson 1994).

Entre los enemigos naturales se reportan algunos parasitoides y depredadores. En el Orden Hymenoptera, se menciona al exoparásito *Campsameris dorsala*, *Elis* sp., *Tiphia parallela* Smith (Tiphidae) y a *Pellicinus polyturator* Drury (Pelecinidae) que son factores de mortalidad de las larvas de “gallina ciega”, pero hasta el momento con escasa importancia desde el punto de vista aplicado (King 1994).

Los depredadores de larva de *Phyllophaga* incluyen varios mamíferos, Coleópteros y Dípteros. En Coleoptera los depredadores incluyen adultos y larvas de Carabidae y larvas de Elateridae. Las larvas de algunas especies de Asilidae y Tabanidae son reportadas como depredadores de *Phyllophaga* en Estados Unidos. Los depredadores de adultos incluyen una diversidad de invertebrados y vertebrados, entre los que se pueden mencionar al sapo (*Bufo marinus* L.) y algunas aves (Hanson 1994).

2.2.6.2. Control microbial de la “gallina ciega”

El control microbial consiste en la utilización de los patógenos para mantener la población de las plagas a niveles económicamente rentables. Alves (1986) señala que los microorganismos entomopatogénicos no deben ser considerados como únicos agentes de control, más bien deben formar parte de un conjunto de medidas (MIP), que en armonía con el medio ambiente sean capaces de reducir las poblaciones de insectos plaga.

El control microbial en la actualidad juega un papel importante en los nuevos sistemas de manejo de *Phyllophaga*, especialmente para el pequeño y mediano agricultor, junto con otros métodos químicos tiende a reducir la cantidad de ingrediente activo aplicado, como el uso de tratamientos a la semilla del maíz y métodos culturales como la labranza cero y el manejo de coberturas durante el periodo de oviposición de los adultos de la “gallina ciega”, estos serán componentes importantes en los sistemas del manejo de esta plaga, sobre todo considerando

el hábitat subterráneo de estos insectos, que los hace mas susceptibles a la infección por microorganismos como los hongos, bacterias, virus y nematodos (Nájera 1998).

2.2.6.2.1. Control a base de bacterias

El suelo es un medio complejo rico en microorganismos. Un suelo agrícola fértil contiene de 10^8 a 10^9 bacterias/gramo, el equivalente de 300-3000 Kg/ha, o de 0.05% de la masa total (Alexander 1977). Dentro de este complejo ambiente el problema que surge con respecto al control biológico satisfactorio, más que el presentado por la resistencia a factores extremos del medio ambiente, es el ofrecido por la competencia existente. La bacteria *Bacillus popilliae* (Dutky), (Bacillaceae) se ha utilizado en Estados Unidos durante más de 50 años para controlar plagas de escarabeidos como *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) (Alexander 1977).

La bacteria es un patógeno obligado cuyas cepas presentan un alto grado de sensibilidad hacia huéspedes escarabeidos específicos. En Estados Unidos se han comercializado cepas específicas para controlar a *P. japonica* y *Amphimallon majalis* (Coleoptera: Scarabaeidae). La bacteria se ha utilizado también experimentalmente en el campo en la India y en China.

Esta bacteria se aplica en forma de inóculo en poblaciones moderadas y altas. Se espera que durante el primer año se produzca aproximadamente un 30% de infección (Klein 1992) y que la bacteria se multiplique en la larva enferma proporcionando control en dos o tres años tras la aplicación. *B. popilliae* debe su éxito a su habilidad para multiplicarse de forma natural en la población huésped y sobrevivir en el suelo en ausencia de la misma durante periodos muy largos. Aunque no hay un método confiable para producir el aislamiento cuantitativo de la bacteria en el suelo y poder así medir su dispersión, se observa que la larva *P. japonica* y otros invertebrados al moverse expanden el inóculo por el suelo.

Serratia entomophila (Enterobacteriaceae) es una bacteria patógena que causa la enfermedad denominada “ambar” en larvas de *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae). La bacteria se encuentra comúnmente entre las poblaciones de *C. zealandica* en Nueva Zelanda y se le asocia frecuentemente con colapsos naturales en poblaciones de plagas (Jackson 1984). Es sin embargo un patógeno altamente específico y el único huésped que se le conoce del mismo es al escarabiedo *C. zealandica*. O’Callaghan *et al.* (2000) en trabajos realizados en pastizales de Nueva Zelanda han utilizado con éxito la aplicación de bacterias de *Serratia*

entomophila y *S. proteamaculans* causando la enfermedad denominada “ámbar” en larvas de “gallina ciega” *Costeyitra zealandica*.

Bacillus thuringiensis ha tenido poco éxito con respecto a los insectos que habitan en el suelo ya que estos son generalmente menos susceptibles que los homólogos aéreos a la espora y la toxina. El potencial de *Bt* en el suelo se ve además limitado por la descomposición rápida de la toxina llevada a cabo por los microorganismos del suelo. En Holanda sin embargo, se ha logrado cierto éxito contra las larvas de *Tipula* spp. Al tratarlas con *B. thuringiensis* var *israeliensis* introducido en un cebo de salvado (Smith 1992) pero dicho control requiere una proporción de aplicación alta (16 litros *Bti*/ha o 3×10^{10} equivalentes espora /m²).

Nájera, *et al.* (2000), trabajaron en laboratorio con larvas de *Phyllophaga ravida* y *P. vetula* evaluando la acción de bacterias *Paenibacillus popilliae* originarias de América central, la inoculación de las bacterias se llevo a cabo con la preparación de una suspensión de esporas (*per os*) e inyección, obteniendo mortalidades superiores al 33% en ambas especies.

2.2.6.2.2. Control a base de hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos son un grupo de microorganismos ampliamente estudiados en todo el mundo, existiendo más de 700 especies reunidas en 100 géneros y tienen la particularidad de parasitar a diferentes tipos de artrópodos y de encontrarse en los hábitats más variados, ya sea acuático o terrestre, y dentro de estos, en cultivos anuales, semiperennes y perennes. Asimismo, los hongos pueden jugar un papel muy importante en la salud humana ya que algunas especies son virulentas para moscas y mosquitos (Lecuona 1995).

Su importancia, dentro de un programa de manejo integrado de plagas, lo demuestran las formulaciones que fueron y son realizadas con ellos y que son empleadas en distintos países. Actualmente, las especies que están siendo más estudiadas en programas de cooperación con la industria son: *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*, *Verticillium lecanii*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *Lagenidium giganteum* para el control de plagas de pasturas, suelo, invernáculo y mosquitos (Lecuona 1995).

Las especies de hongos entomopatógenos que atacan a la “gallina ciega” son relativamente pocas, siendo las más comunes y estudiados: *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *B. brongniartii*. Otras especies de Deuteromycetes atacan ocasionalmente a escarabeidos. *Cordyceps*

(Ascomicete) es una especie de hongo bien descrita para escarabajos, pero se conoce poco sobre su biología y ecología. Especies del orden Zygomycete (Entomophthorales) son comúnmente patógenos de insectos (Jackson 1992). Además de estos géneros, también se reportan otros entomopatógenos atacando insectos de la familia Scarabaeidae (Cuadro 2).

Cuadro 2. Especies de hongos reportados como patógenos de escarabeidos (Jackson 1992).

Ascomycetes	Coelomycetes	Deuteromycetes	Zygomycetes
<i>Cordyceps aphodii</i>	<i>Entoderma colletosporium</i>	<i>Akanthomices angustispora</i>	<i>Pandora brahmminae</i>
<i>C. barnesii</i>		<i>Beauveria amorphia</i>	
<i>C. brittlebankii</i>		<i>B. bassiana</i>	
<i>C. geotrumpis</i>		<i>B. brongniartii</i>	
<i>C. melolontha</i>		<i>Hirsutella stylophora</i>	
<i>C. michiganensis</i>		<i>Metarrizium anisopliae</i>	
<i>C. neovolkiana</i>		<i>Paecilomyces canadensis</i>	
<i>C. ravenelii</i>		<i>P. cicadea</i>	
<i>C. superficialis</i>		<i>P. fumosoroseus</i>	
<i>C. stylophora</i>		<i>Penicillium sp.</i>	
		<i>Verticillium lecanii</i>	

En la actualidad existen muchos trabajos que apoyan la utilización de estos patógenos en el combate de la “gallina ciega”. Milner, (2000) menciona la utilización de hongos entomopatógenos de los géneros *Metarhizium* y *Beauveria* en cultivos de caña de azúcar en Australia para el control de larvas de escarabajos de la familia Melolonthinae, con lo que se logra controlar de un 50-60% los daños ocasionados por estas plagas, mencionando que los conidios de estos hongos pueden sobrevivir en el suelo por periodos de hasta tres años.

García-Martínez *et al.* (2000) utilizaron cepas de *M. anisopliae* para el control de larvas del tercer estadio de *Phyllophaga crinita*, plaga de importancia agrícola en el noroeste de México, obteniendo niveles de mortalidad superiores al 80 % a los 30 días de la aplicación.

2.2.6.2.2.1. Ciclo de la enfermedad

La infección de la mayoría de los hongos entomopatógenos se inicia con la germinación de los conidios, los cuales emiten un tubo germinativo que invade directamente a través del

exoesqueleto o cutícula. El sitio de invasión ocurre a menudo entre las partes de la boca, partes intersegmentales y a través de espiráculos donde existe generalmente una mayor humedad, que promueve la germinación y además la cutícula no está esclerotizada, esto hace que la penetración del hongo sea más fácil, en este proceso de penetración están involucradas enzimas que degradan la cutícula. Una vez en el interior el hongo se multiplica por gemación dando formas micelianas libres y unicelulares llamadas blastosporas, ya en el interior del hemocele el hongo produce toxinas que actúan como inhibidoras de las reacciones de defensa del hospedero por alteración de los hemocitos. La muerte del insecto parasitado ocurre generalmente antes que el hongo colonice todo el interior del hemocele, ella es originada en gran medida por la acción de las sustancias tóxicas secretadas por el hongo. La muerte del hospedero marca el final de la fase parasítica para continuar creciendo saprofiticamente por todos los tejidos. Luego de la muerte el micelio invade todos los tejidos y órganos, comenzando en ciertos casos por los tejidos grasos, después de la colonización el insecto queda momificado. Si las condiciones ambientales son favorables las hifas vuelven a atravesar la cutícula hacia el exterior donde forman esporas tomando la coloración característica de cada especie (Lecuona 1995).

La apariencia general de una “gallina ciega” infectada por hongos entomopatógenos está asociada con el proceso de desarrollo de la enfermedad. Durante los estados iniciales es frecuente observar sobre la superficie del cuerpo de la larva diversas manchas necróticas de color café oscuro o negro, éstas manchas se asocian a los sitios por donde ha penetrado e invadido el hongo (Poinar y Thomas 1978, McCoy *et al.* 1988). Conforme la infección avanza, el insecto presenta diversas alteraciones en su comportamiento ya que pierde actividad, reduce su apetito y pierde coordinación, en éste estado, la larva frecuentemente cambia de color, presentando tonalidades oscuras, en algunos casos, se ha observado la tendencia a desplazarse hacia la superficie del suelo. En ciertas ocasiones, la larva puede paralizarse y después de su muerte es cubierta por una capa de micelio blanco, si se trata de una infección provocada por *Beauveria* spp, o verde, si corresponde a *Metarhizium anisopliae*; finalmente, el insecto se momifica sin perder su forma y tamaño. Las larvas muertas por hongos entomopatógenos no se descomponen, y en consecuencia no despiden mal olor.

2.2.6.2.2.2. Condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad

2.2.6.2.2.2.1. Humedad relativa

Los hongos entomopatógenos, generalmente requieren de alta humedad relativa para la germinación de los conidios y la formación de estructuras reproductoras, este factor también afecta la estabilidad y sobrevivencia del hongo. Las condiciones húmedas favorecen la presencia y persistencia de los hongos, manifestándose como focos epizoóticos (Clayton y Grove 1988).

Algunos autores consideran que la humedad relativa es de poca importancia en el proceso de infección pero indispensable para el desarrollo y la germinación de los conidios, además la humedad es importante para el desarrollo de las hifas y la producción de esporas, lo cual resulta solamente si la humedad esta cerca del 100%. La humedad relativa puede afectar la longevidad de las esporas, ya que se ha comprobado que los conidios de *B. bassiana* viven más a humedades relativas de 0 a 30 que a 75% (Clayton y Grove 1988).

2.2.6.2.2.2.2. Temperatura

La influencia de la temperatura en infecciones de insectos con *Beauveria* depende de los requerimientos del hongo. El género *Beauveria* normalmente se desarrolla en un rango de 0 °C a 40 °C de temperatura, con una temperatura óptima de 20 a 30 °C, lo cual depende del origen geográfico del aislamiento. Investigaciones hechas con *Beauveria*, mencionan que necesita temperaturas entre los 10 °C y 30 °C para la germinación de las esporas, desarrollo hifal y producción de esporas. Se ha comprobado que las esporas mueren a temperaturas cercanas a los 50 °C y pierden su viabilidad en pocos meses a temperaturas de 21 °C, pero al estar almacenados a 8 °C, se pueden mantener viables por un año (Cayton y Grove 1988). Las temperaturas bajas son más favorables para mantener niveles de viabilidad para las formulaciones en aceite, la viabilidad puede reducirse a cero después de 20 días a 25 °C, mientras que a 2 °C, se mantiene entre el 95 y 99 % por 40 días (Cayton y Grove 1988).

La temperatura y los niveles de humedad son dos factores que influyen en el desarrollo normal de hongos, sin embargo los hongos poseen una habilidad para permanecer viables a altas y variadas temperaturas del suelo, además ellos pueden adaptarse a suelos con alto contenido de humedad o suelos completamente secos (Fuxa 1987).

2.2.6.2.2.3. Luz

La intensidad, duración y longitud de onda, son factores importantes en la sobrevivencia de los hongos entomopatógenos. La luz ultravioleta en dosis subletales, afectan el desarrollo y puede ser letal o mutagénico para las esporas. La vida media de los conidios que están expuestos a la luz solar es de aproximadamente 2 horas, debido al efecto letal de la luz ultravioleta y específicamente en la onda B (295-320 nm) (Roberts 1989).

Los requerimientos de luz de muchas especies es variable, algunos crecen bien en oscuridad, pero otros prefieren la luz y algunos esporulan mejor bajo la luz ultravioleta, mientras otros requieren periodos de luz y oscuridad para su esporulación (Smit y Onions 1994).

2.2.6.2.3. Clasificación de los hongos entomopatógenos

La mayor parte de los géneros de hongos entomopatógenos como *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces*, pertenecen a la siguiente clasificación (Robert 1989, Tanada y Kaya 1992).

DIVISION: Eumycota

SUBDIVISION: Deuteromycotina

CLASE: Deuteromycetes (Hyphomycetes)

ORDEN: Moniliales

FAMILIA: Moniliaceae

GENERO: *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces*.

2.2.6.2.4. Especies más comunes que atacan a la “gallina ciega”

2.2.6.2.4.1. *Paecilomyces fumosoroseus* (Bain, 1907)

Tres especies de *Paecilomyces* han sido descritas en escarabajos. Una de las especies más comunes *P. fumosoroseus*, han sido descrita de *Melolontha melolontha* bajo el sinónimo de *Spicaria fumoso-rosea*. Otras especies asociadas a escarabajos son *P. farinosus*, *P. cicadea* y *P. canadensis* (Glare, 1992).

El género *P. fumosoroseus* se caracteriza por que su colonia adquiere tonalidades rosadas, los conidioforos son erectos y llevan varias ramas compactas de fiálides cuyas bases están fuertemente engrosadas, sus conidios son desde cilíndricos a fusiformes y miden de 3-4 x 1-2 micras de largo y diámetro. En un principio esta especie fue descrita como: *Isaria fumosoroseus* Wise, *Spicaria aphodii* Vuill, *Spicaria cossus* Portier y Sartory. Algunas veces es llamada muscardina amarilla.

Este hongo produce colonias blancas que luego se vuelven color rosa pálida y al llegar a la esporulación, sus colonias se tornan un color gris claro. Los conidioforos se originan ya sea en la parte basal del crecimiento o en las hifas aéreas, que están agrupadas en paquetes ramificados llamados sinemas. Las fiálides son globuladas en la base y terminadas en un cuello largo en forma de botella, sus conidios se arreglan en cadenas y son de fusiformes a cilíndricos. *P. fumosoroseus* ataca un amplio rango de hospederos, especialmente larvas de lepidópteros, además puede atacar a coleópteros, homópteros, himenópteros y dípteros (Osborne y Landa 1992).

2.2.6.2.4.2. *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. 1883

Desde su descubrimiento en 1879, *M. anisopliae* ha sido encontrado de manera natural en Francia, EUA, México, Trinidad, Samoa, Java, Hawai, Puerto Rico, Cuba, Argentina, Brasil, etc. (Stevenson 1918).

El hongo *M. anisopliae*, es muy común y se encuentra ampliamente distribuido y presentando un amplio rango de hospederos. La mayoría de estos son encontrados dentro del orden Coleoptera con un total de 134 especies principalmente de la familia Curculionidae, Elateridae y Scarabaeidae (Zimmermann 1993). Este hongo es considerado como agente muy importante en el control, fácilmente identificado por su coloración verde oliváceo con

conidios cilíndricos (5-7.5 x 2.3-3.7 micras largo por ancho) los cuales son producidos en forma densa y compacta. Se desarrolla y fructifica mejor en la oscuridad, además a medida que la humedad del medio se incrementa, el crecimiento es más favorable. La temperatura óptima para la germinación, fructificación y crecimiento es de 26 °C y el pH inicial del medio debe encontrarse entre 6.9 y 7.4 (Zimmermann 1993).

2.2.6.2.4.3. *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill

Cerca de 500 especies de insectos son hospederos del hongo entomopatógeno *Beauveria*, principalmente de los ordenes Coleoptera y Lepidoptera. Entre las especies comúnmente asociadas a los escarabajos se encuentran *B. bassiana*, *B. brongniartii*, los cuales han servido para el control de algunos insectos rizófagos como *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Beauveria* tiene la ventaja de ser producido en grandes cantidades en medios sólidos y líquidos.

Las colonias de *B. bassiana* alcanzan un diámetro de 0.6 -2.3 cm de diámetro en ocho días de crecimiento en medios de cultivo a 20 °C, son de apariencia polvosa debido a la presencia de gran cantidad de conidios. El crecimiento inicial es de color blanco, pero después se puede tornar amarillento o rosado. Los conidios son hialinos, globosos, generalmente miden de 2-3 um de diámetro y se encuentran dispuestos de manera irregular en zig-zag (Tanada y Kaya 1993).

3. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

3.1. Cuenca del lago de Pátzcuaro

Pátzcuaro se encuentra dentro de una cuenca donde anteriormente se encontraba un río, que en la actualidad está obstruido por lava. La cuenca de Pátzcuaro fue el centro del imperio purépecha (Tarasco) y se estima que tenía una población de 60,000 a 105,000 habitantes al momento de la conquista española (Chacón 1993). Esta cuenca cuenta con una extensión de 1,000 km² y ha sido escenario de experiencias agrícolas muy antiguas, ya que por el descubrimiento del polen fósil de maíz en el fondo del lago se sabe que la agricultura de la región se practica al menos desde hace 3,500 años (Chacón 1993).

En la actualidad la población purépecha representa el 25% (21,000 habitantes) de la población total de la ribera, distribuida en 24 comunidades de las cuales dos de ellas se encuentran en las montañas, cinco son isleñas y 17 son ribereñas (Chacón 1993).

3.1.1. Localización

Pátzcuaro se localiza en la región norte central del estado de Michoacán a 57 km. al suroeste de la ciudad de Morelia, en el Altiplano Mexicano entre los paralelos 19° 31' y 19° 42' N y entre los meridianos 101° 32' y 101° 43' O (figura 1). La altitud fluctúa entre los 2,035 msnm en la ribera del lago hasta los 3,200 msnm en las máximas elevaciones de la cuenca (Chacón 1993).



Figura 1. Localización geográfica del Lago de Pátzcuaro (Encarta 2006).

3.1.2. Suelos

Los suelos localizados en la cuenca son básicamente derivados de cenizas volcánicas, magma y lavas basálticas ricas en olivino ($(\text{Mg Fe})_2 \text{SiO}_4$ albita ($\text{Na Al Si}_3 \text{O}_8$) + anortita ($\text{Ca Al}_2 \text{Si}_2 \text{O}_8$) y piroxenos. Estos materiales son principalmente alcalino-ferromagnesianos y susceptibles a la intemperización. Los suelos que son relativamente jóvenes son originados a partir de productos volcánicos caracterizados por una alta acumulación de humus, alta susceptibilidad a los procesos erosivos y a la lixiviación parcial de sus bases (Villarelo 1989). En su mayoría son andosoles y luvisoles, los primeros se originan a partir de cenizas volcánicas, son oscuros con un alto contenido de fósforo y los luvisoles son localizados también en las regiones volcánicas, de color rojizo ricos en arcilla y ácidos y al igual que los andosoles son susceptibles a la erosión. En la cuenca de drenaje así como en las áreas más pequeñas de la cuenca particularmente sobre la región este, se localizan los suelos de tipo acrisoles, vertisoles y gleysoles siendo este último un componente primario de las riberas del Lago. De acuerdo a Villarelo 1989), se presentan cinco tipos de suelo en la región de la cuenca:

- 1) En las partes más altas se encuentra el suelo amarillo café, que son producto de la estación húmeda, bajo una cubierta de pinos y abetos que le da alta fertilidad.
- 2) Otro tipo es el túpuri, conocido como laterítico de color amarillo-café de textura fina que varia de gruesa a arcillosa.
- 3) Un tercer tipo es el llamado “charánda”, que se localiza en las partes más bajas de la cuenca, es un suelo rojo-café, arcilloso, producto de la intemperización de la roca volcánica, son fértiles por naturaleza, pero muy susceptibles a la erosión.
- 4) Un suelo de tipo lacustre ubicado en lugares selectos a lo largo de la ribera, son producto de la deposición de materia orgánica al descender el nivel del lago, su color es rojizo grisáceo, con textura de limo o cieno.
- 5) Un suelo muy escaso, el “viras” es una arcilla blanca fibrosa, poco fértil, este suelo está cubierto por depósitos lacustres, formando un limo rico en compuestos orgánicos y carbonato de calcio.

3.1.3. Hidrología

Existen amplias llanuras de inundación alrededor de los principales cuerpos de agua como es el caso de Pátzcuaro, Cuitzeo, Chapala y otros, que confirman una reducción en el nivel de las aguas.

Debido a su accidentada topografía el terreno presenta un alto grado de pendiente para la mayor parte de la cuenca de drenaje de tal forma que en distancias relativamente cortas aproximadamente de 1.5 km, la altitud se incrementa de 2,035 a 2,600 msnm. (Gorestein y Pollard 1983), reconocen seis tipos de ambientes topográficos: a) Aguas abiertas, representadas por el vaso lacustre libre de vegetación acuática, b) Zonas pantanosas de tular, las cuales son extensas áreas litorales asociadas con la vegetación acuática marginal, c) Zona de riberas, localizados a una altitud de 2,034 a 2,035 msnm, incluyendo a las islas, planicies inmediatas al lago y depósitos aluviales afectados por las oscilaciones del nivel del agua, d) Pendientes bajas de la sierra, con una altitud de 2,100 msnm, representada por pendientes menores de colinas y montañas así como de depósitos y flujos de lava, e) Pendientes altas de la sierra, con un rango de altitud de 2,300 a 2,800 msnm, f) Ambiente alpino en un rango de 2,800 a 3,200 msnm, caracterizado por las cumbres de las máximas elevaciones. La máxima elevación en la cuenca de drenaje está representada por el Pico de Zirate a 3,300 msnm.

3.1.4. Clima

La región de Pátzcuaro tiene un clima de tipo Cb (w2)(w)(e) g, determinado por García (1988), el cual corresponde a un clima templado con verano fresco y largo, una lluvia invernal menor del 5%, extremo de oscilación entre 7°C y 14°C. Con una marcha de temperatura tipo ganges, mes más caliente antes del solsticio de verano. Una temperatura anual que va desde los 12° y 18° C y la del mes más frío entre -3° y 18° C. La temperatura del mes más caliente se encuentra entre los 6.5 ° y 22 ° C mientras que la precipitación pluvial es de 1041.2 mm. (García 1988).

La temporada de lluvias comienza de mayo a junio y finaliza entre agosto y septiembre, siendo los meses más fríos diciembre y enero y los más cálidos mayo y junio (García 1988).

3.1.5. Vegetación

Se encuentran diferentes tipos de vegetación y uso del suelo. En la parte más próxima al lago, existen principalmente suelos con uso forestal y agropecuario además de pastizales en menor proporción (Chacón 1993).

Las máximas elevaciones o ambientes alpinos se encuentran representadas por bosques de pinabete (*Abies religiosa*) con algunas asociaciones de pino (*Pinus pseudostrobus*) y aile (*Alnus arguta*) (Chacón 1993).

Las pendientes altas de la sierra (2,300-2,800 msnm) están representadas por el bosque de pino (*Pinus leiophylla*, *P. michoacana*, *P. pseudostrobus* y *P. montezumae*), bosque de encino y pino-encino (*P. leiophylla* y *Quercus castanea*; *P. montezumae* y *Q. rugosa*). Otras especies arbóreas de interés comercial son el sirimo (*Tilia mexicana*), el jaboncillo (*Cletra mexicana*) y el limoncillo (*Ternstroemia pringler*), éstos últimos casi erradicados de la región (Chacón 1993).

Las áreas deforestadas y erosionadas localizadas en estas elevaciones y con pendientes pronunciadas sostienen una vegetación robusta con *Bursera cunneata*, maguey (*Agave* spp), el palo santo (*Senecio preacox*) y *Clusiasalvinii* spp. (Chacón 1993).

En la sierra de pendientes bajas (2,100-2,300 msnm) se encuentran asociadas principalmente pastos y vegetación secundaria herbácea como el huizache (*Acacia pennatula*), tsanbas (*Yucca filifera*), pare (*Opuntia* spp), maguey (*Agave* spp), uña de gato (*Mimosa buncifera*), chiquito (*Croton clavensces*) y la vegetación de tipo agrícola (maíz, frijol, trigo, lenteja entre otros). La rivera (2,035 - 2,100 msnm) se encuentra en su mayor parte bajo producción agrícola de alfalfa, garbanzo chícharo, lenteja, y otros (Chacón 1993).

La vegetación acuática se encuentra formando una franja alrededor del lago en el cuál hay un conjunto de comunidades vegetales que ocupan terrenos inundados temporalmente o bien donde el agua alcanza poca profundidad (Chacón 1993).

En la parte más externa del lago así como cerca de la tierra firme se desarrolla una comunidad densa de *Cleocharis montevidensis*, *Sagittaria graminea*, *S. latifolia*, *Scirpus americanus*, *S. validus*, *Typha domingensis* y *T. latifolia*, a esta asociación se le conoce como tular (Chacón 1993).

3.2. CIENEGA DE ZACAPU

3.2.1. Localización

Ayala (1997), menciona que la población de Zacapu se encuentra en la zona central del estado de Michoacán, con una altitud de 1980 m.s.n.m. Gran parte de la superficie fue una laguna, de la que ahora queda un cuerpo de agua que abarca una superficie de 335 m² (Demant 1978, 1981).

Desde el punto de vista fisiográfico, la cuenca de Zacapu pertenece al Eje Neovolcánico Transversal (Demant 1978, 1981). La zona occidental de la cuenca, donde se localiza el ejido de Cantabria, considerado en el presente estudio, está enmarcada al sur por la Sierra Tarasca y al oeste y noroeste por la sierra de Caurio que alcanza su máxima altitud en el cerro del Tecolote a 3,365 m de altitud (Demant 1992). En contraste, la región de la Ciénega, ubicada hacia el norte y noreste de la cuenca, incluye una gran planicie ubicada a 2,000 m de altitud aproximadamente. En este valle, con una extensión aproximada de 20 kilómetros de norte a sur por cuarenta kilómetros de oriente a poniente, se encuentran 12,000 has de tierras fértiles dedicadas a la producción agropecuaria (Mummert 1994). La Ciénega de Zacapu se ubica en las coordenadas 19°10'00" Latitud norte y 101° 47'25" Longitud Oeste

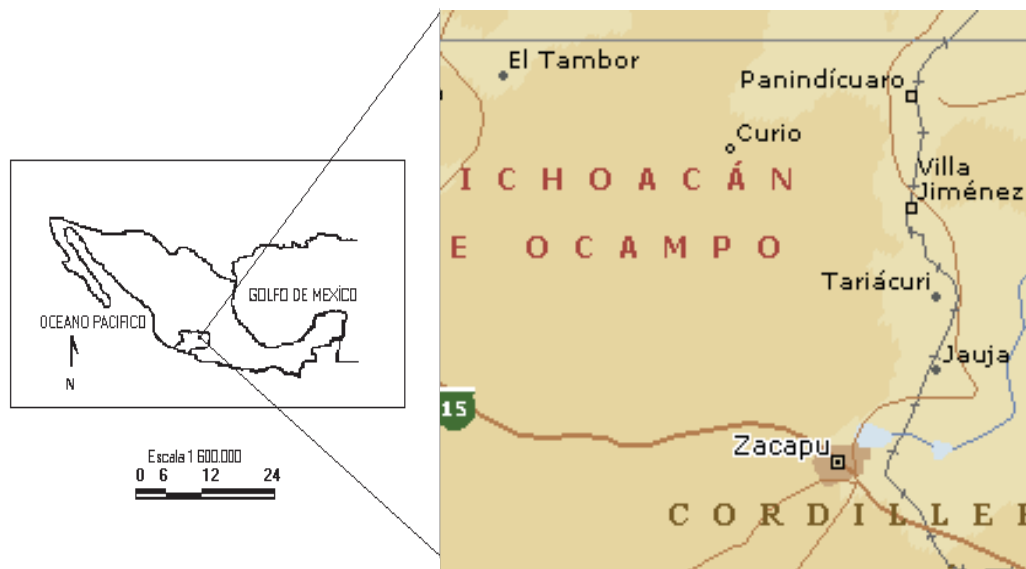


Figura 2 Localización geográfica de la Ciénega de Zacapu (Encarta 2006).

3.2.2. Suelos

Estos se clasifican en aluviales y residuales desarrollados a partir de basaltos, brechas, tobas andesíticas y riolitos, los minerales constituyentes de la roca basáltica son ricos en calcio, magnesio, fierro, moderadamente potasio y sodio por lo cual son suelos muy fértiles, arcillosos de color negro a gris y de buena potencialidad agrícola; entre los suelos más importantes se pueden mencionar los Podzolicos y Chernozem (Díaz 1997).

3.2.3. Hidrología

La Ciénega forma parte del sistema Lerma Chápala-Santiago a donde pertenece el río Angulo, que la une con el río Lerma. El río es alimentado por más de 20 pequeños manantiales, de los cuales los más importantes son “La angostura” al norte y “ojo de liebre” al sur, siendo este último el más importante.

3.2.4. Clima

De acuerdo a García (1988), el clima es Cb(wi)(w)(e)g templado sub-húmedo con lluvias en verano, la temperatura media anual es de 16.4 °C. La temperatura mínima extrema es de 5° bajo cero presentándose en enero, la máxima extrema es de 37 °C en el mes de abril. Las precipitaciones oscilan de 700 a 1000 mm de una mínima de 433 en el otoño, durante los meses de mayo a octubre ocurren las lluvias, la máxima es de junio a julio; el 50 % del total anual en enero, junio y septiembre. La temporada seca dura 7 meses. Existe una frecuencia de heladas de 35 días al año en promedio, las cuales se presentan octubre y marzo. Los vientos dominantes provienen del noreste salvo en enero y febrero, meses durante los cuales provienen del noroeste (INEGI 1990).

3.2.5. Vegetación

Maldonado (1996), menciona que la vegetación esta representada por el matorral sub-tropical, pastizal inducido y bosque mixto de pino-encino, además de zonas destinadas al cultivo de hortalizas y maíz, a lo largo del río se pueden observar elementos del bosque de galería como son: *Taxodium mucronatum* y *Salix* sp., además de lirio acuático (*Eichornia crassipies*) y tule.

4. OBJETIVOS

1. Identificar las especies de “gallina ciega” presentes en las dos zonas de estudio
2. Estimar la incidencia natural en unidades formadoras de colonias de hongos entomopatógenos en parcelas agrícolas durante las estaciones del año.
3. Determinar la sobrevivencia de esporas de los aislamientos de hongos entomopatógenos obtenidos en campo y probados en laboratorio.
4. Determinar el efecto de *B. bassiana* sobre larvas de “gallina ciega” en bioensayos y pruebas de campo.
5. Determinar la concentración letal media (CL₅₀) de tres aislamientos de *B. bassiana* en larvas del tercer estadio de la “gallina ciega”.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron muestreos de campo en las regiones de Cantabria municipio de Zacapu, Michoacán y San Francisco Uricho municipio de Pátzcuaro, Michoacán, posteriormente se continuaron los trabajos en el laboratorio de Control Biológico localizado en las instalaciones del Campo Experimental Uruapan, dependiente del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), localizado en la Ciudad de Uruapan, Michoacán.

5.3. Identificación de las especies de “gallina ciega”

En el ejido Cantabria, durante el lapso comprendido entre junio de 1999 y mayo de 2003 se efectuaron cuatro colectas nocturnas de adultos de la familia Melolonthidae utilizando trampas tipo pantalla con fuente de luz mercurial de 175 watts. El tiempo de colecta se limitó a la máxima actividad de vuelo de las especies asociadas al cultivo de maíz, que en la región se ubica entre la primera y segunda semana de mayo, desde las 21:00 horas hasta las 21:45 horas de acuerdo al horario de verano. Al mismo tiempo, durante cada colecta, con ayuda de lámparas de mano con fuente de energía de 6 voltios se efectuaron recorridos por la vegetación aledaña a los cultivos para obtener adultos en cópula o alimentándose sobre la vegetación silvestre.

En San Francisco Uricho se llevaron a cabo muestreos de suelo durante la estación de invierno con el objeto de obtener larvas del tercer estadio y prepupa para su identificación en el laboratorio del Centro Nacional de Producción Sostenible (CENAPROS). Se colectaron un total de 200 larvas del tercer estadio las cuales fueron revisadas al microscopio e identificadas hasta ese momento con la ayuda de las claves taxonómicas de Morón (1986). Posteriormente las larvas fueron colocadas en recipientes individuales con suelo de la región a la que correspondían y se les dio seguimiento hasta llegar a su etapa adulta donde se corroboró la identificación realizada con anterioridad.

Los adultos encontrados y obtenidos fueron fijados en solución PAMPEL (Morón y Terrón 1988) durante 15 días para posteriormente depositarlos definitivamente en alcohol al 70%. El material se encuentra depositado en la Colección Entomológica del Campo Experimental de Uruapan.

5.5. Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos nativos

Para la estimación de hongos entomopatógenos presentes de manera natural en el suelo, en cada localidad se tomaron 10 muestras de suelo repartidas en una hectárea con 100 gramos cada una, mismos que se llevaron al laboratorio para su análisis. En el laboratorio, dentro de la cámara de flujo laminar, se tamizaron y homogenizaron las diez muestras de suelo eliminando los restos de plantas que existían en ellas, se colocaron 80 gramos de este suelo en un matraz con capacidad de un litro y se le adicionaron 720 ml de agua destilada, además de dos gotas de dispersante (Triton x-100), se agitó la muestra vigorosamente durante un minuto y se tomó con la ayuda de una micro pipeta un microlitro de esta suspensión para colocarla en una caja Petri con medio de cultivo selectivo para hongos entomopatógenos, que además de contener los nutrientes necesarios para su crecimiento (Agar Dextrosa Sabraud, extracto de Malta y extracto de Levadura) contiene algunos antibióticos (Estreptomina, Tetraciclina y Cicloeximida) que inhiben la proliferación de bacterias y hongos que no son de interés. Las cajas Petri se colocaron a temperatura ambiente durante 15 días para el crecimiento de las colonias, transcurrido este tiempo se contaron las colonias de interés (*Beauveria* y *Metarhizium* principalmente). La identificación de los hongos entomopatógenos se realizó con la ayuda del microscopio estereoscópico y bacteriológico, utilizando las claves dicotómicas para la identificación a nivel de especie. La utilización del microscopio bacteriológico fue necesaria para la observación de estructuras como micelio o formas de las esporas que no son apreciadas con un menor aumento. Los datos obtenidos se expresaron en unidades formadoras de colonias para poder determinar la cantidad de conidias por gramo de suelo de la localidad.

5.6. Sobrevivencia de los hongos aplicados en las parcelas de experimentación

Para llevar a cabo la estimación de la sobrevivencia de hongos entomopatógenos, se tomaron 10 muestras de suelo de ambas localidades con 100 gramos cada una, mismos que se llevaron al laboratorio para su análisis. Las muestras se prepararon como se ha descrito antes, solo que en este caso, se colocaron 50 gramos de este suelo en un recipiente con capacidad de 100 ml

donde se le aplicó una concentración conocida de hongos entomopatógenos provenientes de las zonas de estudio y se aplicaron en campo, se homogenizó, se cubrió el recipiente y se colocó a temperatura ambiente. La sobrevivencia del aislamiento se evaluó adicionándole agua destilada a la muestra hasta aforar a 100 ml, agitándose vigorosamente durante un minuto para posteriormente, con la ayuda de una micropipeta, tomar un microlitro de suspensión y se colocarlo en cajas Petri con medio de cultivo selectivo, dejándolas a temperatura ambiente durante 15 días para el crecimiento de las colonias. Transcurrido este tiempo y con la ayuda del microscopio estereoscópico, se contaron las colonias de interés, el resultado del conteo de colonias se expresó en número de esporas por gramo de suelo seco. Esto se determinó a los 7, 30 y 60 días después de la aplicación del hongo.

5.4. Selección de aislamientos en bioensayos

Prueba máxima. La evaluación de la virulencia se realizó mediante la determinación de la “prueba máxima” descrita por Milner (1992) donde se utilizan dosificaciones altas no determinadas de conidias producidas en medio de cultivo PDA (Agar Dextrosa de Papa) o ADS (Agar Dextrosa Sabouraud) en cajas Petri. El experimento consistió en exponer grupos de cinco larvas de *P. vetula* a las esporas del hongo dentro de las cajas Petri para después depositarlas en recipientes individuales con capacidad de 100 gr sin suelo y administrando zanahoria, desinfectada con una solución de hipoclorito, como fuente de alimentación. Esta evaluación permitió excluir aislamientos no virulentos o de baja virulencia y seleccionar únicamente los que alcanzan un umbral de respuesta mayor del 70% de mortalidad durante un período máximo de 28 días. Las variables a considerar fueron: especie de “gallina ciega” y estado de desarrollo, género y especie de hongo entomopatógeno, sitio de origen del hongo, así como la determinación cada cuatro días del porcentaje de mortalidad de larvas con síntomas de la infección, mortalidad asintomática y larvas sanas. El diseño experimental fue completamente al azar con 13 tratamientos (12 aislamientos de *B. bassiana* etiquetados como 27 BbGC, 32BbGC, 28BbGC, 34BbGC, 35BbGC, 33BbGC, 30BbGC, 13BbGC, BbGC54, BbGC42, BbGC5, BbGC49 y un testigo). Cada tratamiento incluyó un total de 15 larvas de tercer estadio avanzado de *P. vetula* colectadas en campo y sometidas a cuarentena cada larva considerada como una repetición. Se realizó análisis de regresión para cada aislamiento con la

finalidad de determinar la tasa de mortalidad, para los análisis estadísticos se utilizó el programa Stat JMP.

5.5. Parcelas experimentales

Para la elección de las parcelas experimentales en las dos localidades se contó con la participación voluntaria de los productores, los cuales apoyaron facilitando sus parcelas para llevar a cabo los experimentos. Las parcelas debieron cumplir las siguientes condiciones:

- a) Que existiera problema con la plaga de “gallina ciega”.
- b) No haber aplicado hongos entomopatógenos con anterioridad.
- c) Disponibilidad del agricultor a no aplicar insecticidas químicos.

En las parcelas se estableció un diseño experimental de bloques al azar con una dimensión de 8 x 10 m (80 m²) por bloque, 320 m² en total por cada tratamiento. Cada tratamiento consistió de cuatro repeticiones. El testigo consistió en cuatro bloques sin la aplicación de ningún tipo de control, químico o biológico (figura 3).

Los aislamientos utilizados fueron: 33BbGC, 26BbGC y 12BbGC pertenecientes al banco de aislamientos del Laboratorio de Entomología del Campo Experimental Uruapan.

El total de la superficie donde se aplicaron hongos como medida de control fue de 1280 m².

Las parcelas donde se aplicaron los hongos fueron sembradas con plantas de maíz criollo.

Todos los aislamientos de *B. bassiana* que se aplicaron fueron obtenidos en parcelas pertenecientes a la Ciénega de Zacapu, el cual se aplicó a razón de 100 kg por hectárea con una concentración que fluctuó entre 1.8 E+08 y 2.9 E+09 de esporas por gramo de arroz.

La aplicación del arroz cubierto de hongo se realizó durante la siembra (San Francisco Uricho, municipio de Pátzcuaro) y antes de la segunda escarda (Cantabria, municipio de Zacapu), en ambas localidades se aplicó planta por planta de manera manual.

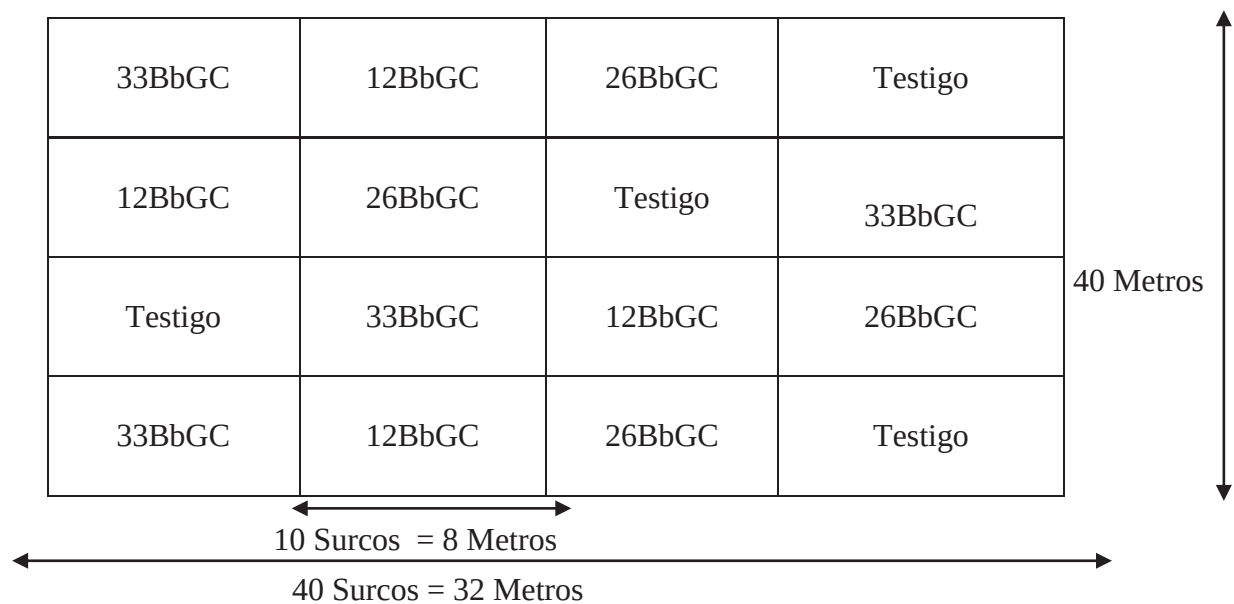


Figura 3. Diseño experimental para la aplicación de hongos entomopatógenos en las parcelas experimentales con tres tratamientos y un testigo.

Las siglas con las que se identifican los diferentes tratamientos corresponden primero, al número consecutivo de hongos aislados que se conservan en banco del laboratorio y enseguida a las siglas de *B. bassiana* (Bb) y gallina ciega (GC).

5.5.1. Producción masiva de hongos entomopatógenos

El arroz utilizado fue de segunda clase (no muy quebrado), se lavó varias veces para eliminar el exceso de almidón, se colocó en una tina agregándole agua hasta cubrirlo, y se aplicó un antibiótico de uso veterinario (BIO-D-TIF PLUS) a razón de dos pastillas por litro de agua utilizado. Posteriormente, el arroz se mezcló, se homogenizó, y se dejó reposar durante media hora, agitándolo cada 10 minutos (a los 10-20 y 30 min.). Pasado este tiempo se eliminó el agua del arroz y se dejó escurrir durante media hora para eliminar el exceso de humedad.

El arroz se colocó en bolsas de polipapel de 30 X 23 cm., depositando aproximadamente 300 gramos de arroz por bolsa. Se cerraron las bolsas y se esterizaron en autoclave durante 15 minutos a una presión de 15 libras.

Preparación del inóculo y siembra del hongo

Esta técnica consistió en aplicar una suspensión de conidios en agua, procediendo de la siguiente manera:

En un matraz con un litro de agua destilada se colocaron 50 mg de antibiótico en polvo (BIO-D-TIF PLUS), y se agregó el dispersante Extravón 40 a razón de 5 gotas por litro o Triton x-100 a razón de 2 gotas por litro. A dos tubos de ensaye con tapa de baquelita se le agregó la solución anterior, se esterilizaron a la misma presión y temperatura que las mencionadas anteriormente, dejándose enfriar el material a temperatura ambiente durante 24 hrs.

Para la inoculación se utilizó una jeringa autorecargable de repetición de uso veterinario previamente esterilizada. En caso de no poder esterilizar la jeringa en autoclave se recomienda desinfectarla con germicida para desinfectar material quirúrgico (KRIT) solución al 12 %. En este caso, la solución se prepara agregando 10 ml de germicida por litro de agua y se aplica sobre un recipiente hasta cubrir completamente la jeringa durante 10 minutos.

En la cámara de flujo laminar se llevó a cabo la inoculación. Se utilizaron cajas Petri con medio de cultivo (PDA) y hongo esporulado (previamente sembrados). Para desprender la mayor cantidad de esporas, las cajas Petri se rasparon con un asa bacteriológica y su contenido se depositó en un matraz con agua destilada (previamente esterilizada) y solución dispersante (Triton x-100). Dicha suspensión de conidios con una concentración de $5.8E+09$ esporas por ml. se agitó frecuentemente durante el tiempo que duro la inoculación de las bolsas con arroz, aplicando 10 ml de solución por bolsa. Para identificar el sitio de inoculación, las bolsas fueron marcadas previamente con marcador de tinta indeleble en el sitio donde se inocularon el cual se cubrió posterior a la inoculación con cinta “masking tape”. Posterior a su inoculación, las bolsas se agitaron con el fin de homogeneizar las esporas. Inmediatamente después las bolsas se llevaron a los cuartos de incubación donde permanecieron durante 4 días (tiempo promedio de colonización del micelio en la totalidad del arroz), después de este tiempo las bolsas fueron abiertas el arroz se colocó en cajas de plástico de 40 x 90cm , las cuales se cerraron herméticamente durante los próximos nueve días. Posteriormente las cajas se abrieron, el arroz se movió dejándolas destapadas para provocar una deshidratación rápida y facilitar la formación de esporas, el arroz se retiró cuando la humedad alcanzó el 17 % (alrededor de los 16 días).

5.6. Determinación de abundancia y mortalidad de larvas a causa de hongos entomopatógenos aplicados en campo

El método consistió en un muestreo de cada unidad experimental (repetición) para lo cual, se tomaron cuatro unidades de muestra (UM) de suelo de cada bloque. La cantidad de suelo en una UM fue de 30 x 30 x 30cm, que es el equivalente a un pie cúbico, este suelo se hizo pasar a través de una malla o se colocó en una lona de un metro cuadrado de color negro para separar y contar las larvas sanas y enfermas que se encontraron en ese sitio, se anotó la cantidad de larvas encontradas. Las larvas aparentemente sanas se separaron en recipientes individuales con suelo de la localidad y se colocaron en una hielera con gel refrigerante para su traslado al laboratorio donde fueron identificadas con la ayuda de claves dicotómicas además de darles seguimiento para encontrar aquellas que presentaran síntomas de estar infectadas por algún tipo de patógeno. Este seguimiento se realizó hasta que el individuo alcanzó la etapa adulta. En los casos donde se encontraron larvas enfermas con síntomas de hongos, éstas fueron colocadas en recipientes individuales de plástico de 50 ml sin suelo para su traslado al laboratorio donde se identificaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico y claves dicotómicas (Morón 1986). Los hongos aislados de estas larvas, se utilizaron para las pruebas de patogenicidad en laboratorio.

5.7. Bioensayos para determinar CL₅₀

Este tipo de bioensayo fue considerado como una segunda etapa en la selección de aislamientos de *B. bassiana* tomando como base su virulencia y CL₅₀ contra larvas de tercer estadio de *P. vetula*. Para este caso fueron seleccionados cuatro aislamientos de *B. bassiana* nativos de la Ciénega de Zacapu Michoacán que habían resultado con alta virulencia en bioensayos de “prueba máxima” etiquetados como 33BbGC, 12BbGC, 26BbGC y 42BbGC. El hongo entomopatógeno se produjo en cajas Petri con medio de cultivo ADS con las cuales se preparó una suspensión “madre” de cada aislamiento y cuatro diluciones al factor de (0.1) para cada aislamiento. Las larvas fueron depositadas en recipientes individuales de 100 ml de capacidad. Se utilizó suelo seco de la región a la que pertenecieran las larvas, sin esterilizar y se proporcionó humedad uniforme (30%) mediante la aplicación de 15 ml de suspensión del hongo en 30 g de suelo. La suspensión se distribuyó en forma homogénea en el suelo por medio de la mezcla manual con agitador metálico. Finalmente, las larvas fueron depositadas

en forma individual en cada recipiente y colocadas en charolas a temperatura ambiente (18-20°C). La primera revisión del ensayo fue a los 30 días y las siguientes cada 15 días hasta completar un total de 105 días. El diseño experimental fue completamente al azar con cinco tratamientos, que fueron los aislamientos antes mencionados, cada uno a cinco concentraciones: 10^{10} ; 10^9 ; 10^8 ; 10^7 ; 10^6 esporas por gramo de suelo. Cada tratamiento incluyó 15 larvas colectadas en campo y sometidas a cuarentena. Cada larva fue considerada como una repetición y se utilizaron dos testigos de 15 larvas cada uno sin aplicación de hongos entomopatógenos. En cada revisión se contabilizó el número de larvas sanas, muertas con síntomas de la infección y asintomáticas. Se realizó análisis de regresión con el programa estadístico JMP para cada aislamiento con el objeto de determinar tasa de mortalidad, y un análisis Probit con un programa de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Especies presentes en las zonas de estudio

En el ejido Cantabria, municipio de Zacapu, Michoacán, durante el lapso comprendido entre junio de 1999 y febrero de 2003 se capturaron un total de 2,568 insectos adultos de la familia Melolonthidae que fueron ubicados en tres subfamilias, seis tribus y 17 especies.

Cuadro 3. Especies de escarabajos de la familia Melolonthidae registrados en Cantabria, Zacapu, Michoacán.

SUBFAMILIA	TRIBU	ESPECIE
Melolonthinae	Macroductylini	<i>Macroductylus</i> sp
		<i>Isonychus arizonensis</i> Howden, 1959
	Melolonthini	<i>Phyllophaga (Phytalus) obsoleta</i> (Blanchard), 1850
		<i>P. (P.)</i> sp1 grupo “Bucephala”
		<i>P. (P.)</i> sp2
		<i>P. (P.)</i> sp3
		<i>P. (Listrochelus)</i> sp
		<i>P. (Phyllophaga) vetula</i> (Horn), 1887
		<i>P. (P.) ravidia</i> (Blanchard), 1850
		<i>P. (P.)</i> sp. Grupo “Blanchardi”
Rutelinae	Anomalini	<i>Anomala inconstans</i> Burmeister, 1844
		<i>Anomala</i> sp
Dynastinae	Cyclocephalini	<i>Cyclocephala</i> sp aff <i>comata</i> Bates
		<i>C.</i> sp aff <i>barrerai</i> Martínez
	Pentodontini	<i>Orizabus isodonoides</i> Fairmaire
		<i>O.</i> sp aff <i>batesi</i> Prell
	Oryctini	<i>Xyloryctes</i> sp aff <i>corniger</i> Sturm, 1844

De los géneros registrados, *Phyllophaga* fue el que obtuvo la mayor abundancia relativa (89%), seguido por *Anomala* y *Cyclocephala* (Figura 4), resultado que coincide con lo registrado por Nájera (1998) para la región templada de Michoacán quien reportó a *Phyllophaga* con el 63% de los especímenes colectados en 11 municipios del estado. Estos datos confirman la importancia del género como integrante del suelo, especialmente en la región de los Altiplanos y del Pacífico mexicano, donde los Melolonthidae incluyen la mayor cantidad de géneros (Morón 2001).

Debido al interés por identificar a los estados adultos de “gallina ciega” con importancia agrícola en Zacapu, las colectas nocturnas efectuadas en Cantabria se llevaron a cabo únicamente durante las primeras lluvias registradas en dicha localidad (mayo) y a la máxima actividad de vuelo de estos insectos, que en términos generales comprendió un lapso de 30 a 45 minutos, entre las 21:00 y las 21:45 horas de acuerdo al horario de verano.

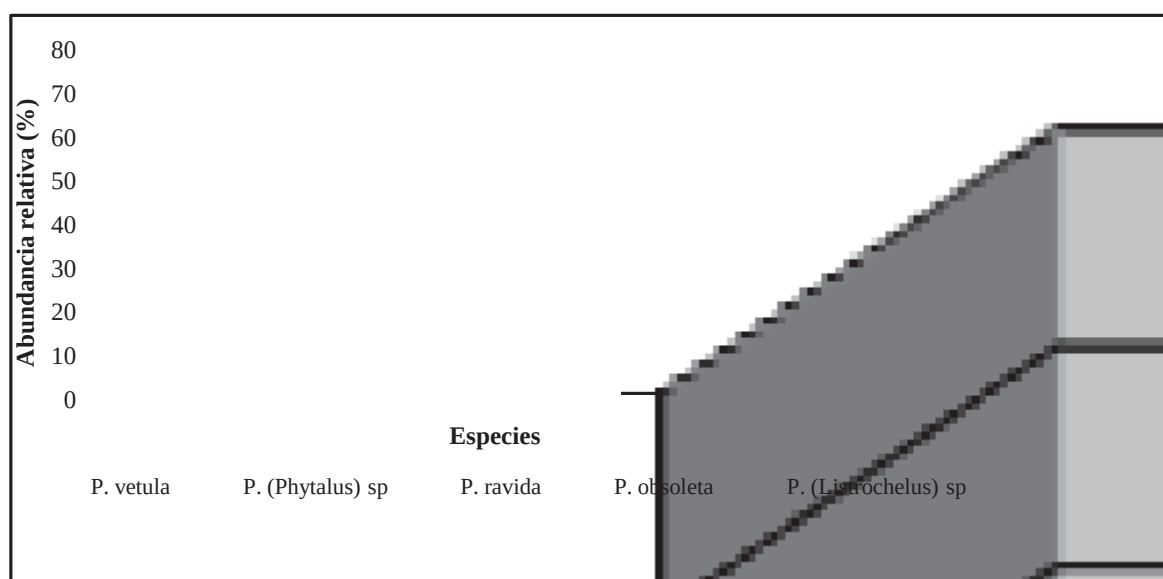


Figura 4.- Abundancia relativa de adultos de *Phyllophaga* en Cantabria municipio de Zacapu, Michoacán (junio 1999 –febrero 2003).

En la parcela experimental de San Francisco Uricho, después del seguimiento de las 200 larvas en laboratorio hasta su etapa adulta, se confirmó que la población de “gallinas ciegas” se encuentra dividida en dos grandes grupos (Figura 5) conformados en su mayoría por *P. ravidia* (65 %) y *P. vetula* (35%), lo que confirma las observaciones anteriores llevadas a cabo en laboratorio con larvas del tercer estadio.

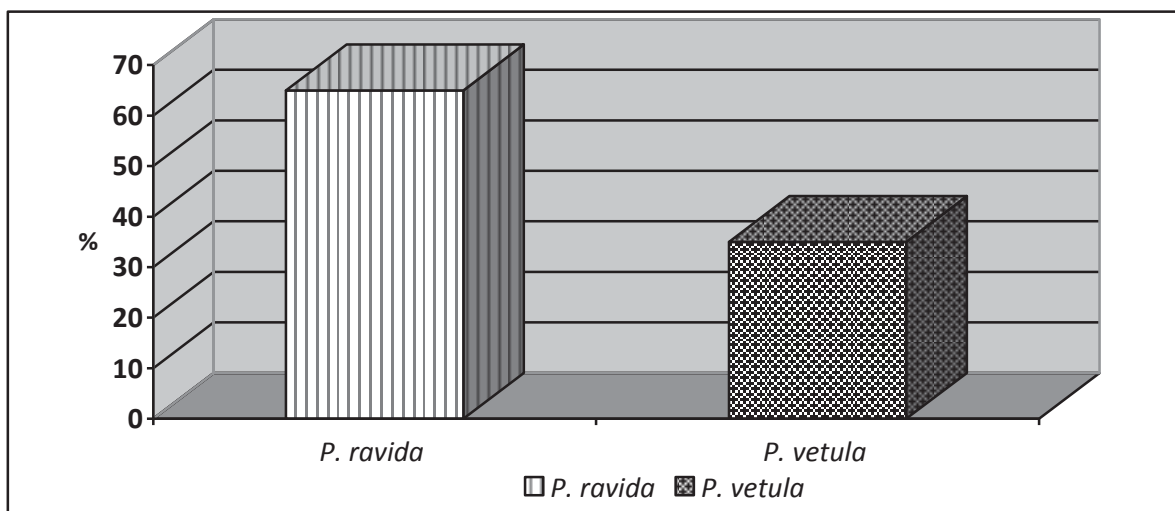


Figura 5. Abundancia relativa de adultos de *Phyllophaga* en la parcela experimental de San Francisco Uricho, Michoacán.

6.2. Estimación estacional de hongos entomopatógenos nativos

En los resultados obtenidos en cuanto a la estimación de la abundancia estacional de hongos entomopatógenos nativos correspondiente a un ciclo anual, se puede resaltar que existió una marcada diferencia entre la cantidad de hongos encontrados en la parcela de San Francisco Uricho y la parcela de Cantabria (Cuadro 4). Esto puede deberse a varias causas ya que las localidades muestran diferencias significativas en cuanto a temperatura, humedad relativa, cantidad de materia orgánica, textura del suelo y manejo de las parcelas, siendo estos factores clave para el desarrollo de hongos entomopatógenos.

El conteo de unidades formadoras de colonias en la parcela de San Francisco Uricho durante un ciclo anual muestra que el 99.19 % de los hongos entomopatógenos encontrados

pertenecen al género de *Beauveria*, mientras que el 0.80 % restante pertenecen a *Metarhizium* (Figura 6), resultados que coinciden con lo mencionado por diversos autores (por ejemplo Shannon 1994) en relación a las condiciones óptimas de desarrollo de *Metarhizium*, el cual presenta una clara tendencia a establecerse y desarrollarse en lugares que presentan temperaturas promedio más elevadas y suelos de textura suaves.

Cuadro 4. Presencia de hongos entomopatógenos nativos en San Francisco Uricho, Pátzcuaro y Cantabria, Zacapu, datos expresados en unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco.

Estación	San Francisco Uricho, Pátzcuaro		Cantabria, Zacapu	
	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>
Primavera	2.15E+05	0.00E+00	3.5E+05	5.8E+05
Verano	2.60E+05	0.00E+00	4.6E+05	6.2E+05
Otoño	3.98E+05	1.65E+03	1.8E+05	3.0E+05
Invierno	2.13E+05	7.18E+03	1.7E+05	2.6E+05

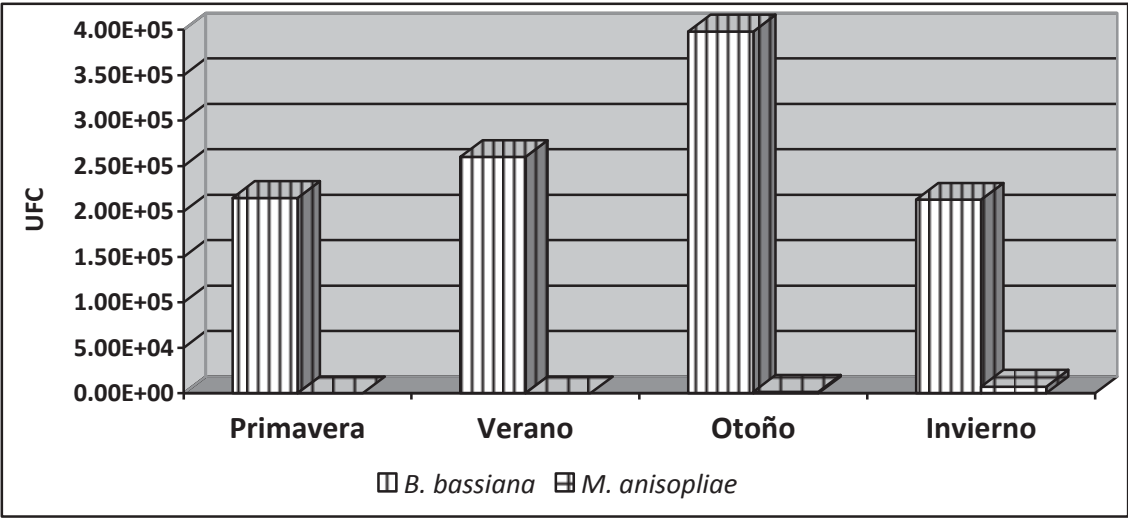


Figura 6. Fluctuación estacional de hongos entomopatógenos nativos en San Francisco Uricho, Pátzcuaro.

En la parcela de Cantabria, Zacapu (Figura 7) la diferencia entre estos dos géneros se inclina hacia una mayor cantidad de hongos del género *Metarhizium* (60.5%), con respecto de *Beauveria* (39.5%).

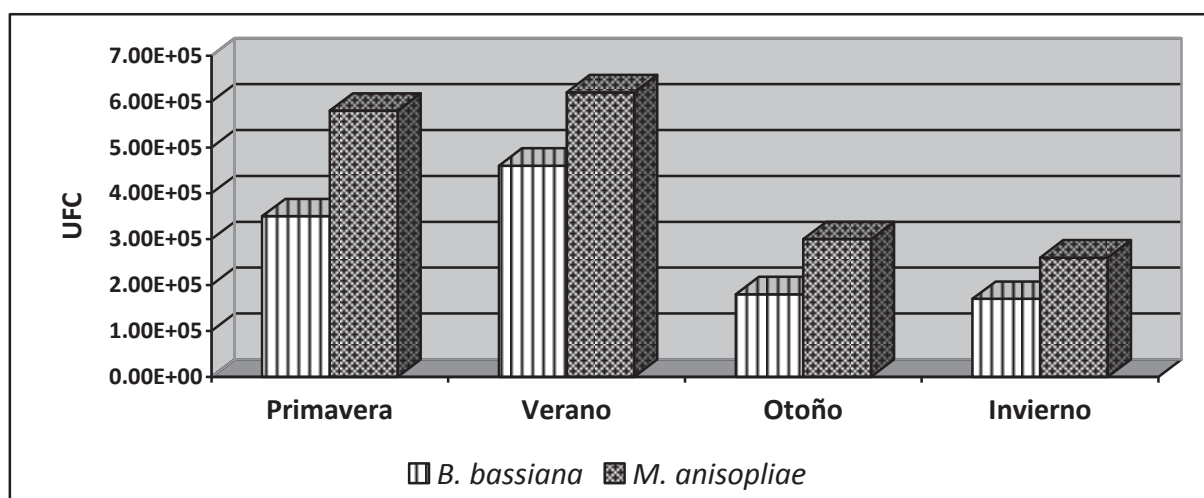


Figura 7. Fluctuación estacional de hongos entomopatógenos nativos en Cantabria, Zacapu.

De las estimaciones anteriores se puede notar que la cantidad de hongos entomopatógenos nativos fue mayor en la Ciénega de Zacapu en comparación con la parcela de San Francisco Uricho, esto puede deberse a factores tales como alta cantidad de materia orgánica presente en la Ciénega de Zacapu, un tipo de suelo mas suave, temperatura mas elevada y mayor cantidad de humedad, además de otros factores, entre ellos los culturales, que en su conjunto pueden favorecer el crecimiento y desarrollo de estos organismos.

Según lo observado en las colectas anteriores (Cuadro 6), cabe destacar que aunque *Beauveria* se encontró en menor proporción en la Ciénega de Zacapu fue la responsable de la mayor parte de infecciones encontradas en campo, lo cual corrobora lo citado por diversos autores (Shannon 1994) en relación a que *Metarhizium* infecta una mayor cantidad de larvas en localidades que presentan temperaturas promedio mas elevadas que las registradas en la Ciénega.

En la parcela de San Francisco Uricho la mayor parte de las larvas infectadas encontradas fueron por causa de *Beauveria*, lo que se puede explicar por encontrarse con mayor abundancia de manera natural, además de que los hongos del género *Metarhizium* es difícil

encontrarlos infectando larvas a temperaturas tan bajas como las presentadas en esta localidad.

6.3. Sobrevivencia de hongos entomopatógenos aplicados en campo

En los organismos patógenos de insectos varia la habilidad que presentan en cuanto a la persistencia en el suelo después de la aplicación en campo. Algunos investigadores (Glare *et al.* 1993) han trabajado con entomopatógenos como *B. bassiana* de la cual reportan una disminución notoria en el número de conidios transcurridos dos meses de la aplicación en campo y hongos como *M. anisopliae* mantienen sus concentraciones de conidios por más de un año después de la aplicación en campo.

Con el objetivo de entender el comportamiento del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y facilitar el análisis de su efecto sobre la “gallina ciega” bajo condiciones de campo, se determinó la sobrevivencia de los hongos bajo condiciones de laboratorio. La sobrevivencia se determinó a los 7, 30 y 60 días después de su inoculación en suelo tipo “gris” de acuerdo a la clasificación campesina de tierras. En el Cuadro 5 se muestran los resultados de la evaluación. Como puede observarse, los aislamientos evaluados mostraron diferentes concentraciones originales, siendo el 33BbGC el de mayor concentración de esporas disminuyendo de manera gradual conforme transcurrían los días hasta llegar a una concentración 100 veces menor a la aplicada originalmente. El aislamiento marcado como 26BbGC tuvo una concentración inicial similar al anterior aislamiento, sin embargo, su persistencia en el suelo fue menor a este último ya que a los 60 días se registraron concentraciones inferiores, lo que puede traducirse en un bajo nivel de efectividad mostrado en campo, ya que el éxito o fracaso de un entomopatógeno depende en gran medida del establecimiento y sobrevivencia del inóculo. La prueba de sobrevivencia del tercer aislamiento marcado como 12BbGC no se llevó a cabo por contaminación del medio.

Cuadro 5. Sobrevivencia de hongos entomopatógenos en un suelo “gris” bajo condiciones de laboratorio. Las concentraciones se presentan en unidades formadoras de colonias (UFC)/gr de suelo seco.

Aislamiento	Concentración original	Numero de días		
		7	30	60
26 BbGC	2.60E+07	2.34E+05	1.98E+05	1.59E+04
33 BbGC	3.50E+07	4.14E+05	1.44E+05	7.21E+04

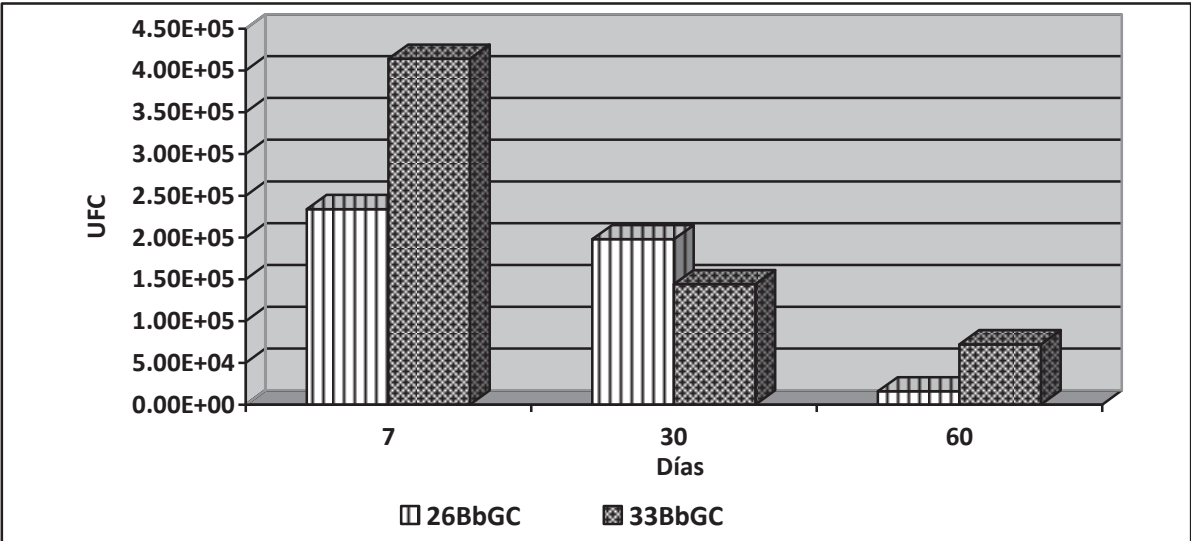


Figura 8. Sobrevivencia de hongos entomopatógenos aplicados en campo en la parcela escolar de Cantabria municipio de Zacapu, Michoacán en condiciones de laboratorio.

6.4. Selección de aislamientos

Bioensayo de prueba máxima. Se probaron 12 aislamientos de *B. bassiana* nativos de Zacapu, Michoacán los cuales mostraron diferente nivel de virulencia contra larvas de tercer estadio avanzado de *P. vetula*. De los aislamientos evaluados cinco registraron 100% de mortalidad de larvas (Figura 9 y 10), el 27BbGC y 32BbGC a los 7 días de iniciado el experimento, mientras que el 28BbGC, 34BbGC y 35BbGC lo alcanzaron a los 10 días. Los aislamientos 33BbGC y 30BbGC registraron 93.3% de mortalidad a los siete y 13 días respectivamente, por otra parte, el 13BbGC y BbGC54 registraron 86.7% y 80% de mortalidad a los 10 y 7 días respectivamente. En un nivel de virulencia menor se ubicaron los aislamientos BbGC42 y

BbGC50 los cuales registraron 60% de mortalidad a los 13 días de iniciado el experimento. El aislamiento que registró menor porcentaje de mortalidad (53.3%) fue el BbGC49 a los 13 días de iniciada la evaluación. No se observó mortalidad en el testigo, lo que nos permitió confiar en los resultados obtenidos.

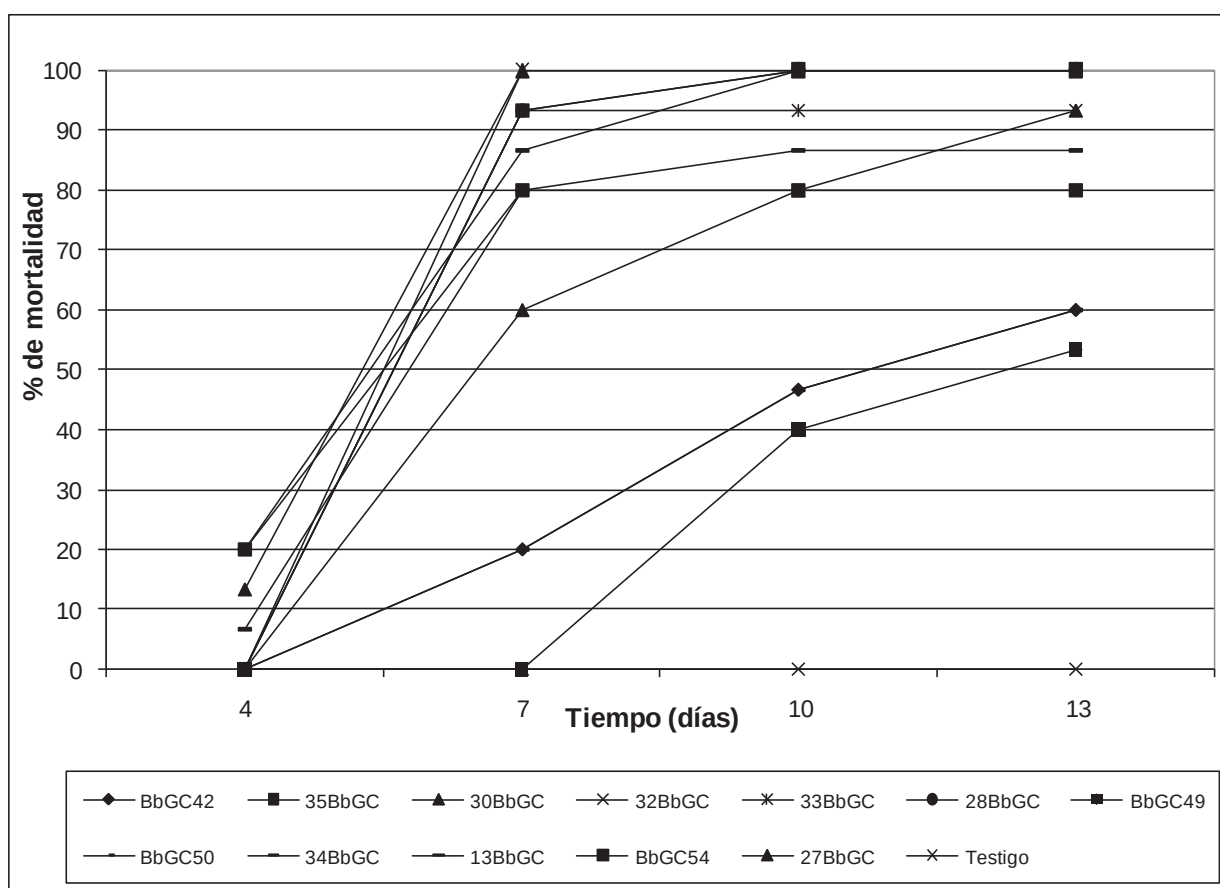


Figura 9. Mortalidad acumulada de larvas de tercer estadio avanzado de *P. vetula* por aislamientos de *B. bassiana* en ensayo de “prueba máxima”.

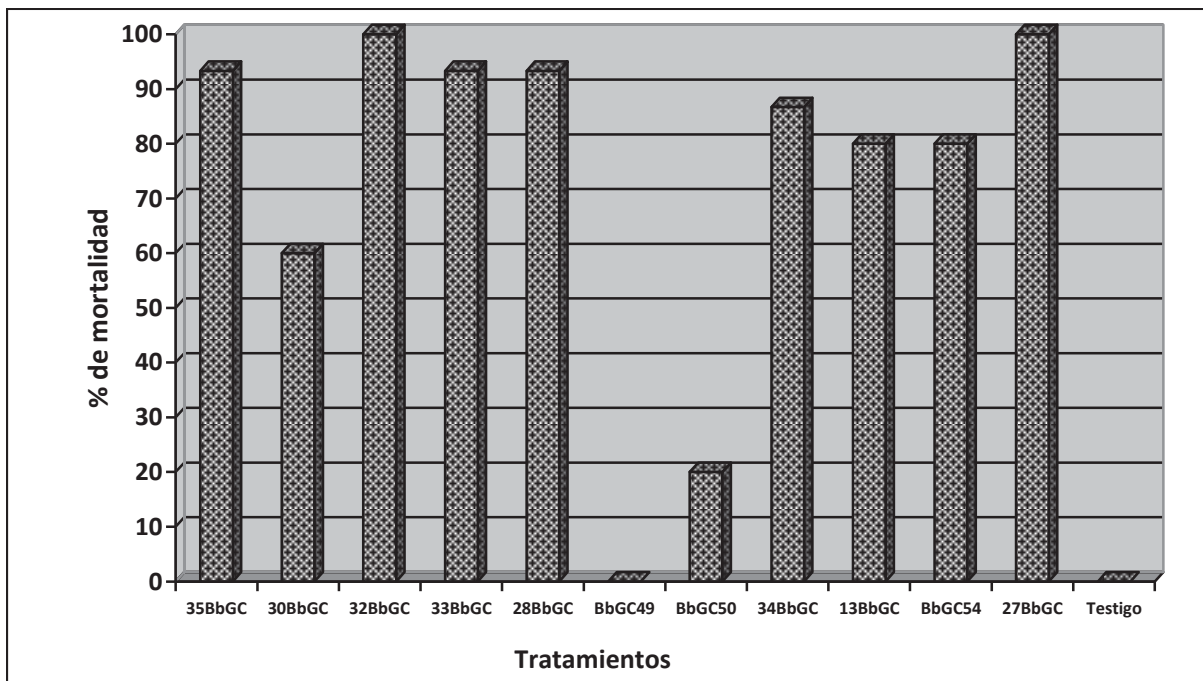


Figura 10.- Mortalidad acumulada de larvas de tercer estadio avanzado de *P. vetula* por aislamientos de *B. bassiana* en ensayo de “prueba máxima” a los 7 días.

La tasa de mortalidad en larvas ocasionada por cada aislamiento expresada como la pendiente de acuerdo a modelos de regresión lineal se muestra en el Cuadro 6. Los resultados del experimento confirman el potencial que tienen algunos de los aislamientos nativos de *B. bassiana* para el control de *P. vetula* y contrastan con los publicados por Rodríguez del Bosque *et al.* (2003) quienes registraron niveles de mortalidad por debajo del 50% ocasionados por aislamientos de *B. bassiana* contra larvas de tercer estadio de *Phyllophaga crinita*. No obstante, es necesario confirmar dichos resultados en pruebas bajo dosificaciones controladas de laboratorio utilizando suelo de la región como sustrato, para posteriormente evaluar bajo condiciones de campo.

Cuadro 6. Parámetros de regresión lineal de aislamientos de *B. bassiana* probados contra larvas de tercer estadio avanzado de *P. vetula*.

Aislamiento	Intersección (a)	Pendiente (b)	r 0.05, 8 gl	r ²
35BbGC	-13.55	10.22	0.806**	0.65
28BbGC	-13.56	10.22	0.806**	0.65
32BbGC	-10.00	10.00	0.774**	0.60
30BbGC	-26.66	10.00	0.938**	0.88
33BbGC	-9.33	9.33	0.774**	0.60
27BbGC	4.66	8.66	0.774**	0.60
34BbGC	4.88	8.44	0.848**	0.72
13BbGC	-4.88	8.22	0.812**	0.66
BbGC42	-26.88	6.88	0.989**	0.98
BbGC50	-26.88	6.88	0.989**	0.98
BbGC49	-33.33	6.66	0.938**	0.88
BbGC54	14.0	6.00	0.774**	0.60
Testigo		0.00		

*estadísticamente significativo

**altamente significativo

6.5. Muestreo de larvas en las parcelas experimentales

Primer muestreo de larvas

El primer muestreo de larvas en las dos parcelas experimentales se realizó 3 y 5 meses después de la siembra en San Francisco Uricho municipio de Pátzcuaro y Cantabria municipio de Zacapu, respectivamente, en ambas parcelas se tomaron cuatro muestras (cepellones de un pie cúbico) en cada unidad experimental dando un total de 16 muestras por cada aislamiento aplicado. En cada muestra se revisó el suelo en búsqueda de larvas sanas, enfermas, condición de la raíz y colonización de los hongos aplicados.

En este primer muestreo en ninguna de las dos parcelas se encontraron larvas enfermas en campo con síntomas de hongos entomopatógenos (Cuadro 7). Sin embargo en gran parte de las muestras obtenidas existió colonización por parte de los aislamientos aplicados, encontrándose que para la parcela de San Francisco Uricho el aislamiento 12BbGC mostró que en el 100% de las muestras revisadas estaba presente, el 33BbGC un 75%, el 26BbGC un 50% y por último el testigo donde no se encontró colonización por parte de hongos en ninguna de las muestras revisadas (Figura 11). Hasta esta fecha ninguno de los tratamientos con hongos reflejó una diferencia estadísticamente significativa ($P(T \leq t)$ Alfa: 0.05) en cuanto al número de larvas enfermas y sanas con respecto al testigo.

Cuadro 7. Promedio de larvas y colonización del suelo en las parcelas experimentales durante el primer muestreo realizado en San Francisco Uricho municipio de Pátzcuaro.

Aislamientos	San Francisco Uricho, Pátzcuaro		
	Promedio de larvas sanas por cepellón	Promedio de larvas enfermas por cepellón	% de muestras con colonización
33BbGC	8.4	0	75
12BbGC	8.1	0	100
26BbGC	9.3	0	50
Testigo	7.4	0	0

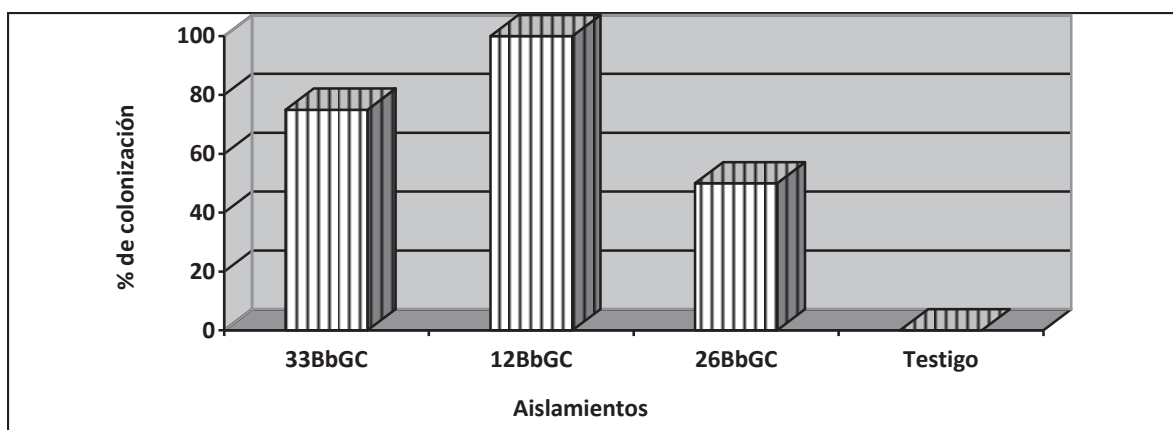


Figura 11. Colonización del suelo por aislamientos de *Beauveria bassiana* aplicados en campo en la localidad de San Francisco Uricho municipio de Pátzcuaro, Mich.

En la parcela de Cantabria (Cuadro 8), los hongos aplicados mostraron una mejor adaptación a las condiciones del suelo logrando alcanzar colonizaciones superiores al 80%. Dos de los aislamientos aplicados (12BbGC y 33BbGC) estuvieron presentes en el 100% de las muestras obtenidas, mientras que el 26BbGC alcanzó el 80% y el testigo, al igual que en la parcela de San Francisco. Uricho, no presento colonización en ninguna de las muestras revisadas (Figura 12).

Cuadro 8. Promedio de larvas y colonización del suelo en las parcelas experimentales durante el primer muestreo realizado en Cantabria, municipio de Zacapu.

Aislamientos	Cantabria, Zacapu		
	Promedio de larvas sanas	Promedio de larvas enfermas	% de muestras con colonización
33BbGC	2.8	0	100
12BbGC	4.5	0	100
26BbGC	3.2	0	80
Testigo	4.7	0	0

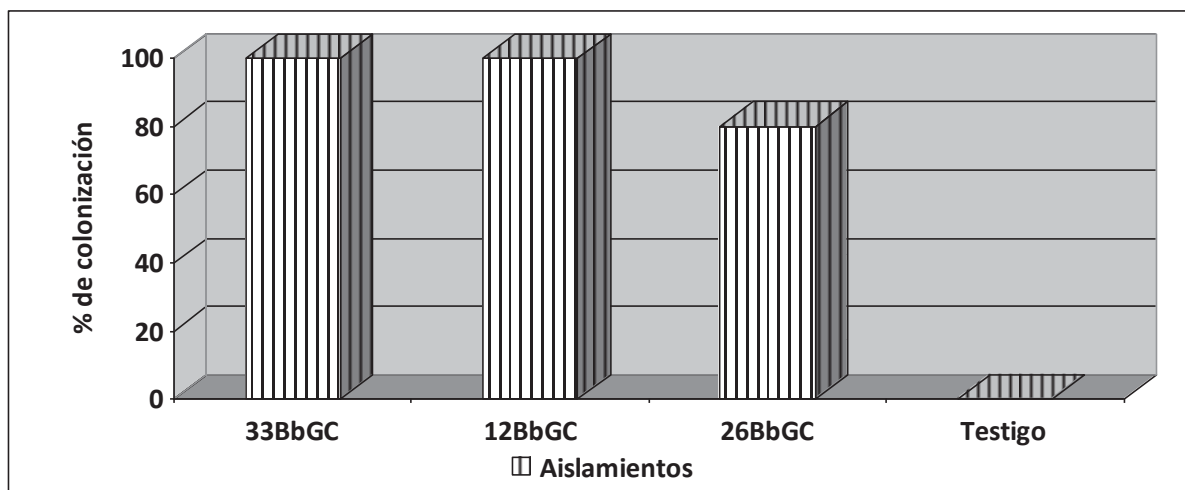


Figura 12 Colonización del suelo por aislamientos de *Beauveria bassiana* aplicados en campo en la localidad de Cantabria, municipio de Zacapu, Mich.

Ninguno de los tratamientos con hongos reflejó una diferencia estadísticamente significativa ($P(T \leq t)$ Alfa: 0.05) en cuanto al número de larvas enfermas y sanas con respecto al testigo.

Colecta y seguimiento de larvas en laboratorio

Durante este primer muestreo se colectaron larvas del segundo estadio de *Phyllophaga*, las cuales fueron trasladadas al laboratorio donde se les colocó en recipientes individuales con suelo de la localidad a la que pertenecían y alimento fresco a base de zanahoria. De estas larvas colectadas se eligieron 30 individuos aparentemente sanos de cada tratamiento, con la finalidad de darles seguimiento hasta su etapa adulta. Las larvas fueron revisadas cada tercer día procurando molestarlas en lo más mínimo, cambiando el alimento por fresco y anotando el estado de la larva. Durante este seguimiento de larvas se pudo observar que algunas presentaban síntomas de hongos entomopatógenos lo que permite suponer que posiblemente venían infectadas desde el campo.

El porcentaje de larvas enfermas con síntomas de *B. bassiana* procedentes de la parcela de San Francisco Uricho fue relativamente bajo, alcanzando un máximo de 30% en donde se aplicó el aislamiento 26BbGC, además de ser el único aislamiento que alcanzó una diferencia estadística significativa ($P(T \leq t)$ 0.0029, Alfa: 0.05) con respecto al testigo, un 20% con 33BbGC, ($P(T \leq t)$ 0.022, Alfa: 0.05) y 13.3% con 12BbGC, ($P(T \leq t)$ 0.08, Alfa: 0.05) siendo el porcentaje más bajo el mostrado por el testigo con un 3.3% de infecciones (Cuadro 9).

Cuadro 9. Seguimiento de 30 larvas de *Phyllophaga* colectadas en San Francisco Uricho, en condiciones de laboratorio.

Aislamiento	Larvas sanas	Larvas muertas asintomáticas	Larvas muertas con síntomas de <i>Bb</i>
12BbGC	23	3	4
26BbGC	17	4	9
33BbGC	16	8	6
Testigo	23	6	1

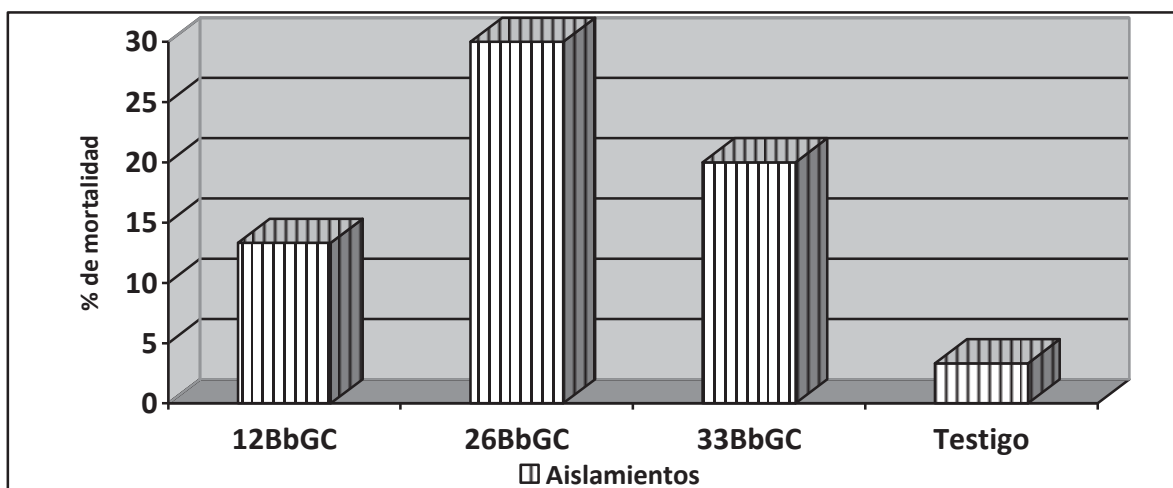


Figura 13. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Phyllophaga* en laboratorio durante el seguimiento de 30 larvas colectadas en las parcelas donde se aplicaron los tratamientos de control biológico en la localidad de San Francisco Uricho.

En la parcela de Cantabria, municipio de Zacapu durante el seguimiento de 30 larvas, existió un mayor número de larvas infectadas por *B. bassiana* en comparación con la parcela de San Francisco Uricho, llegando a presentar un máximo de 46.7% de mortalidad en las larvas obtenidas del tratamiento 12BbGC, 36.7% en el 33BbGC, y 26.7% donde se aplicó el 26BbGC, siendo el porcentaje más bajo el obtenido por el testigo con un 3.3% de infección (Cuadro 10).

Cuadro 10. Seguimiento de 30 larvas de *Phyllophaga* colectadas en Cantabria Zacapu, en condiciones de laboratorio.

Aislamiento	Larvas sanas	Larvas muertas asintomáticas	Larvas muertas con síntomas de <i>B. bassiana</i>
12BbGC	3	13	14
26BbGC	7	15	8
33BbGC	7	12	11
Testigo	13	16	1

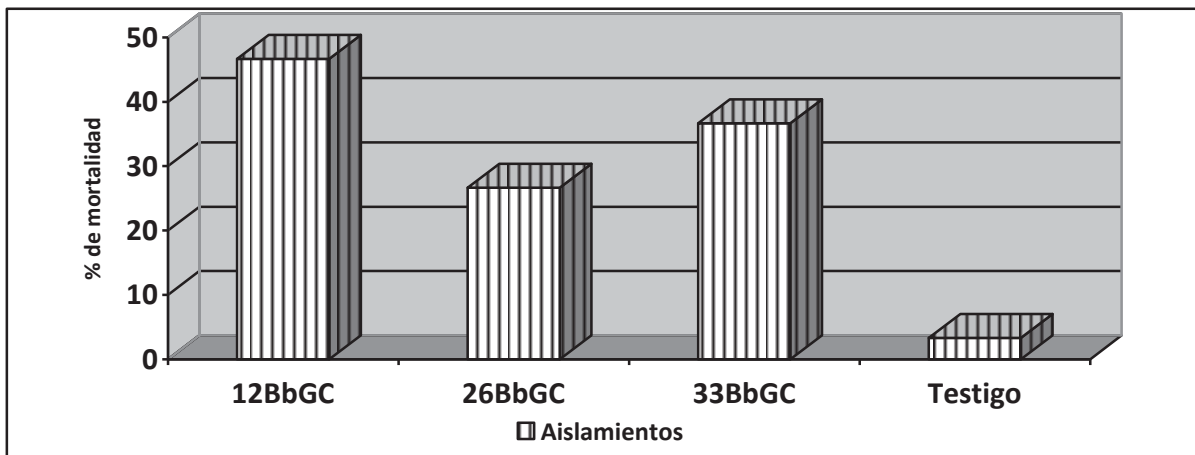


Figura 14. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Phyllophaga* en laboratorio durante el seguimiento de 30 larvas colectadas en las parcelas donde se aplicaron los tratamientos de control biológico en la localidad de Cantabria, municipio de Zacapu.

En todos los tratamientos en donde se aplicaron hongos las diferencias mostradas en relación al testigo fueron estadísticamente significativas ($P(T \leq t)$ Alfa: 0.05).

Segundo muestreo de larvas

El segundo muestreo de larvas en las parcelas experimentales se llevó a cabo transcurridos 7 y 9 meses después de la siembra en San Francisco Uricho, Pátzcuaro y Cantabria, Zacapu, respectivamente. Al igual que en el primer muestreo, en ambas parcelas se tomaron cuatro muestras (cepellones) en cada unidad experimental dando un total de 16 muestras por cada aislamiento aplicado.

En cada muestra se revisó el suelo en búsqueda de larvas sanas, enfermas, condición de la raíz y colonización de los hongos aplicados.

En este segundo muestreo realizado en la parcela de San Francisco Uricho se pudo observar mortalidad a causa de dos de los tres tratamientos aplicados con *B. bassiana* como agente de control.

Los tratamientos que presentaron mayor mortalidad de larvas en campo fueron los aislamientos etiquetados como 33BbGC y 12BbGC con un 23.8 y 8.3% de mortalidad respectivamente, mientras que el aislamiento marcado como 26BbGC y el testigo no presentaron ninguna larva muerta por la acción de hongos entomopatógenos (Cuadro 11). En este caso la colonización por parte de los aislamientos aplicados mostró porcentajes mas bajos que en el primer muestreo, esto debido a factores físico-químicos como son temperatura y humedad principalmente, ya que este segundo muestreo se realizó al menos 7 meses de transcurrido el periodo de lluvias, lo que coincide con lo reportado por diversos autores (Shannon 1994) que establecen estas dos condiciones del suelo como esenciales para el desarrollo de los hongos.

Los aislamientos que lograron la mayor colonización del suelo fueron los marcados como 33BbGC y 12BbGC con un 37.5% seguido del 26BbGC con un 31.25% y por último el testigo que en esta ocasión sí se encontraron hongos entomopatógenos en las muestras obtenidas, lo que indica la presencia natural de *B. bassiana* en esta parcela (Figura 15).

Cuadro 11. Segundo muestreo de larvas en San Francisco Uricho, Pátzcuaro.

Tratamientos	San Francisco Uricho, Pátzcuaro			
	Promedio de larvas sanas por cepellón	Promedio de larvas enfermas por cepellón	% de mortalidad	% de colonización
33BbGC	1	0.31	23.8	37.5
12BbGC	0.68	0.06	8.3	37.5
26BbGC	1	0	0	31.25
Testigo	0.68	0	0	12.5

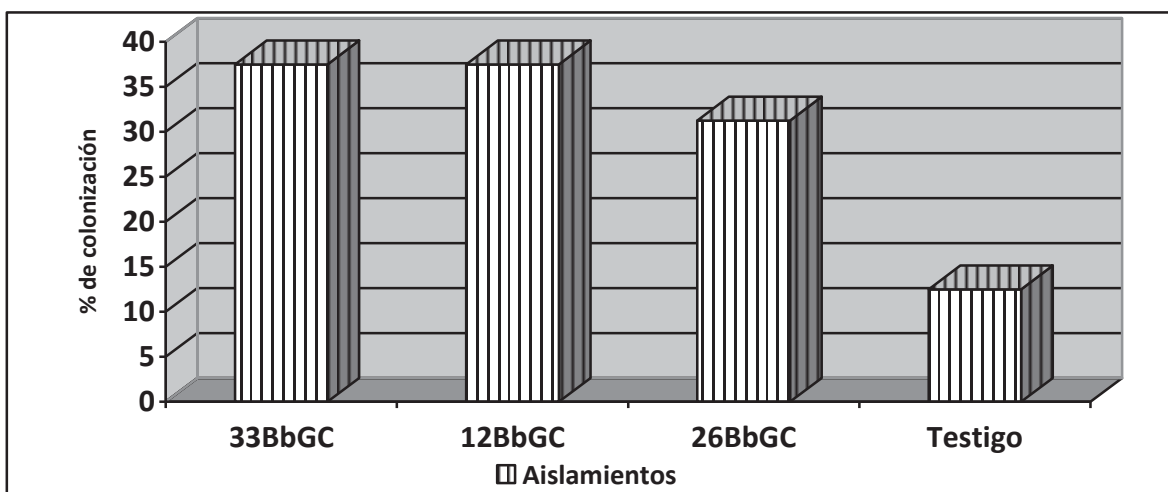


Figura 15. Colonización de *B. bassiana* en San Francisco Uricho, Pátzcuaro.

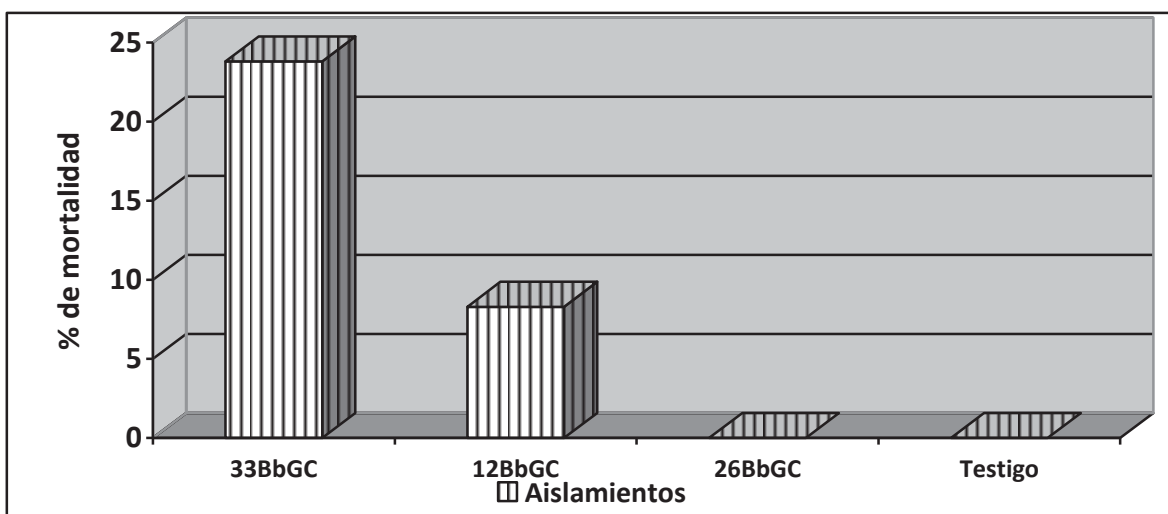


Figura 16. Porcentaje de mortalidad de *B. bassiana* en San Francisco Uricho, Pátzcuaro.

La mortalidad a causa de la aplicación de hongos entomopatógenos se hizo más evidente en la parcela de Cantabria municipio de Zacapu, donde uno de los aislamientos aplicados (12BbGC) causó una mortalidad en campo del 38.5 % lo que puede colocar a este aislamiento como un agente promisorio para el control de esta plaga en esta región y susceptible a ser probado como agente microbiano en otras localidades que presenten condiciones similares a los de la Ciénega de Zacapu, los aislamientos marcados como 33BbGC y 26BbGC mostraron porcentajes de mortalidad de 23.1 y 20 % respectivamente mientras que el testigo presentó

una mortalidad del 2.9 %. Estadísticamente el tratamiento que logró diferencias significativas ($P(T \leq t) 0.033$, Alfa: 0.05) con respecto al testigo fue el marcado como 12BbGC.

En la parcela de Cantabria (Cuadro 12), los hongos aplicados mostraron una mejor adaptación a las condiciones del suelo logrando en uno de los casos alcanzar colonizaciones superiores al 80%. Uno de los aislamientos aplicados (12BbGC) estuvo presente en el 93.75% de las muestras obtenidas, mientras que el 33BbGC y 26BbGC alcanzaron el 68 y 43% respectivamente. En esta ocasión el testigo al igual que en la parcela de San Francisco Uricho, presentó una colonización del 12.5% en las muestras revisadas lo que indica la presencia de *B. bassiana* de manera natural en la parcela (Figura 16).

Cuadro12. Segundo muestreo de larvas en Cantabria, municipio de Zacapu.

Tratamientos	Cantabria, Zacapu			
	Promedio de larvas sanas por cepellón	Promedio de larvas enfermas por cepellón	% de mortalidad	% de colonización
33BbGC	1.25	0.38	23.1	68.7
12BbGC	1	0.63	38.5	93.75
26BbGC	1.25	0.31	20	43.75
Testigo	2.06	0.06	2.9	12.5

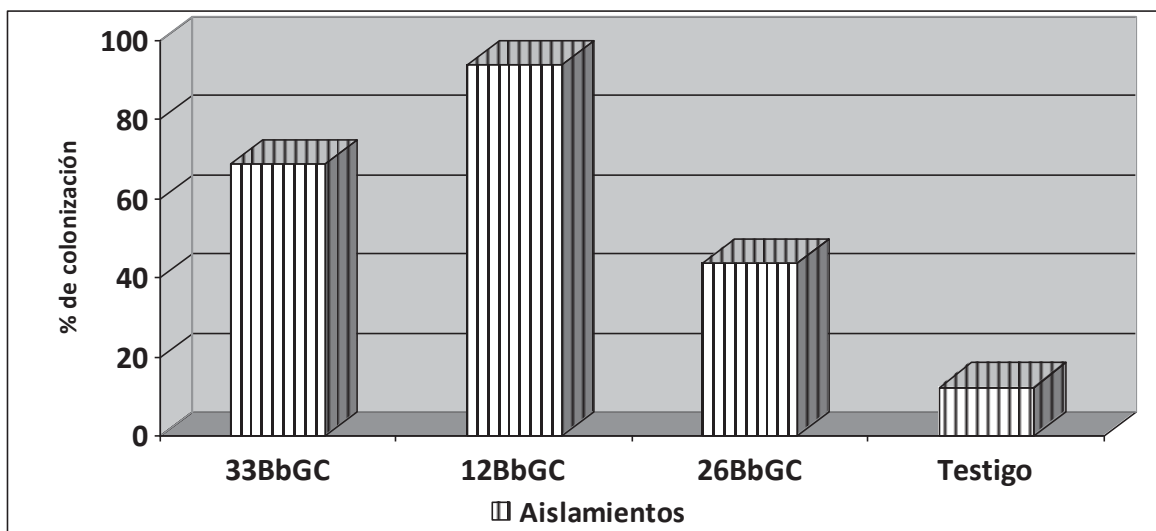


Figura 17. Colonización de *B. bassiana* en Cantabria, municipio de Zacapu.

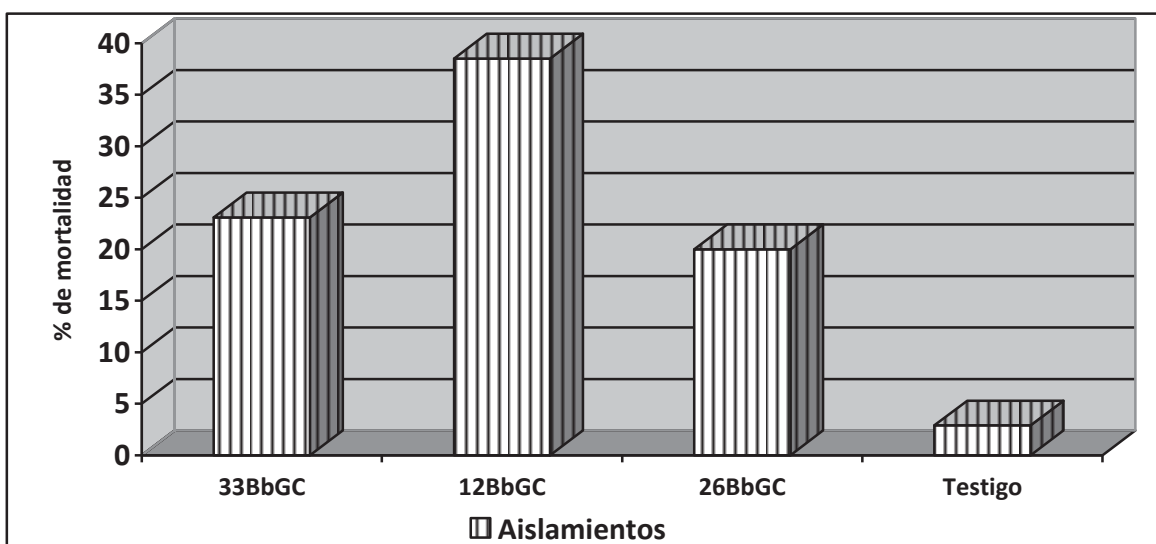


Figura18. Porcentaje de mortalidad *B. bassiana* en Cantabria, municipio de Zacapu.

Colecta y seguimiento de larvas en laboratorio

Durante el segundo muestreo se colectaron larvas del tercer estadio avanzado de *Phyllophaga*, las cuales fueron trasladadas al laboratorio donde se les colocó en recipientes individuales con suelo de la localidad a la que pertenecen y alimento fresco, de estas larvas colectadas se eligieron 25 individuos aparentemente sanos de cada tratamiento, con la finalidad de darles seguimiento hasta su etapa adulta. Las larvas fueron revisadas cada tercer día procurando molestarlas en lo más mínimo, durante esta etapa ya no es necesario alimentar las larvas ya que durante este estadio se encuentran en su celda preparándose a pupar. Cada tercer día se registró el estado de la larva.

Durante este seguimiento de larvas se pudo observar que algunas presentaban síntomas de hongos entomopatógenos lo que permite suponer que posiblemente venían infectadas desde el campo.

El porcentaje de larvas enfermas con síntomas de *B. bassiana* en la parcela de San Francisco Uricho (Cuadro 13) alcanzó un máximo de 32% en larvas colectadas donde se aplicó el aislamiento 12BbGC, un 28% donde se aplicó 33BbGC, 20% con 26BbGC, siendo el porcentaje más bajo el mostrado por el testigo sin ninguna larva enferma con síntomas de hongos. Todos los tratamientos obtuvieron diferencias estadísticas significativas ($P(T \leq t)$ Alfa: 0.05) con respecto al testigo en cuanto a larvas muertas por *B. bassiana*.

Cuadro 13. Seguimiento de 25 larvas de *Phyllophaga* colectadas en San Francisco Uricho, municipio de Pátzcuaro en condiciones de laboratorio.

Aislamiento	Larvas sanas	Larvas muertas asintomáticas	Larvas muertas con síntomas de <i>Bb</i>
12BbGC	8	9	8
26BbGC	12	8	5
33BbGC	15	3	7
Testigo	22	3	0

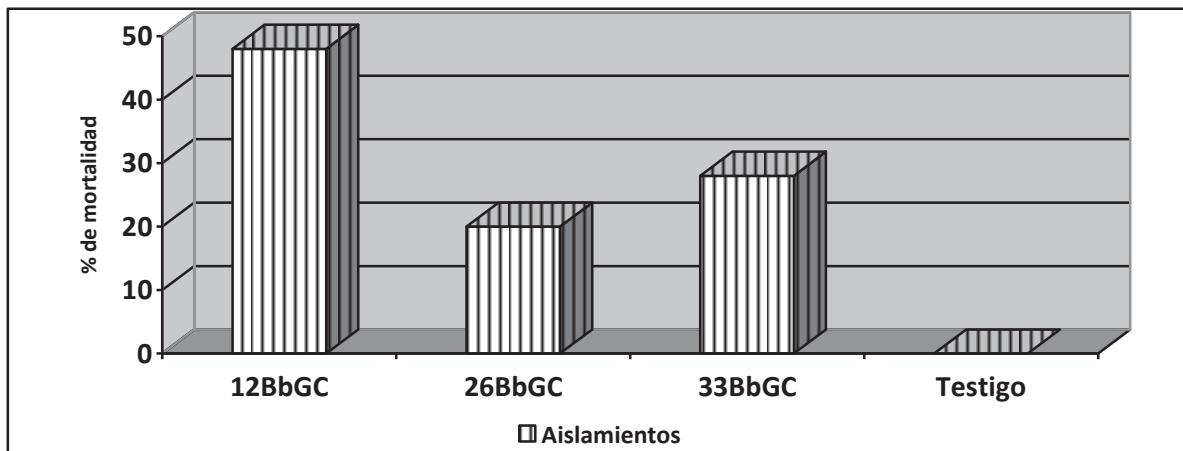


Figura 19. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Phyllophaga* en laboratorio durante el seguimiento de 25 larvas colectadas en la localidad de San Francisco Uricho, municipio de Pátzcuaro.

En la parcela de Cantabria, Zacapu durante el seguimiento de 25 larvas en laboratorio, el número de larvas infectadas por *B. bassiana* fue muy similar al mostrado en San Francisco Uricho, (Cuadro14) llegando a presentar un máximo de 44% de mortalidad en las larvas obtenidas del tratamiento 12BbGC, un 40% en el 33BbGC, y un 28% donde se aplicó el 26BbGC, siendo el porcentaje más bajo el obtenido por el testigo con un 4% de infección. Todos los tratamientos obtuvieron diferencias estadísticas significativas ($P(T \leq t)$ Alfa: 0.05) con respecto al testigo en cuanto a larvas muertas por *B. bassiana*.

Cuadro 14. Seguimiento de 25 larvas de *Phyllophaga* colectadas en Cantabria Zacapu, en condiciones de laboratorio.

Aislamiento	Larvas sanas	Larvas muertas asintomáticas	Larvas muertas con síntomas de <i>Bb</i>
12BbGC	9	5	11
26BbGC	17	1	7
33BbGC	13	2	10
Testigo	22	2	1

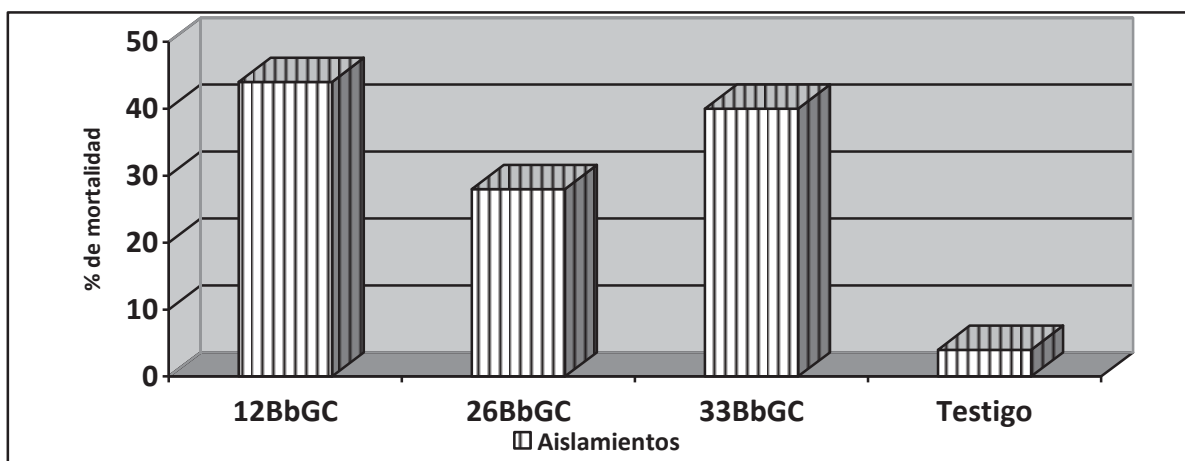


Figura 20. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Phyllophaga* en laboratorio durante el seguimiento de 25 larvas colectadas en la localidad de Cantabria, municipio de Zacapu.

6.5.1. Producción masiva de hongos entomopatógenos

Para llevar a cabo la aplicación de hongos como medida de control biológico en las dos parcelas experimentales, se produjo un total de 120 Kg de arroz inoculado, repartidos en tres aislamientos con la clave: 12BbGC, 33BbGC y 26BbGC (Cuadro 9), con lo cual se logró cubrir en su totalidad la superficie destinada a los experimentos.

En base al sistema de producción desarrollado este ciclo que consistió en la utilización de cajas de plástico para el secado, se logró mejorar la producción en cuanto a la cantidad de esporas, la viabilidad de las mismas y su estabilidad, lo cual permitió almacenar el arroz inoculado un mayor tiempo reduciendo el riesgo de contaminación y regeneración de las esporas.

6.5.1.1. Concentración de esporas

La concentración de esporas nos permite determinar el número de esporas por unidad de peso o volumen existentes en una formulación y sirve de base para establecer la dosificación del producto, con estos datos es posible saber la cantidad de arroz que se tendría que aplicar por hectárea para el manejo de la plaga. La concentración de los aislamientos producidos este ciclo fluctuó entre $1.8E+08$ y $2.9E+09$ esporas por gramo de arroz, la cual es considerada

dentro de los parámetros de calidad aceptados por el Centro de Nacional de Referencia de Control Biológico perteneciente a la SAGARPA.

6.5.1.2. Germinación

La germinación de las esporas de los tres aislamientos alcanzaron porcentajes altos, aspecto muy importante, ya que esto determina la viabilidad del hongo en el producto, en este caso los tres aislamientos superaron el 80% de viabilidad a las 17 horas.

Se aplicó una dosis equivalente a 100 Kg de arroz por hectárea, la cual es considerada como una dosis alta, pero que permite elegir los aislamientos que mejor se adapten y sean eficientes en cada sitio, para posteriormente definir la dosis ideal en base a la mortalidad, además de tomar en cuenta que el tipo de control aplicado debe ser económicamente rentable.

Cuadro 15. Parámetros de control de calidad obtenidos en la producción de hongos entomopatógenos con base en cepas de *B. bassiana* para su aplicación en campo contra “gallina ciega”.

Fecha de producción	Clave del aislamiento	Kg. de arroz utilizados	Concentración de esporas por gramo de arroz	% de Viabilidad
22/05/06	33BbGC	20	3.4 E+08	91
23/05/06	33BbGC	20	1.8 E+08	90.66
24/05/06	12BbGC	20	3.5 E+08	82.6
25/05/06	12BbGC	20	2.9 E+09	95
29/05/06	26BbGC	20	2.3 E+08	91.33
30/05/06	26BbGC	20	2.9 E+08	89

6.6. Bioensayo con concentraciones determinadas.

Las pruebas anteriores son un buen referente para la elección de aislamientos promisorios y candidatos a ser utilizados en campo, pero antes de esto deben ser sometidos a pruebas con dosificaciones controladas donde son colocados en suelo no estéril, expuestos a la

competencia, antagonismo y acción de factores climáticos y físico-químicos, donde deberán reafirmar su elección como agentes de control microbiano.

En los cuatro aislamientos evaluados los mayores porcentajes de mortalidad (> al 50%) se registraron en dosis de 10^{10} esporas por gramo de suelo a los 100 días de iniciado el experimento (Figura 20). El mayor porcentaje de mortalidad (93.33%) se obtuvo con el aislamiento 33BbGC el cual registró el mismo porcentaje de larvas muertas en el ensayo de “prueba máxima”, demostrando consistencia en capacidad de infección y mortalidad bajo condiciones completamente diferentes. Los aislamientos 12BbGC y 42BbGC registraron mortalidad intermedia (73.33% y 66.67% respectivamente), mientras que el 26BbGC obtuvo el más bajo porcentaje de mortalidad (53.33%). Debido a que una parte de los resultados del experimento se encuentran en proceso de análisis, sólo es posible señalar que la estimación del TL_{50} para todos los aislamientos se ubica entre los 75 y 100 días. No obstante, se considera que dicho lapso, registrado bajo condiciones de laboratorio, es suficientemente prolongado como para evitar el daño que ocasionan las larvas de *Phyllophaga* durante el ciclo de cultivo del maíz, por lo que será imprescindible incrementar la dosis de inóculo con el objeto de alcanzar niveles de control que reduzcan significativamente la población de larvas en el campo, y lleguen a niveles económicamente no dañinos e impacten positivamente en el nivel de aceptación del control biológico por parte de los productores.

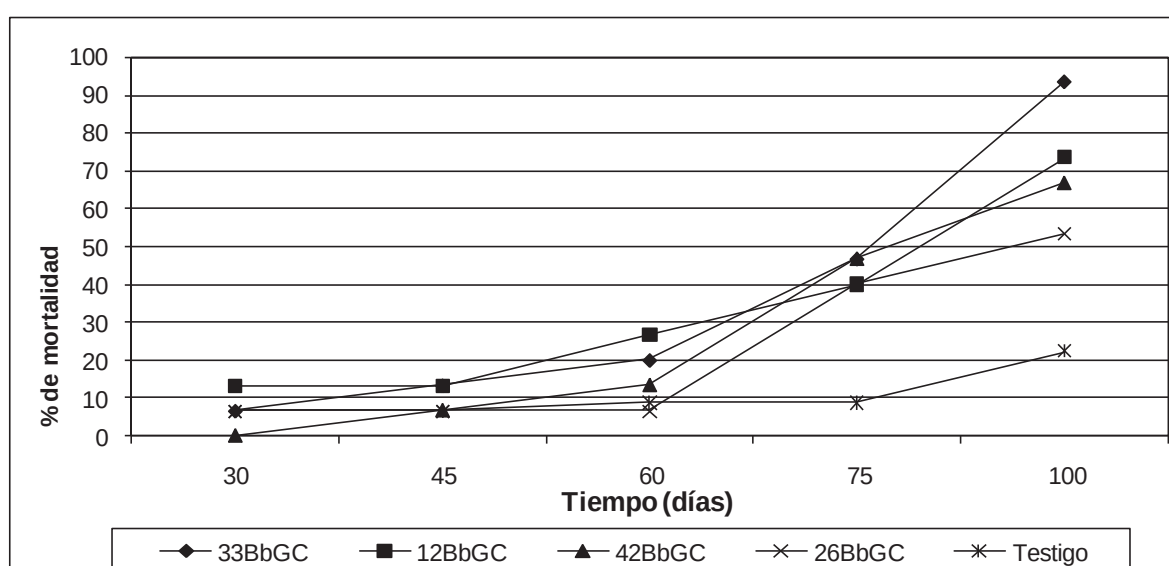


Figura 21. Mortalidad acumulada de larvas de tercer estadio avanzado de *P. vetula* por aislamientos de *B. bassiana* en ensayo de concentraciones determinadas.

Los valores de la máxima dosis utilizada y la tasa de mortalidad en larvas ocasionada por cada aislamiento expresado como la pendiente de acuerdo a modelos de regresión lineal se muestran en el cuadro 16. Los porcentajes de mortalidad obtenidos a las dosis 10^7 - 10^6 no se presentan en los resultados debido a que a partir de las concentraciones 10^9 únicamente el aislamiento 26BbGC registró 66.67% de mortalidad, el resto de aislamientos no alcanzaron el 50% de mortalidad de larvas.

Cuadro 16.- Aislamientos, dosis y parámetros de regresión lineal de *B. bassiana* probados contra larvas de tercer estadio avanzado de *P. vetula*.

Aislamiento Dosis (conidia/gramo de suelo)	Intersección (a)	Pendiente (b)	R²	Mortalidad (%)
33BbGC (1.7×10^{10})	-6.25	0.18	0.91	93.33
42BbGC (1.8×10^{10})	-5.52	0.15	0.93	66.67
12BbGC (8.0×10^9)	-3.25	0.13	0.92	73.33
26BbGC (1.2×10^{10})	-3.60	0.11	0.82	53.33
Testigo1	-0.20	0.02	0.61	13.33
Testigo2	0.56	0.01	0.68	20

Como se observa en el cuadro anterior la tasa de mortalidad obtenida en los testigos fue la más baja registrada en el experimento (13.3% y 20%) en los testigos 1 y 2 respectivamente.

El Programa estadístico utilizado para analizar los datos obtenidos en el bioensayo con concentraciones conocidas fue el probit, desarrollado por la Universidad Autónoma de Nuevo León y se utilizó para conocer la concentración letal (CL_{50}) (cuadro 17). Los resultados indican que el aislamiento etiquetado como 33BbGC fue el que requirió una menor concentración de esporas para matar al 50 % de las larvas con un $1.4E+08$, seguido del 12BbGC, 26BbGC y 42BbGC con un 3.2 , 4.3 y $7.6E+08$ respectivamente.

Cuadro 17. Comparación entre tratamientos seleccionados para la determinación de concentración letal (CL_{50}) en larvas del tercer estadio de *Phyllophaga*.

Tratamiento	Concentración aplicada (esporas/ml)	Concentración letal (CL_{50})	Límites de confianza a 90%	
			Inferior	Superior
33BbGC	1.7E+10	1.4E+08	6.4E+07	2.3E+08
42BbGC	1.8E+09	7.6E+08	2.1E+08	9.5E+08
12BbGC	8.0E+09	3.2E+08	8.2E+07	6.6E+08
26BbGC	1.2E+10	4.3E+08	1.7E+08	5.9E+08

CL_{50} para tratamientos según Probit de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

7. CONCLUSIONES

- En Cantabria, municipio de Zacapu, Michoacán se colectaron 2568 ejemplares de la familia Melolonthidae ubicados en tres subfamilias, seis tribus y 17 especies. El 89% de las especies registradas pertenecen al género *Phyllophaga*.
- En San Francisco Uricho, municipio de Pátzcuaro, Michoacán se encontraron únicamente dos especies: *P. ravida* y *P. vetula* en proporciones de dos a uno respectivamente.
- En San Francisco Uricho el 99.19% de los hongos entomopatógenos registrados de manera natural en el suelo pertenecieron al género *Beauveria* y el porcentaje restante a hongos del género *Metarhizium*, presentándose estos dos géneros en mayor abundancia en verano.
- La cantidad de hongos entomopatógenos presentes de manera natural en el suelo fue mayor en la localidad de Zacapu, predominando los hongos del género *Metarhizium* con respecto a *Beauveria* con un 60 y 40% respectivamente. La abundancia de estos dos géneros fue en mayor durante el verano.
- El aislamiento etiquetado como 33BbGC obtuvo mayor sobrevivencia en el suelo en condiciones de laboratorio a los 7, 30 y 60 días de inoculado, seguido del aislamiento 26BbGC.
- De las 12 cepas estudiadas para seleccionar aislamientos, nueve de ellas alcanzaron mortalidades superiores al 80% en los primeros 13 días de transcurridos los experimentos.
- Durante el primer muestreo de larvas en el mes de agosto no se presentaron larvas muertas a causa de los hongos aplicados en ninguna de las localidades.

- En el segundo muestreo de larvas en el mes de diciembre en la localidad de San Francisco Uricho dos de las tres cepas causaron mortalidad en campo de 23.8 y 8.3%, que fueron el 33BbGC y 12BbGC respectivamente, el análisis de varianza aplicado muestra que no existió diferencia estadística significativa entre los diferentes tratamientos.
- En la localidad de Cantabria, municipio de Zacapu, en el segundo muestreo, el aislamiento 12BbGC obtuvo un 38.5% de mortalidad en campo, siendo diferente estadísticamente de los demás tratamientos, mientras que el 33BbGC y 26BbGC alcanzaron un 23.1 y 20% respectivamente.
- Se produjeron un total de 120 kg. de arroz inoculado con los tres aislamientos aplicados en campo, alcanzando todos los estándares de calidad establecidos por el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (SAGARPA) de Tecomán, Colima.
- El aislamiento 33BbGC requirió menor concentración para matar al 50% (CL₅₀) de larvas del tercer estadio con un 1.4 E+08 esporas, seguida del 12BbGC y 26BbGC con 3.2 E+08 y 4.3 E+08, respectivamente.
- De acuerdo a los resultados obtenidos en campo y laboratorio se puede proponer al aislamiento 12BbGC como un buen candidato a ser utilizado como agente microbial en parcelas demostrativas en la Ciénega de Zacapu, Mich., como parte de un manejo integral de plagas en esta zona.
- En trabajos posteriores se recomienda ampliar el número de parcelas demostrativas, ya que en una misma localidad existen condiciones agroclimáticas diferentes entre una parcela a otra. Utilizar una mayor cantidad de aislamientos nativos y exóticos con la finalidad de evaluar su acción y establecimiento.

8. LITERATURA CITADA

- Albert, A. L. 1996. Plaguicidas persistentes. Memoria del II Simposium Internacional y III Reunión Nacional Sobre Agricultura Sostenible. San Luis Potosí. México. 67-75 pp.
- Alexander, M. 1977. Introduction to Soil Microbiology. Wiley and Sons, New York, 467 pp.
- Alves, S. 1986. Controle microbiano de insetos. Brazil. Manole. 407 p.
- Ayala, L.R.G. 1997. Evaluación de los atributos ópticos de la Laguna de Zacapu. Michoacán. México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 121 pp
- Badilla, F. 1994. Resultados obtenidos en el manejo integrado de *Aeneolamia postica* y *Prosapia* spp (Homoptera: Cercopidae) en diferentes regiones de Costa Rica. Resúmenes. P. 88.
- Blackwelder, R. E. 1984. Checklist of the Coleopterous Insects of Mexico, Central America, the West Indies and South America. U. S. Nat. Mus. Bull. 185 (2): 220-265.
- Blackwelder, R. E. y R. H. Arnett, Jr. 1974. Checklist of Scarabaeidae of Canada, United States, Mexico, Central America and the West Indies. Volume 1 Pt.3 red version. BRIA Latham, N. Y. 120p.
- Butin, G. D. 1986. A Review of plant response to fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Smith) injury in selected field and forage crops. Florida. Entomolgy. 69: 549-559.
- Carranza, C. O. 1993. Determinación de la dosis letal media de aislados nativos de *Bacillus thuringiensis* (variedad aizawai), contra larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* y *Spodoptera exigua*. XVI Congreso Nacional de Control Biológico. Monterrey Nuevo León. (Resúmenes). 36-37 pp.
- Clayton N. y J.F. Grove. 1988. Insecticidal secondary metabolic products from the entomogenous fungus *Verticillium lecanii*. Journal of Invertebrata Pathology. 40: 413-418.
- Coto, D. 1993. Morfología de la capsula masculina de especies del género Phyllophaga (Col: Scarabaeidae). Manejo integrado de plagas (Costa Rica). No. 26 pp. 28-30.
- Cox, A. 1981. Neem-pesticide potential. International Pest Control 68 (70): 78.
- Chacón, T. A. 1993. Pátzcuaro un lago amenazado Bosquejo limnológico Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia Mich. México. 4-144 pp.

- De Bach, P., 1977. Lucha biológica contra los enemigos de las plantas. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España. 399 pp.
- De Bach. 1979. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. Séptima Edición. Editorial CECSA. México.
- Demant, A. 1978. Características del eje neovolcánico transmexicano y sus problemas de interpretación. Revista del Instituto de Geología de México. UNAM, México. 2(2): 172-187
- Demant, A. 1981. L'axe néovolcanique transmexican. Etude volcanologique et pétrographique. Signification géodinamique. These d'Etat. Faculté des Sciences et Techniques de Saint-Jérôme, Université d'Aix-Marseille III, Marsella.
- Demant, 1992. Marco geológico regional de la laguna de Zacapu, Michoacán. EN: D. Michelet (coord.). Medio ambiente e introducción a los trabajos arqueológicos. Cuadernos de Estudios Michoacanos 4: 53-72
- Díaz, A.M.M. 1996. Diagnóstico del estado trófico de la Laguna de Zacapu, Michoacán. Tesis de Maestría en ciencias. Especialidad en Ecología. Instituto Politécnico Nacional. México. 129 pp.
- Endrödi, S. 1985. The Dynastinae of the Word. Dr. W. Jusnk Publ. Dordrecht. 800 pp. XLVI plates.
- Fuxa J. 1987. Epizootiology of insect diseases. A. Wiley interscience publication. pp 324-350.
- García, E. 1988. Modificación al sistema de clasificación de Köpen (para adaptarlos a las condiciones de México) 4ta edición. México. 217 pp.
- García M. M., M. Nájera R., R. L. Crocker, y V. Hernández V. 2000. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolation virulence against *Phyllophaga crinita* (Coleoptera: Melolonthidae) larvae in laboratory. Simposium for international congress of entomology August 20-26, Iguassu, Brazil.
- Gorestein S. y H. Pollard, 1983. The Tarascan civilization: the late prehispanic cultural sistem. Vanderbilt University. Publications in antropology. 28. Nashville. 198pp.
- Glare, T.R. 1992. Fungal pathogens of scarabs. in: Use of pathogens in scarab pest management. (T.R. Glare & T. A. Jackson Eds.). Intercept. pp.63-78 .
- Glare, T.R.; O'Callaghan, M., y Wigley, P.J. 1993: Checklist of naturally-occurring entomopathogenic microbes and nematodes in New Zealand. N.Z. J. Zoology. 20: 95-120.

- Hanson, P. 1994. Control biológico de *Phyllophaga*. Congreso sobre biología y ecología de *Phyllophaga*. Turrialba Costa Rica. 7 p.
- INEGI. 1990. Anuario del censo general de población y vivienda. spp.
- Jackson, T. A. 1984. Honey disease, and indicator of population decline in grass grub. Proceedings of the 37th New Zealand Weed and Pest Control Conference: 113-116.
- Jackson, T. A. 1992. Use of Pathogens In Scarab Pest Management. Intercep Limited. Great Britain. 297 p.
- Jackson, T.A. 1993. Developing microbial controls for scarab pests. En diversidad y manejo de plagas subterráneas. M.A Morón (compilador). Someent. Instituto de Ecología. Jalapa Veracruz. México pp.183-192.
- Klein, M. G. 1992. Use of *Bacillus popilliae* in Japanese beetle control. In Use of Pathogens in Scarab Pest Management. 191-198, Intercep Press, Andover, U.K.
- King, A. B. G, y L. Saunders J. 1984. Las plagas de invertebrados de cultivos anuales alimentación en América Central. Administración del Desarrollo Extranjero (ODA). Londres 182 pp.
- King, A.B.S. 1994. La biología, identificación y distribución de especies económicas de *Phyllophaga* En América Central. Congreso sobre biología y ecología de *Phyllophaga* spp. Turrialba Costa Rica. 12p.
- Klein, M. G. y Jackson, T. A. 1992. Bacterial diseases of scarabs. pp. 43-61 in T. A. Jackson y Glare T. R. (eds). Use of pathogens in Scarab pest management intercepted Ltd., Andover. 179pp.
- Landis, D. A. Wratten, S.D. y Gurr, G.M. 2000. Habitat Management to conserve natural enemies of arthropod pest in agriculture. Annual. Rev. Entomology. 45: 175-201.
- La torre A. B. 1990. Plagas de las hortalizas. Manual del manejo integrado. Publicación de la Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. 520 pp.
- Lecuona, R. E. 1995. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Buenos Aires Argentina 35-60 p.
- Maldonado, U.R.M. 1996. Algunos aspectos reproductivos de *Chirostoma humboldtianum* durante el periodo de Otoño-Invierno en la laguna de Zacapu, Michoacán, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 101 pp.

- McCoy, C.W., Samson, R.A. y Boucias, D.G. 1988. Entomopatogenous Fungi. En: Ignoffo C.M. CRC. Handbook of natural pesticides. Vol. V. Part. A. Entomopatogenous, Protozoa, and Fungi.
- Metcalf, C. L. y W. P. Flint. 1962. Insectos destructivos e insectos útiles, sus costumbres y su control. Compañía Editorial Continental, S.A., México. 1207 pp.
- Metcalf, L. R. y H. Lockmann, W. 1990. Introducción al manejo de plagas de insectos. Editorial Limusa. 1ª edición México D.F. 710 pp.
- Moncayo, E.R. 1993. Aspectos taxonómicos y biológicos de *Hubbisina torneri* De Buen (1941).(Goodeidae) en Michoacán, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 143 pp
- Morón, M. A. 1984. Escarabajos 200 millones de años de evolución. Publicación No. 14 Instituto de Ecología. México, D. F. 132 p.
- Morón, M. A. 1986. El género *Phyllophaga* en México. Morfología, distribución y sistemática supraespecífica. (Insecta: Coleoptera). Publ. No 20 Instituto de Ecología. México, D. F. 341 p.
- Milner, R. J. y P.R. Samson. 2000. Against sugarcane whitegrubs in Australia. Symposium for International Congress of Entomology August 20-26, Iguassu, Brazil.
- Morón, M. A. 1994. Fauna de Coleoptera Lamellicornia en las montañas del noroeste de Hidalgo, México. Acta Zoológica. Mexicana. (n. s.) No. 63:7-59.
- Morón, M. A. 1996. Melolonthidae (Coleoptera). En: Llorente-Bousquets, J., E. González-Soriano y A. N. García-Aldrete (compiladores) Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México. Hacia una síntesis de su conocimiento. UNAM. México. pp. 287-307.
- Morón, M. A. 2001. Larvas de escarabajos del suelo en México, (Coleoptera: Melolonthidae). Acta Zoológica. Mexicana. (n. s.) Número especial 1:111-130.
- Morón, M. A. 2003. Diversidad, distribución e importancia de las especies de *Phyllophaga* Harris en México (Coleoptera: Melolonthidae). En: Estudios sobre Coleópteros del suelo en América. Aragón, G. A., M. A. Morón y A. Marín J. (Eds). Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México. pp. 1-27.
- Morón, M. A. y J. R. Salvadori. 1998. Description of the adult and third stage larva.

- Morón, M. A. y R. A. Terrón. 1988. Entomología práctica. Publicación 22. Instituto de Ecología A. C. México, D. F. 534 p.
- Morón, M. A., B. C. Ratcliffe y C. Deloya. 1997. Atlas de los escarabajos de México Coleoptera: Lamellicornia, Vol. I Familia Melolonthidae. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Sociedad Mexicana de Entomología A.C. México D.F. 280 p.
- Mummert, G. 1994. Tierra que pica: Transformación social de un valle agrícola michoacano en la época post-reforma agraria. El Colegio de Michoacán, México. 214 pp.
- Nájera, M.B. 1993. Coleópteros rizófagos asociados al maíz de temporal en el Centro del Estado de Jalisco, México. Identificación, ecología y control. EN. Morón, M.A. (Ed.). Diversidad y manejo de plagas subterráneas. SME-I. de E. Xalapa, Veracruz, México. pp.143-154.
- Nájera, R.M.B. 1998. Diversidad y abundancia del complejo “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae) en agroecosistemas de maíz de la región templada de Michoacán. EN: Morón, M.A. y Aragón, A. (Eds.). Avances en el estado de la diversidad, importancia y manejo de los coleópteros edafícolas americanos. BUAP-SME, Puebla, México. pp. 99-106.
- Nájera, R.M.B. E. Hidalgo, P.J. Shanon y L.A. Rodríguez del Bosque. 2000. Screening of tropical strains of *Paenibacillus popilliae* against two mexican white grub species. Symposium for international congress of entomology. August 20-26, Iguassu, Brazil.
- Nájera, R. M. B., Jackson T. A. y J. D. López M. 2003. Especies de “gallina ciega” (Coleoptera Melolonthidae) asociadas al cultivo de maíz en tres localidades de la Ciénega de Zacapu, Michoacán México. En: Estudios sobre coleópteros del suelo en América. Aragón, G. A., M. A. Morón y A. Marín J. (Eds.). Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. pp. 215-230.
- O’Callaghan M.,T.A. Jackson., S.D. Young y S. Dodd. 2000. Dinamics of *serratia* spp. pathogenic to the New Zealand grass grub, *Costelytra zealandica*. Symposium for international congress of entomology. August 20-26, Iguassu, Brazil.
- Olvera, C. C., K. Arévalo, N., C. Sandoval, C. 1992. Evaluación de aislados nativos de *Bacillus turingiensis* variedad *Aizawai* contra larvas neonatas de *Spodoptera*

- frugiperda* y *Spodoptera exigua*. XV Congreso Nacional de Control Biológico. Cuautitlan Izcalli. Estado de México, 8-9 octubre 1992. 56:60 p.
- Osborne, L.S. y Landa, Z. 1992. Biological Control of Whiteflies with entomopatogenic fungi. Florida Entomologist. 75 (4).
- Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Vol. 84, supl. III: 89-100.
- Poinar, O.G. y Thomas, M.G. 1978. Diagnostic manual for the identification of insect pathogens. Plenum Press. New York. 207 p.
- Poprawski, T. J. y Yule, W. N. (1991). Incidence of fungi in natural population of *Phyllophaga* spp. And susceptibility of *Phyllophaga anixia* (Le conte) (Coleoptera: Scarabaeidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisoplie* (Deuteroumycotina). Journal. Appl. Entomology. 112: 359-365.
- Roberts, D. V. 1989. World picture of biological control of insects by fungi. Memory. Institut.
- Rodríguez, H.C. 1997. Avances en la investigación 1997. Editorial Juan Cibrian Tovar. Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad. Montecillo, Edo. de México. Pp 17-19.
- Rodríguez del Bosque L. A. 1996. Pupation and adult longevity of *Phyllophaga crinita*, *Anomala flavipennis* and *A. foraminosa* (Coleoptera: Scarabaeidae). Southwest Entomology. 21 (1): 55-58.
- Rojas, C. J. 1993. Las ferormonas sexuales en el orden Lepidoptera. Boletín de la Sociedad de Entomología. 14: 17-29
- SAGARPA. 2005. Sistema ejecutivo de datos básicos, avances al mes de mayo. Subsecretaria de planeación, Dirección general de estadística México D.F. 335 pp.
- Salguero, V. 1994. Control químico de *Phyllophaga*. In Seminario-Taller Centoamericano sobre la biología y control de *Phyllophaga* spp. (Primero, 1994, Turrialba Costa Rica).
- Shannon, P. 1994. Annual technical report. In Informe Proyecto MIP. Plagas de suelo. p 14-17.
- Smit, D. y Orions, A. 1994. The preservation and maintenance of living fungi. Technical Handbooks: No. 1. Sec. edit. International mycological Institute. 122p.
- Stevenson, J.A. 1918. The gren muscardine fungus in Puerto Rico, P.R. Depto. Agriculture. Bull. 2 pp 19-32.

- Sosa, O. Jr. y Hall, D. G. 1989. Mortality of *Ligiurus subtropicus* (Coleoptera: Scarabeidae) by Entomogenous nematodos in field and laboratory trials. Journal of Economic Entomology. 82 740-744.
- Tanada, Y y Kaya, H. 1992. Insect Pathology. Ed. Academic press. USA. 666 p.
- Tanada, Y y Kaya, H. 1993. Fungal infections. In: Insect Pathology. Ed. Academic press. Inc. San Diego, California.USA. 3182-387p.
- Valenzuela, C. P. 1992. Entomopatígeno: Una opción en el control del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*). XV Congreso Nacional de Control Biológico. Cuahutitlan Izcali. México. 82- 87 pp.
- Villalobos, F. J. 1999. The sustainable management of white grubs (Coleoptera: Melolonthidae) pest of corn in “ El Cielo” biosphere reserve, Tamaulipas, Mexico. Journal of Sustentable Agriculture. 14:5-19.
- Villarelo, J. 1989. Hidrología subterránea de los alrededores de Pátzcuaro, Estado de Michoacán. Pereigones. Instituto de Geología, México. 9: 339-62 p.
- Zhang, A. W. 1990. Field control of asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae) with different preparation forms of *Beauveria bassiana*. Chinese Journal of Biological Control 6 118-120.
- Zimmermann, G. 1993. The entomopatogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its Potencial a Biocontrol Agent. Federal Biological Research Centre for agriculture and Forestry for Biological Control. Germany. Pestcide Science. 37:375-379.

ANEXO I

Descripción de especies registradas en las dos zonas de estudio

Phyllophaga (s. str.) *ravida* (Blanchard, 1850).

Larva de tercer estadio (Figs. 21-33).

(Redescripción basada en Ramírez *et al.* 2000).

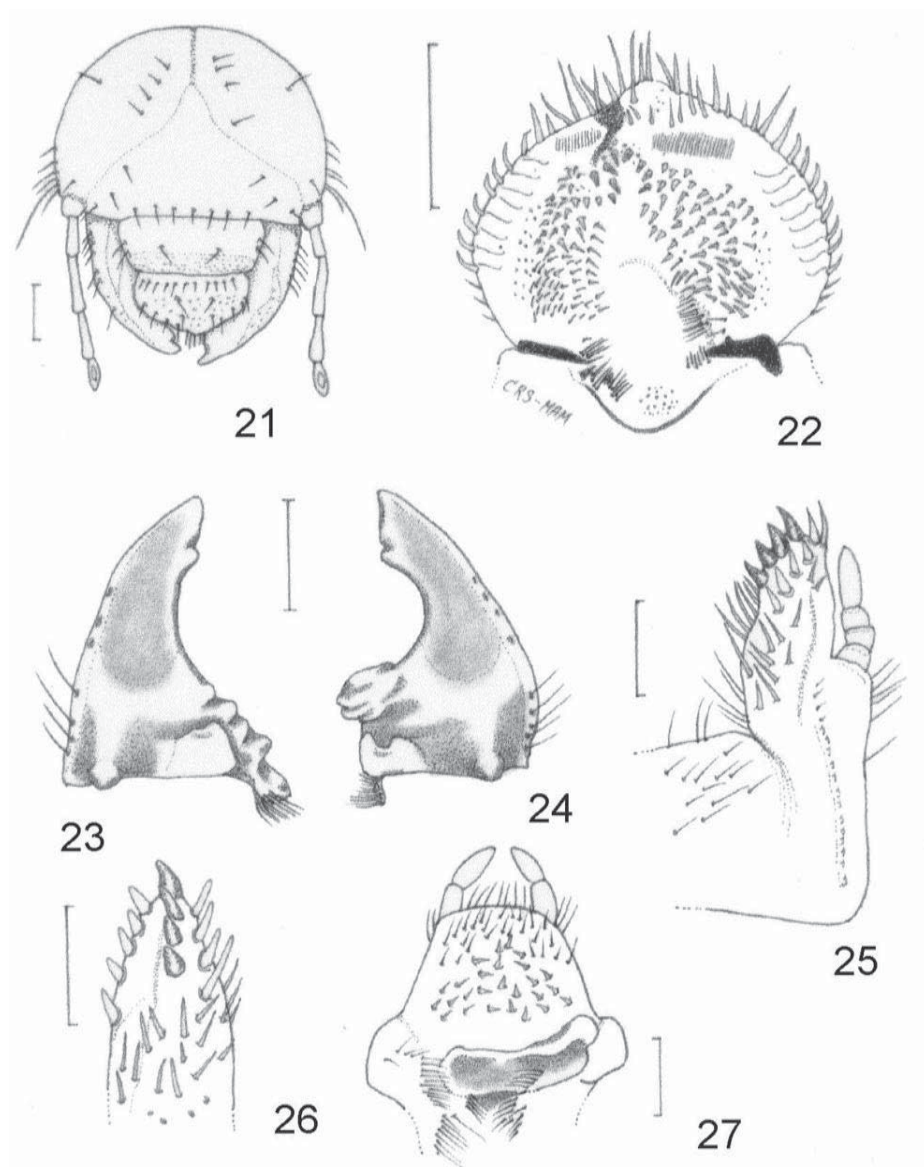
Cabeza. Anchura máxima de la cápsula cefálica: 4.58 a 5.16 mm (N =25). Superficie del *cranium* casi lisa, parda amarillenta. Frente con 1 seda frontal exterior y 1 seda frontal posterior a cada lado; y 7-12 sedas frontales anteriores; con 1 seda en los ángulos anteriores de la frente; el resto de la superficie craneal con 1 a 3 sedas dorso epicraneales, 3-4 sedas epicraneales y 8-9 sedas paraocelares a cada lado. Clípeo con 2 sedas centrales y 2 sedas laterales a cada lado. Labro simétrico a ligeramente asimétrico, con los márgenes laterales redondeados, 8 a 12 sedas posteriores, 2 sedas centrales, 2 sedas antero-centrales y 4 sedas laterales a cada lado. Manchas oculares ausentes (Fig. 21). Epifaringe sin *zygum* y con *epizygum* alargado y angosto, irregular, pardo oscuro; *haptomerum* prominente con 8-10 *heli*; cada *plegmaticum* formado con 9-13 *plegmata* ampliamente separados. *Proplegmata* con los *plegmata* muy finos y cercanos entre sí. *Dexiophoba* fragmentada y *laeophoba* grande, extendida a través del borde de la *laeotorma*. *Dexiotorma* casi recta; *laeotorma* corta; *apotorma* ancha, dentiforme; *epitorma* indefinida. *Haptolachus* amplio. Placa esclerosada reducida, estrecha, angulosa. Cono sensorial desplazado hacia la placa esclerosada y parcialmente cubierto por la *dexiophoba*. *Crepis* estrecho, bien definido. Cada *acanthoparia* con 8 a 10 sedas espiniformes recurvadas. *Chaetoparia* bien desarrollada con pocas sensilas en el límite de la *gymnoparia* (Fig. 22). Mandíbulas sin área estriduladora ventral. Áreas incisivas de ambas mandíbulas con una lámina cortante distal separada de un dientecillo incisivo proximal por una escotadura incisiva; márgenes internos sin dientes; área molar de la mandíbula izquierda (Fig. 24) con el lóbulo distal (M1) bien desarrollado; con 4-5 sedas dorso-molares; *acia* corto y redondeado; *brustia* multisetosa; área molar de la mandíbula derecha con el lóbulo distal poco desarrollado; *calx* prominente y *brustia* multisetosa (Fig. 23). Maxilas con un *uncus* terminal en la galea y tres *unci* alineados en lacinia, y con 4-5 *heli* a cada lado (Fig. 26). Área estriduladora maxilar con 11 a 14 dientecillos agudos, sin proceso

anterior definido (Fig. 25). Escleroma hipofaríngeo asimétrico con el lado izquierdo reducido (Fig. 27). Último artejo antenal con una área sensorial ovalada en la superficie dorsal (Fig. 28) y dos áreas sensoriales en la superficie ventral.

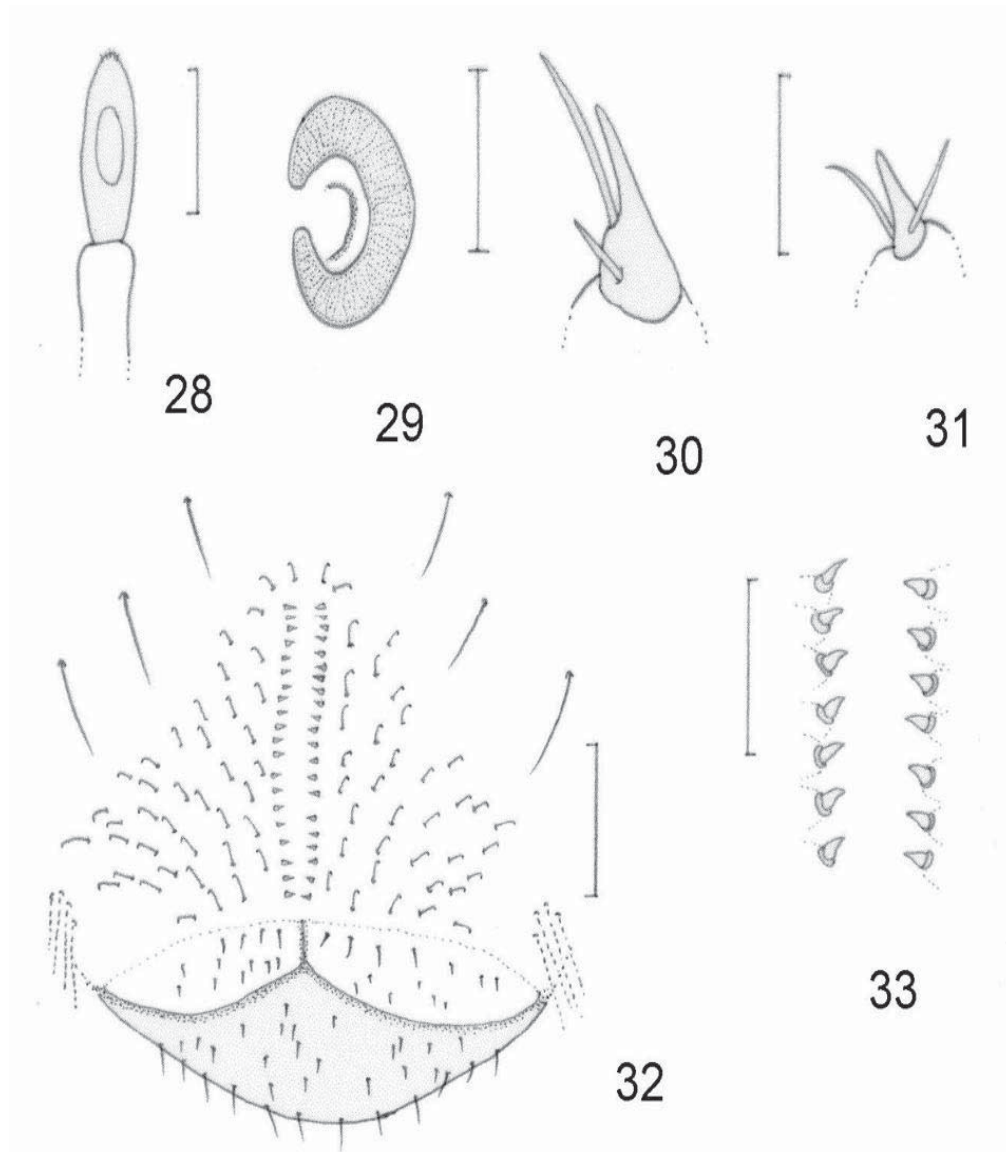
Tórax. Estigmas respiratorios miden 0.37 mm de largo por 0.56 mm de ancho; placa respiratoria amarillo rojizo, uniformemente recurvados en forma de “C”, la distancia entre los lóbulos de la placa respiratoria es menor que el diámetro dorsoventral de la *bulla*; *bulla* redondeada, moderadamente prominente (Fig. 29). Pronoto con un escleroma lateral alargado a cada lado, amarillo cremoso, con sedas cortas y largas. Proprescudo con 10 a 17 sedas cortas distribuidas irregularmente; proescudo con 6 a 10 sedas cortas y largas distribuidas irregularmente; mesoprescudo con 6 a 11 sedas cortas y largas distribuidas irregularmente; mesoescudo sin sedas; mesoescutelo con 4 a 7 sedas cortas a medianas en hilera; metaprescudo con 5 a 8 sedas cortas y largas en hilera; metaescudo sin sedas; metaescutelo con 7 a 9 sedas cortas a medianas en hilera. Uñas tarsales pro y mesotorácicas similares, alargadas, agudas con dos sedas insertadas cerca de su base (Fig. 30); uñas metatorácicas reducidas pero agudas, con dos sedas largas (Fig. 31).

Abdomen. Estigmas abdominales de los segmentos I a VII casi semejantes en diámetro, 0.26-0.37 mm de largo por 0.44 mm de ancho; placa respiratoria amarillo rojiza, regularmente recurvada en forma de “C”, la distancia entre los lóbulos de la placa respiratoria es menor que el diámetro dorso-ventral de la *bulla*; *bulla* redondeada, poco prominente. Estigma del segmento VIII más pequeño que los precedentes, mide 0.25 mm de largo por 0.31 mm de ancho. *Dorsa* de los segmentos abdominales I-VI con numerosas sedas espiniformes y algunas sedas largas distribuidas en sentido transversal; segmentos abdominales VII-IX sin sedas espiniformes, con sedas largas situadas transversalmente. *Venter* de los segmentos abdominales I-IX con 4 a 7 sedas medianas a largas amarillo rojizo. *Raster* con un par de *palidia* longitudinales, paralelas y angostas que convergen ligeramente hacia el labio anal inferior y definen una *septula* estrecha (Fig. 32) con una longitud de 1.74 a 2.08 mm (N=25) y se encuentran separados 0.33 mm en promedio en su parte central; cada *palidium* está formado por 14-21 *pali* espiniformes cortos (Fig. 33). *Tegilla* con 31- 48 sedas *hamate*. *Campus* con 8 -11 sedas largas y finas. *Barbula* moderadamente setosa y amarillenta . Labio

anal dorsal con algunas sedas espiniformes y algunas sedas medianas. Labio anal ventral moderadamente escotado. Abertura anal en forma de “Y”. Longitud dorsal aproximada del cuerpo: 2.7 a 3.6 cm (N=25). El cuerpo de esta larva es blanco hialino y moderadamente robusto.



FIGURAS 21-27. *Phyllophaga (Phyllophaga) ravida*, larva de tercer estadio. 21) Cabeza. 22) Epifaringe. 23) Mandíbula derecha en vista ventral. 24) Mandíbula izquierda en vista ventral. 25) Maxila derecha en vista dorsal. 26) Ápice de la maxila. 27) Hipofaringe. Líneas de escala = 1 mm, excepto en figs. 25-27 = 0.5 mm.



FIGURAS 28-33. *Phyllophaga (s.str.) ravida*, larva de tercer estadio. 28) Aspecto dorsal del último artejo antenal. 29) Placa respiratoria. 30) Uña mesotarsal. 31) Uña metatarsal. 32) Raster. 33) Detalle de pali. Líneas de escala = 0.5 mm, excepto en fig. 32 = 1 mm.

Phyllophaga (s.str.) vetula (Horn, 1887).

Larva de tercer estadio (Figs. 34-40).

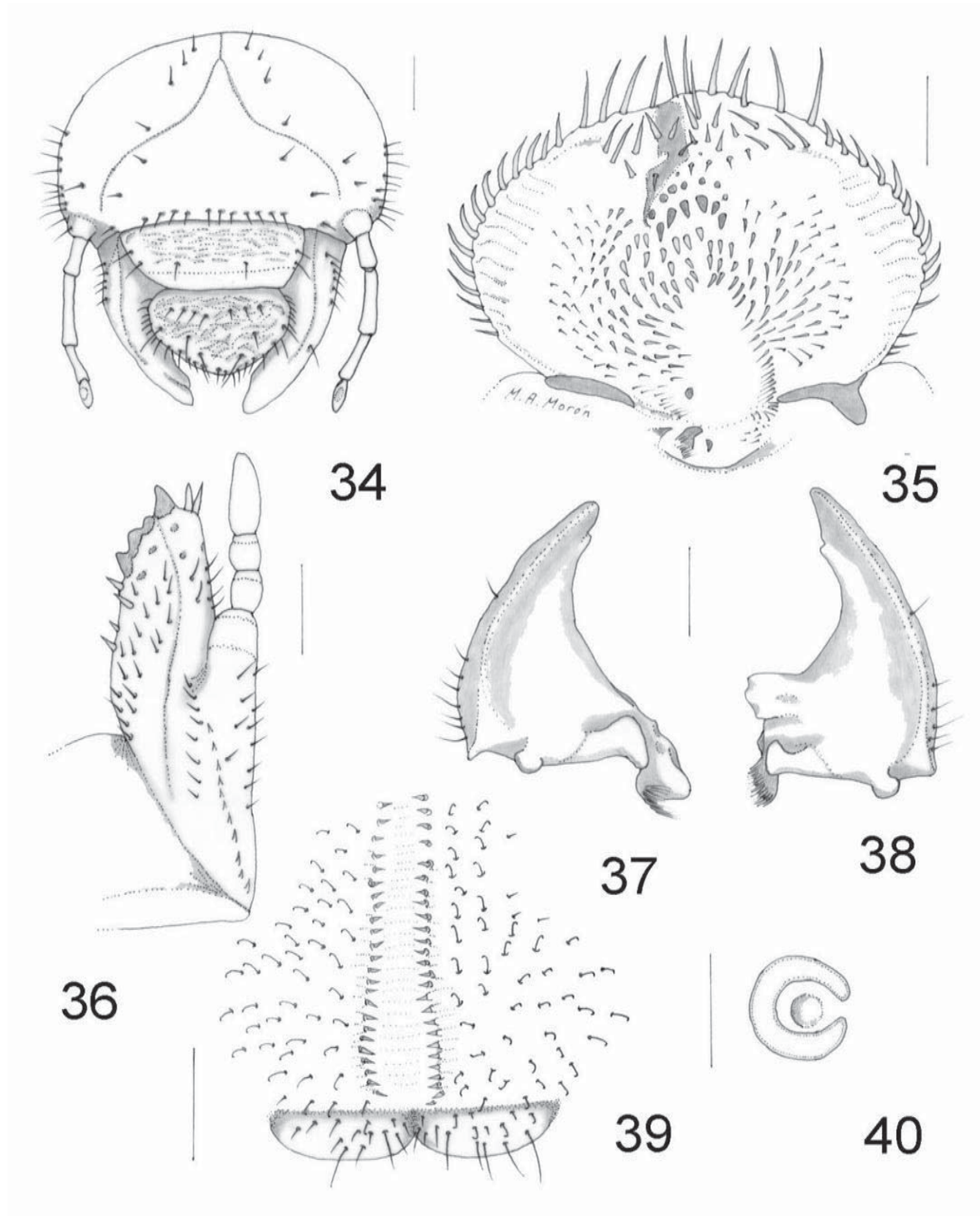
Descripción original.

Cabeza. Anchura máxima de la cápsula cefálica: 5.6-5.8 mm. Superficie del cranium casi lisa, parda amarillenta. Frente con 1 seda frontal exterior y 1 seda frontal posterior a cada lado, 10-12 sedas frontales anteriores, y 1 seda en cada ángulo anterior de la frente; el resto de la superficie craneal con 3 sedas dorso-epicraneales, 1-2 sedas epicraneales y 10-12 sedas para-antenas a cada lado. Clípeo con 2 sedas centrales y 2 sedas laterales a cada lado. Labro ligeramente asimétrico, con los márgenes laterales redondeados, 6 sedas posteriores, 2 sedas centrales, 1 seda lateral y 1 seda preapical a cada lado. Manchas oculares ausentes (Fig. 34). Epifaringe sin *zygum* y con *epizygum* alargado, irregular, pardo oscuro a pardo rojizo; *haptomerum* prominente con 20-21 *heli* dispuestos en 4 hileras transversales irregulares; cada *plegmatium* formado con 10-11 *plegmata* anchos. *Proplegmatia* ausente. *Dexiophoba* escasa, irregular. *Laeophoba* abundante y continua, extendida a través del extremo mesial de la *laeotorma*. *Dexiotorma* ancha, casi recta, con el extremo mesial aguzado. *Laeotorma* corta y ancha; *apotorma* y *epitorma* indefinidas; *pternotorma* ancha, corta, con el extremo redondeado. *Haptolachus* desnudo. Placa esclerosada ancha y parcialmente cubierta por la *dexiophoba*. Cono sensorial estrecho, reducido. *Crepis* ligeramente marcado. Cada *acanthoparia* con 11-13 sedas espiniformes recurvadas. *Chaetoparia* bien desarrollada con escasas sensilas en el límite con la *gymnoparia* (Fig. 35). Mandíbulas sin área estriduladora ventral. Áreas incisivas de ambas mandíbulas con una lámina cortante distal separada de un dientecillo incisivo proximal por una escotadura incisiva márgenes internos sin dientes; área molar de la mandíbula izquierda (Fig. 38) con un lóbulo distal (M1) bien desarrollado; *acia* reducido; *brustia* multisetosa. Área molar de la mandíbula derecha (Fig. 37) con el lóbulo distal poco desarrollado; *calx* prominente y *brustia* multisetosa. Maxilas con un *uncus* terminal largo en la galea y 3 *unci* cortos alineados en la lacinia, y con hileras de 3-4 *heli* a cada lado (Fig. 36). Área estriduladora maxilar con 11 dientecillos agudos, sin un proceso anterior definido. Escleroma hipofaríngeo asimétrico, con el lado derecho poco prominente,

redondeado. Último artejo antenal con un área sensorial ovalada en la superficie dorsal y dos áreas sensoriales más pequeñas en la superficie ventral.

Tórax. Los estigmas respiratorios miden 0.64 mm de ancho y 0.42 mm de largo; placa respiratoria amarilla rojiza, uniformemente recurvados en forma de “C”, la distancia entre los lóbulos de la placa respiratoria es menor al diámetro dorsoventral de la *bulla*, que es semiovalada y poco prominente (Fig. 40). Pronoto con un escleroma lateral irregular a cada lado, amarillento, poco contrastante, con sedas medianas esparcidas. Escudos torácicos con escasas hileras transversales de sedas largas y medianas esparcidas, pero sin sedas espiniformes. Protarsos y mesotarsos con las uñas similares, alargadas, agudas, con dos sedas prebasales; uñas metatarsales reducidas, mamilares, con dos sedas largas.

Abdomen. Los estigmas de los segmentos abdominales tienen diferentes tamaños, en el 1º miden 0.38 mm de ancho y 0.26 mm de largo; del 2º al 4º tienen 0.46 mm de ancho y 0.30 mm de largo; en el 5º y 6º alcanzan 0.46 mm de ancho y 0.38 mm de largo; en el 7º tienen 0.46 mm de ancho y 0.40 mm de largo; y en el 8º segmento miden 0.32 mm de ancho y 0.28 mm de largo. Las placas respiratorias son amarillo rojizas, regularmente recurvadas en forma de “C”, la distancia entre los lóbulos de la placa respiratoria es menor al diámetro dorsoventral de la *bulla*, que es semiovalada y poco prominente. *Dorsa* de los segmentos abdominales 1º a 6º con numerosas sedas espiniformes y algunas hileras de sedas largas distribuidas en sentido transversal; segmentos abdominales 7º a 9º sin sedas espiniformes, con 8 a 12 sedas largas dispuestas en hileras transversales. *Venter* de los segmentos abdominales 1º a 9º con hileras de 10 a 14 sedas largas. *Raster* con un par de *palidia* longitudinales casi paralelos, ligeramente convergentes en el extremo caudal, con 2.56 - 2.70 mm de longitud, separadas 0.36 - 0.38 mm en su parte central; cada *palidium* está formado por 24-25 *pali* cortos, ligeramente recurvados, con ápices agudos dirigidos hacia la línea media (Fig. 39). *Tegilla* con 48-50 sedas *hamate* comprimidas y recurvadas hacia sus ápices. *Campus* con 6 sedas largas y finas. *Barbula* moderadamente setosa. Labio anal dorsal con pocas sedas espiniformes esparcidas y algunas sedas largas. Labio anal ventral estrecha y profundamente hendido. Abertura anal con forma de “V” muy abierta. Longitud total aproximada por el dorso del cuerpo: 52-56 mm.



FIGURAS 34-40. *Phyllophaga (Phyllophaga) vetula*, larva de tercer estadio. 34) Cabeza. 35) Epifaringe. 36) Maxila derecha en vista dorsal. 37) Mandíbula derecha en vista ventral. 38) Mandíbula izquierda en vista ventral. 39) Raster. 40) Placa respiratoria. Líneas de escala = 1 mm, excepto en figs. 35, 36 y 21 = 0.5 mm.