

9. Uso de Entomopatógenos

V. M. HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ¹, M. E. NÚÑEZ-VALDEZ²,
J. RUIZ-VEGA³, M. B. NÁJERA-RINCÓN⁴ Y F. J. VILLALOBOS²

¹Centro de Investigación en Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad No. 1001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, C.P. 62209, MEXICO, vmanuelh@uaem.mx

²Centro de Desarrollo e Investigación Agropecuaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad No. 1001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, MEXICO

³CIIDIR Oaxaca, Instituto Politécnico Nacional, Calle Hornos No. 1003, Santa Cruz, Xoxocotlan, Oaxaca, C. P. 71230, MEXICO

⁴Campo Experimental Uruapan CIRPAC-INIFAP, Avenida Latinoamericana No. 1101, Col. Revolución, Uruapan, Michoacán, C. P. 60500, MEXICO

RESUMEN

En el presente capítulo se hace una revisión del uso potencial de nemátodos, bacterias y hongos entomopatógenos de larvas rizófagas de escarabajos. Para cada uno de estos grupos de entomopatógenos se describen los ciclos de vida, modo de acción, rango de huéspedes, resultados de ensayos de laboratorio y campo, así como de la producción comercial, formulación y perspectivas de uso de cepas encontradas en México. Los estudios realizados sobre entomopatógenos en México se encuentran en un estado de desarrollo incipiente. Sin embargo, los hallazgos obtenidos en otros países sobre estas líneas de investigación, sugieren que estos organismos pueden tener potencial para el control biológico de insectos rizófagos en la agricultura mexicana de bajos insumos.

ABSTRACT

This chapter reviews the potential use of entomopathogenic nematodes, bacteria and fungi attacking root-feeding larvae of soil-dwelling scarab beetles. For each of these groups of entomopathogens, life cycle, mode of action, host range, laboratory bioassays, field trials, commercial production, formulation, and perspectives for their usage in Mexico is described. The study of entomopathogens of soil insects in Mexico is still in the basic stage. However, findings in other countries on this area of research suggest that these organisms may have a potential for the biological control of these insects in low-input Mexican agricultural systems.

INTRODUCCIÓN

En México las plagas de suelo, principalmente las “gallinas ciegas” de los géneros *Phyllophaga* y *Paranomala* (Coleoptera: Melolonthidae), representan un serio problema en varias regiones, ya que atacan diversos cultivos, principalmente maíz (Ríos y Romero 1982, Rodríguez-del-Bosque 1988). Una estrategia ecológicamente segura en el combate de plagas de suelo es el control biológico, mediante la identificación de enemigos naturales nativos para posteriormente seleccionar los que presenten mayor potencial de acuerdo a criterios como especificidad, movilidad, virulencia (en el caso de patógenos), persistencia, factibilidad y costos de producción.

El control biológico es un proceso complejo, que implica conocer todos los aspectos biológicos de la plaga y sus enemigos naturales (parasitoides, depredadores y patógenos), entre ellos la identificación específica, ciclo biológico, comportamiento e interacciones bióticas y abióticas. Asimismo, es fundamental conocer y predecir el impacto de estos agentes sobre la población de la especie objetivo en campo, con el propósito de seleccionar la especie o especies más adecuadas para obtener un control eficiente. Lo anterior se complica por las diferencias entre biotipos (parasitoides y depredadores) y cepas (patógenos).

Debido al hábitat subterráneo de las “gallinas ciegas” (GC), éstas son comúnmente infectadas por microorganismos y por tal razón son los agentes con mayor potencial de uso dentro del control microbiano de plagas (Villani *et al.* 1992). Algunos de estos agentes, como la bacteria *Serratia entomophila* Grimont, Jackson, Aegeon & Noonan en Nueva Zelanda (Jackson *et al.* 1992), el hongo *Beauveria brogniartii* en Suiza (Keller 1992) y el nemátodo *Steinernema carpocapse* en E.U.A. (Klein 1990) ya han sido utilizados para el control de GC. En México se han llevado a cabo investigaciones sobre la presencia y abundancia de patógenos de GC en suelos agrícolas. Sin embargo, no se cuenta con una revisión que acopie y compare los resultados

obtenidos. En el presente capítulo se analiza y discute la información publicada sobre patógenos de larvas y adultos de especies de *Paranomala* y *Phyllophaga* en México y se compara con datos generados en otros países.

NEMATODOS

Desde 1930 se ha investigado la posibilidad de controlar plagas del suelo con nemátodos entomopatógenos (NEP). Glaser (1932) y Glaser y Farell (1935) fueron los primeros en probar *Steinernema glaseri* contra larvas del escarabajo japonés *Popillia japonica*. Kaya (1985) evaluó *S. carpocapsae* en ensayos de campo y laboratorio, donde demostró la efectividad contra varias especies de “gallinas ciegas”. Kard *et al.* (1988) reportaron que los nemátodos *Heterorhabditis* spp. controlaron más del 60% de un complejo de larvas de las especies *Phyllophaga anxia* LeConte, *P. fusca* Frölich y *Polyphylla comes* Casey.

Los NEP han mostrado su capacidad para el control de plagas en ambientes crípticos y húmedos, tales como el suelo y dentro de tejidos vegetales (Kaya y Gaulger 1993, Georgis y Manweiler 1994). Las familias Heterorhabditidae y Steinernematidae incluyen a la mayoría de los NEP utilizados actualmente. Las dos familias tienen bacterias específicas, *Photorhabdus luminiscens* para los Heterorhabditidos y *Xenorhabdus* para los Steinernematidos. Estas bacterias son necesarias para la digestión de los tejidos del huésped, de esta manera los nemátodos tienen un medio con suficientes nutrientes para su desarrollo.

Algunas de las limitaciones para la utilización de los nemátodos a una mayor escala, son la falta de consistencia de control en el campo (Alatorre-Rosas 1999), baja tolerancia a temperaturas >30 °C (Grewal *et al.* 1994), a contenidos de humedad $a_w < 0.86$ (Strauch *et al.* 2004) y falta de métodos adecuados para la producción masiva y formulación (Burges 1998, Fridlender 2000).

Ciclo de Vida

Los NEP pasan por tres etapas principales de desarrollo: huevo, etapas juveniles y adultos. Las etapas juveniles son cuatro. La primera muda ocurre dentro del huevo, al emerger los nemátodos como juveniles de segundo estadio. El carácter más distintivo de los NEP es la presencia de un estadio infectivo de vida libre, denominado Infeccioso Juvenil (JI). El JI es el tercer estadio juvenil, el cual está todavía rodeado por la cutícula del estadio anterior. Este es un estadio con cierta tolerancia a temperaturas extremas y baja humedad en el suelo. Antes de alcanzar el estadio adulto, los NEP mudan su cutícula hasta cuatro veces. Estas mudas pueden ocurrir tanto en el medio ambiente como dentro del insecto huésped.

El ciclo de vida de las especies de Heterorhabditidae y Steinernematidae inicia con la penetración de los infectivos juveniles (JI's) al insecto huésped, generalmente en estadio larvario. De acuerdo a la familia a la que pertenecen, los NEP tienen dos ciclos distintivos de reproducción. En la familia Heterorhabditidae, los JI's maduran y dan lugar a individuos hermafroditas, los cuales posteriormente dan paso a una o varias generaciones amfimíticas (compuestas por hembras y machos). En cambio, en la familia Steinernematidae, los JI's se transforman en hembras o machos, por lo cual todas las generaciones son amfimíticas. Al cabo de 2-3 generaciones, los nemátodos emergen del cadáver del huésped como JI's (Fig. 1A), sobre todo si el huésped es pequeño y existen condiciones de humedad adecuadas.

La transmisión de la bacteria simbiótica por el JI es esencial para que el nemátodo parasite y mate exitosamente al insecto, así como para su reproducción (Han y Ehlers 2000). El JI regurgita la bacteria, por lo que podría decirse que los NEP son bacteriófagos (Ciche y Ensign 2003). Sin embargo, clasificarlos como bacteriófagos ignoraría otras adaptaciones, entre ellas la simbiosis nemátodo-bacteria (Ciche 2007).

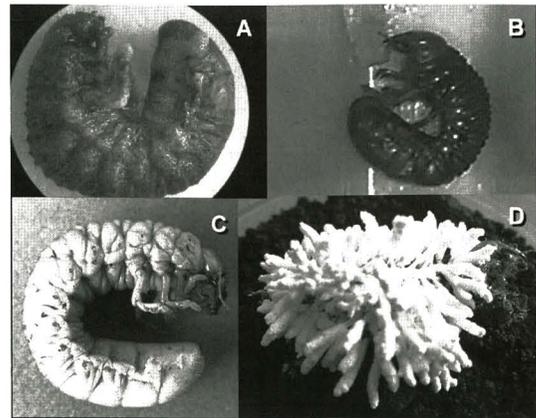


Figura 1. “Gallinas ciegas” infectadas por diversos entomopatógenos. (A) Larva de *Phyllophaga* sp. parasitada por *Steinernema glaseri* (foto cortesía de Julián Hernández). (B) Larva de *Phyllophaga blanchardi* infectada con la bacteria *S. entomophila* (cepa Mor4.1); la larva muestra inhibición en la alimentación y el desarrollo de una coloración oscura (foto cortesía de Zitlhally Rodríguez). (C) Larva rosada, coloración típica de infección por *Beauveria bassiana*; (D) Esporulación de *B. bassiana* sobre el cadáver de una larva.

Modo de Acción

Una vez que la bacteria simbiótica es liberada en el hemocele del insecto, ocurre una reproducción acelerada de la bacteria, que ocasiona la muerte del huésped por septicemia en menos de 48 horas. La toxicidad de la bacteria es alta ($DL_{50} < 10$ bacterias/larva) cuando se inyecta en el hemocele del insecto (Milstead 1979). Los JI's producidos sin la bacteria no causan mortalidad a los insectos (Han y Ehlers 2000).

Rango de Huéspedes y Uso

Los NEP infectan distintas especies plaga dentro de los órdenes Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, Orthoptera, Blattodea y Siphonaptera, la mayor parte en su estadio larvario (Koppenhofer 2000). En el Cuadro 1 se presentan las plagas susceptibles de controlar con distintos NEP.

Cepas Mexicanas

Los nemátodos entomopatógenos con mayor potencial para el control de insectos plaga edafí-

Cuadro 1. Cultivos donde se han utilizado nemátodos entomopatógenos para el control de plagas. Fuente: Koppenhofer 2000.

Cultivos	Nombre común	Familia	Nemátodos utilizados*
Pastos	Picudo	Curculionidae	<i>S. carpocapsae</i> , <i>H. bacteriophora</i>
Banano, remolacha, cítricos, ornamentales, camote.	Picudo de la raíz	Curculionidae	<i>S. carpocapsae</i> , <i>H. bacteriophora</i>
Papa, camote, remolacha, hortalizas	Pulga saltona	Chrysomelidae	<i>S. carpocapsae</i>
Maíz, cacahuete, hortalizas	Gusano raicero	Chrysomelidae	<i>S. carpocapsae</i> , <i>S. riobravis</i>
Maíz, papa, pastos, ornamentales, fresas	Gallina ciega	Scarabaeidae	<i>S. carpocapsae</i> , <i>H. bacteriophora</i> , <i>Heterorhabditis megidis</i>
Champiñón, ornamentales, hortalizas	Mosca del champiñón	Sciaridae	<i>S. feltiae</i>
Maíz, algodón, cacahuete, pastos, hortalizas	Gusano soldado y trozador	Noctuidae	<i>S. carpocapsae</i>
Arándano, ornamentales, pastos	Gusano telarañero	Pyralidae	<i>S. carpocapsae</i>
Calabaza, ornamentales, frutales arbustivos	Barrenador del tallo	Sesiidae	<i>S. carpocapsae</i>
Manzana, pera	Polilla leopardo	Cossidae	<i>S. carpocapsae</i>
Pastos, hortalizas	Grillotopo	Gryllotalpidae	<i>Steinernema scapterisci</i>

colas pertenecen a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae. En una colecta realizada en ocho regiones de Oaxaca durante 1998 y 1999, se tomaron 446 muestras de suelo. El mayor porcentaje de muestras positivas se obtuvo en suelos de textura media con humedad suficiente para mantener vegetación durante la mayor parte del año. Se identificaron las especies *Steinernema feltiae* Filepjev, *Steinernema* sp., y *Heterorhabditis* sp. (Ruiz *et al.* 2003a). Se concluyó que era necesario llevar a cabo colectas más extensivas en el futuro, especialmente en zonas templadas y aquellas con irrigación.

La Universidad de Colima, cuenta con un cepario de *Steinernema* spp. y *Heterorhabditis* spp. aisladas en los estados de Colima, Jalisco y Michoacán (Lezama-Gutiérrez *et al.* 2001), pero las especies no han sido identificadas. En el noreste de Tamaulipas y sur de Chihuahua, se han registrado *Steinernema* sp y *S. carpocapsae* mexicana (Raulston *et al.* 1992, Poinar 1990). Es

probable que una especie desconocida de *Steinernema* fuera *S. riobravis*, la cual fue aislada por Cabanillas y Raulston (1994) en el sur de Texas, cerca de la frontera con México. El Colegio de Posgraduados, en Montecillo, Mex., tiene una colección de NEP introducidos; además, esta institución conduce actualmente un proyecto nacional para localizar NEP nativos para controlar insectos rizófagos.

Evaluaciones en Laboratorio y Campo

Experimentos de laboratorio. En Oaxaca se evaluaron aislados locales de NEP, además de nemátodos procedentes de E.U.A., para determinar dosis y tiempos letales para el control de gallinas ciegas del género *Phyllophaga* Harris en 2^{do} y 3^{er} estadio. Las dosis letales medias variaron desde 87 a 105 nemátodos/larva para *Steinernema carpocapsae* Weiser y *S. glaseri* Steiner, hasta 146-263 nemátodos/larva para los cepas locales

S. feltiae, *Steinernema* sp., y *Heterorhabditis* sp. (Ruiz *et al.* 2003a).

También en Oaxaca, se realizaron experimentos de laboratorio durante 1999 a fin de evaluar el grado de control de gallinas ciegas al combinar nemátodos y hongos entomopatógenos. Los nemátodos más efectivos fueron *Heterorhabditis* sp. cepa Oax y *Heterorhabditis bacteriophora* cepa NC, con un 75 % de control. La combinación de cualquiera de los hongos, *Beauveria bassiana* o *Metarhizium anisopliae*, con *Heterorhabditis* sp. aceleró la mortalidad (TL₅₀) en dos días (Ruiz *et al.* 2000).

Experimentos de campo. Bajo condiciones semi-controladas (con bolsas plásticas de 10 L con suelo), con el hongo *M. anisopliae* se produjo el mayor desarrollo vegetativo en plantas de maíz; sin embargo, el porcentaje de control se incrementó cuando *Heterorhabditis* sp. cepa Oax fue usado con *B. bassiana* o *M. anisopliae*. Se concluyó que la combinación de hongos y nemátodos, incrementó la eficiencia en el control de las gallinas ciegas (Ruiz *et al.* 2000). Bajo condiciones de campo en Oaxaca, los rendimientos de maíz se incrementaron en un 17% con relación al testigo cuando *S. carpocapsae* y *M. anisopliae* fueron aplicados juntos, aunque con el insecticida Diazinon el incremento del rendimiento de grano fue 25% mayor que el testigo.

De acuerdo a Federici (2000), se requiere de experiencia especial y desarrollo de métodos específicos para evaluar el desempeño y eficacia de los agentes entomopatógenos en el laboratorio, pero lo mismo se requiere en las evaluaciones de campo, donde no se practica una “metodología estándar”. Por otro lado, todavía no se cuenta con muchos estudios de campo para la evaluación de la efectividad de los NEP en Latinoamérica.

Producción Comercial y Formulación

La producción masiva de NEP *in vivo* es común en México. Así, tanto en el CIIDIR-OAXACA, como en CIICA (Centro Internacional de Investigación y Capacitación Agropecua-

ria) en Tapachula, Chis., se producen especies como *S. feltiae* y *Heterorhabditis* sp., en larvas de *Galleria mellonella*. En el CINVESTAV-Zacateco se ha evaluado la fermentación líquida para la producción de *S. feltiae*. Se han determinado los requerimientos de oxígeno (Suárez 2002), así como los efectos de las condiciones hidrodinámicas (Chavarria 2001).

Dada la baja demanda por este tipo de bioinsecticidas, todavía se pueden comercializar en esponja de poliuretano, lo cual requiere refrigeración. En el CIIDIR-OAXACA se han realizado trabajos para la formulación de los NEP en pastillas de arcilla (Ruiz *et al.* 2006).

Perspectivas de Uso en México

Dada la alta biodiversidad de México, particularmente en los Estados del sur, es recomendable la realización de muestreos extensivos e intensivos de suelos para el aislamiento de cepas locales de NEP identificadas. Sin embargo, se deben aplicar bioensayos estandarizados y realizar estudios sistemáticos para incrementar el entendimiento de la ecología de los NEP, en especial los factores que condicionan la relación con sus huéspedes (Ruiz *et al.* 2002). También se requiere un mayor conocimiento de la taxonomía, biología y comportamiento de los nemátodos, así como las condiciones ambientales óptimas para fomentar su presencia y persistencia (Alatorre Rosas 1999).

La falta de métodos adecuados para la producción masiva y formulación, así como resultados erráticos, son todavía las limitantes principales para el uso extensivo de los NEP. Por consiguiente, se requiere de esfuerzos para adaptar a nivel local métodos de producción de bajo costo, así como formulaciones efectivas para conservar e incrementar su virulencia.

BACTERIAS

El problema para el control de plagas subterráneas, como es el caso de las larvas de algunos Scarabaeidae, es mayor en relación a las plagas de

las partes externas de la planta. El problema se debe al difícil acceso a los insectos en el medio edáfico, en donde existen muchas interacciones y se tienen que utilizar grandes cantidades del producto para lograr el efecto deseado. Para el control de insectos pertenecientes al orden Coleoptera se han identificado tres genes de la familia de proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bt), *cry8a*, *cry8b* y *cry8c*, cuyos productos son tóxicos contra estos insectos (Bravo *et al.* 1998). Para el control de larvas de escarabajos subterráneos, existe una cepa japonesa reportada de Bt conocida como “Buibui” que contiene genes del tipo *cry8c* con actividad insecticida específica para esos insectos (Hori *et al.* 1994). Recientemente se reportó el aislamiento en China de otra cepa de *B. thuringiensis* (Bt185) con un nuevo gene *cry8* que es activa contra la “GC asiática” *Holotrichia parallela* (Yu *et al.* 2006).

Se han reportado otras especies de bacterias con actividad insecticida de importancia para plagas subterráneas y se agrupan según sus características en dos tipos: las formadoras de esporas y las no formadoras de esporas. Además de Bt, las más importantes del primer grupo son: (a) *Paenibacillus popilliae*, anteriormente conocida como *Bacillus popilliae*, causante de la enfermedad “lechosa” en larvas del escarabajo japonés *Popillia japonica* Newman (Coleoptera: Scarabaeidae) (Klein 1988); (b) cepas del género *Serratia* como *Serratia marcescens* y *Serratia entomophila* (Enterobacteriaceae), esta última causante de la enfermedad ámbar en larvas del escarabajo *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae) (Jackson *et al.* 1993); (c) cepas simbioses de nemátodos como *Photorhabdus luminiscens* y *Xenorhabdus* spp. que producen infección y muerte en larvas susceptibles a nemátodos entomófagos de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* respectivamente; y (d) cepas de *Bacillus sphaericus* que son activas principalmente contra diferentes especies de mosquitos de los géneros *Culex* y *Anopheles* (Porter *et al.* 1993). Con respecto a las plagas subterráneas, recientemente se ha reportado la existencia de cepas de *B. sphaericus* en Turquía

con actividad insecticida contra larvas del escarabajo *Agelastica alni* L., (Coleoptera: Chrysomelidae) (Sezen y Demirbağ 2006) y *Amphimallon solstitiale* L. (Coleoptera: Scarabaeidae) (Sezen *et al.* 2005).

Modo de Acción

El común denominador de las bacterias entomopatógenas en su proceso infeccioso, una vez que son ingeridas por la larva del insecto, es la colonización del intestino como un primer evento, para seguir con la invasión del hemocele como un segundo evento. La bacteria puede replicarse en regiones determinadas del intestino, generalmente en el intestino medio, y producir toxinas y otros factores de virulencia, como enzimas hidrolíticas, que le permiten degradar la membrana peritrófica y ganar acceso al hemocele de la larva. Cuando la bacteria alcanza el hemocele, encuentra un medio rico en nutrientes que dispara nuevamente su replicación y la producción de factores de virulencia que le permiten sobrevivir enfrentando la respuesta inmune del insecto. La replicación alcanza tales niveles que la larva muere por septicemia.

La principal actividad insecticida de Bt se encuentra en los cristales, mismos que están conformados por proteínas tóxicas conocidas como Cry o d-endotoxinas que constituyen una familia de proteínas insecticidas. Algunas cepas de Bt también sintetizan las toxinas conocidas como Cyt (Guerchicoff *et al.* 2001) y otras toxinas conocidas como Vip (Estruch *et al.* 1996).

Las toxinas Cry son ingeridas por las larvas y solubilizadas en el intestino de los insectos susceptibles. La solubilización depende del pH del intestino medio del insecto que puede ser altamente alcalino, como ocurre en los lepidópteros y neutro a ligeramente ácido en algunos coleópteros (Dow 1986). En larvas de Scarabaeidae se reporta un pH alcalino en el intestino medio de larvas que se alimentan de humus (Lemke *et al.* 2003). Sin embargo el pH podría ser diferente en larvas que se alimentan de raíces por lo que la susceptibilidad a diferentes toxinas Cry podría

variar en función del grado de solubilización de las mismas en relación con el pH.

Una vez que las toxinas han sido solubilizadas, son procesadas proteolíticamente por las enzimas digestivas, lo cual conduce a su activación. Este procesamiento es crítico, tanto para la activación de la toxina como para definir la especificidad de la misma hacia los diferentes insectos (Haider y Ellar 1989). La especificidad de las toxinas Cry hacia los diferentes insectos esta determinada por la unión de las toxinas a receptores específicos localizados en las membranas del intestino de la larva y la exposición de diferentes regiones de las proteínas Cry a los diferentes receptores. El procesamiento también es importante como factor determinante de resistencia en los insectos (Oppert *et al.* 1997). Después del procesamiento, las toxinas se insertan en la membrana de las células del intestino para formar poros líticos. Esto causa un desbalance osmótico, lisis celular y muerte del insecto (Knowles 1994).

La bacteria *Paenibacillus popillia* es conocida como un patógeno obligado debido a que no esporula eficientemente *in vitro*. El nombre de la enfermedad proviene de la apariencia lechosa del hemocele de la larva enferma que es claro en larvas sanas. La apariencia lechosa viene del alto número de esporas generadas en la hemolinfa (alrededor de 10^9 esporas/larva) durante la infección (Zhang *et al.* 1997). Durante la esporulación, *P. popilliae* produce cristales proteicos paraesporales, cuyos genes codificantes han sido clonados y secuenciados. Dichos cristales no causan mortalidad en las larvas cuando son ingeridos. El modo de acción para la infección de *P. popillia* propone que la bacteria germina en el intestino de la larva, donde los cristales son liberados y activados. Las proteínas activas dañan la pared intestinal lo que permite a las células vegetativas invadir el hemocele del insecto, donde la bacteria se replica, esporula y produce la muerte del insecto.

El modo de acción de las bacterias del género *Serratia* se ha estudiado particularmente en *S. entomophila* (cepa A1MO2) en larvas de *Costely-*

tra zealandica. La bacteria coloniza el intestino larval después de ser ingerida del suelo por el insecto (Wilson *et al.* 1992). La infección causa inhibición en la alimentación (AFE) y desarrollo de una coloración ámbar (Jackson *et al.* 1993), así como una marcada disminución en los niveles de las principales enzimas digestivas de la larva (Jackson 1995). Los síntomas de la enfermedad son evidentes antes de la invasión de la bacteria al hemocele de la larva (Jackson *et al.* 1993), lo cual ocurre en etapas tardías de la enfermedad y posterior a la colonización del intestino larval. El hemocele del insecto constituye un medio rico en nutrientes, donde la bacteria es capaz de reproducirse y provocar la muerte de la larva por septicemia después de varias semanas desde el inicio de la infección.

La naturaleza de los determinantes patogénicos de *S. entomophila* no se ha clarificado completamente, sin embargo se ha mostrado que están codificados en un plásmido de 155 kb (Hurst y Glare 2002) y se ha sugerido que ciertas toxinas extracelulares están involucradas en la enfermedad. Se han identificado las proteínas denominadas AnfA y Anf B (Nuñez-Valdez y Mahanty 1996) así como los productos de los genes *sepA*, *sepB* y *sepC* (Hurst *et al.* 2000) como factores de virulencia causantes de AFE. El modo de acción a nivel molecular no está claro, sin embargo, hay evidencia genética que muestra que los factores responsables de AFE son parte de un grupo genético de gran tamaño que conforma un fago defectuoso (Hurst *et al.* 2004). Se piensa que el profago defectuoso podría formar una estructura tipo virus capaz de producir AFE y mortalidad a *C. zealandica* (Hurst *et al.* 2007). La bacteria muestra altos niveles de patogenicidad en ensayos de campo resultando en una reducción de la población de *C. zealandica* de más del 60% (Jackson *et al.* 1996).

El modo de acción de *S. marcescens* no se ha caracterizado con profundidad. La bacteria es conocida como un microorganismo facultativo, invasivo y oportunista por lo que aparentemente podría infectar solo a los individuos inmunológi-

camente más débiles dentro de una población de insectos. Aún cuando las infecciones producidas por la bacteria se han registrado continuamente en insectos (Grimont *et al.* 1979), incluidas larvas de Scarabaeidae (Poprawski y Yule 1990), el hecho de que la especie bacteriana también es capaz de producir infecciones en humanos, ha eliminado el interés de utilizarla como agente de control biológico. Sin embargo, actualmente ha resurgido el interés en el estudio de esta bacteria debido a su potencial como fuente de genes de proteínas con actividad tóxica o insecticida. Recientemente se identificó, clonó y expresó a partir de una cepa de *S. marcescens* una proteasa con actividad insecticida hacia langostas (Tao *et al.* 2007). De manera similar otros genes codificantes de toxinas proteicas tienen el potencial de ser clonados y expresados en otros microorganismos que sean inocuos para los seres humanos y que si pudieran utilizarse en un futuro como agentes de control biológico. El potencial de estos genes en el desarrollo de plantas transgénicas resistentes al ataque de plagas subterráneas capaces de expresar las toxinas únicamente en la raíz es prometedor.

Sintomatología

De manera general, los síntomas evidentes de una larva infectada por bacterias entomopatógenas son: (a) la inhibición en la alimentación que ocurre como un primer evento; (b) cambios en la coloración y la turgencia de la larva; (c) cambios en las evacuaciones intestinales; y (d) aletargamiento y finalmente la muerte de la larva (Fig. 1B). Estos síntomas pueden ir acompañados de una pérdida paulatina de peso, que varía según la especie bacteriana causante de la infección.

Se ha observado en bioensayos con larvas de *Phyllophaga* spp. que la inhibición en la alimentación puede ser reversible o irreversible (Nuñez Valdez *et al.* 2003), lo que significa que en el primer caso, la larva deja de comer, o disminuye su alimentación por un periodo relativamente corto después de haber ingerido la bacteria patógena. Después de este periodo, la alimentación normal

puede restablecerse si la bacteria patógena se retira del alimento. En el segundo caso, la larva detiene o disminuye su alimentación gradualmente y la alimentación normal no se restablece, lo cual implica la participación de una toxina. El cambio de color y turgencia ocurre paulatinamente y, en algunos casos, puede ir asociado con la invasión de la bacteria al hemocele de la larva. Los cambios en color pueden variar y van de blanquecino a pardo y negro. También pueden adquirir una coloración gris claro o bien desarrollar un color ámbar. Cuando la bacteria produce pigmentos, como es el caso de *S. marcescens*, la larva puede adquirir una coloración roja. Los cambios en la turgencia van asociados con la destrucción paulatina de los tejidos internos de la larva y generalmente anteceden a la muerte.

Los cambios en las evacuaciones intestinales pueden indicar cierta parálisis del intestino por lo que no hay excretas ni regurgitación, o bien puede presentarse una excesiva pérdida de líquido por lo que la larva puede sufrir deshidratación.

Distribución y Especificidad

Tres productos comerciales para el control de larvas de Scarabaeidae a base de bacterias entomopatógenas están disponibles a nivel comercial. Uno de ellos conocido como Doom[®] tiene como ingrediente activo la bacteria *P. popilliae*. Esta bacteria se ha utilizado para intentar suprimir el escarabajo japonés *Popillia japonica* en E.U.A. (Klein 1988). Sin embargo, su producción es limitada debido a que es un patógeno obligado. Existen dificultades para obtener esporulación *in vitro* por lo que su producción se obtiene mediante la esporulación *in vivo* con larvas del escarabajo (Klein 1981). El segundo producto conocido recibe el nombre de Buihunter[®], el cual se produce a partir de la cepa de Bt Buihui y esta disponible a pequeña escala en Japón. Esta cepa es activa contra *Paranomala donovani* Stephens, *Popillia japonica* (Suzuki *et al.* 1992, Hori *et al.* 1994) y *Exomala orientalis* Waterhouse (Alm *et al.* 1997). Sin embargo larvas de *Cyclocephala*

hirta LeConte y *Cyclocephala pasadenae* Casey no son completamente susceptibles a la cepa Buibui. El tercer producto se ha desarrollado como un producto comercial en Nueva Zelanda y se produce a partir de la bacteria *Serratia entomophila* (Enterobacteriaceae) (Grimont *et al.* 1988).

La actividad de estos productos no ha sido reportada en larvas de especies mexicanas; sin embargo se conoce que la enfermedad causada por *S. entomophila* (A1MO2) es altamente específica hacia larvas de *C. zealandica*. Es de gran importancia el aislamiento y la caracterización de cepas bacterianas nativas con actividad tóxica hacia larvas de Scarabaeidae de especies mexicanas.

Cepas Mexicanas

Se ha reportado la búsqueda y aislamiento de cepas bacterianas patógenas hacia diversas especies mexicanas de *Phyllophaga* spp. y *Paranomala* spp. (Nuñez-Valdez *et al.* 1999, 2003, 2007, 2008; Rodríguez-Segura *et al.* 2005). Se han aislado e identificado un total de 22 cepas, 11 de ellas del grupo de las formadoras de espora, Bt y *B. sphaericus* y 13 cepas del grupo de las no formadoras de espora. Estas últimas han sido identificadas con base en la secuencia del RNAr 16S como *S. marcescens*, *S. entomophila*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, y *Pseudomonas fluorescens*. Siete cepas de Bt podrían ser portadoras de genes nuevos parecidos al tipo *cry8* y una de ellas es portadora específicamente del gene *cry8C* (Nuñez-Valdez *et al.* 2003). Dos de las cepas de Bt y todas las no formadoras de espora, fueron aisladas a partir de larvas muertas con evidencias previas de enfermedad.

Es de especial interés el aislamiento de una cepa mexicana de la especie *S. entomophila*. A diferencia de la cepa neozelandesa (*S. entomophila* A1MO2) que es altamente específica hacia la especie *C. zealandica*, la cepa mexicana (*S. entomophila* Mor4.1) ha mostrado patogenicidad hacia varias especies de *Phyllophaga* (Nuñez-Valdez *et al.* 2007a) por lo que su rango de acción

podría ser amplio dentro del complejo “gallina ciega” conformado de especies y géneros diferentes. El potencial de esta cepa para ser usada para disminuir el daño causado por dicho complejo es prometedor.

Se ha reportado el aislamiento de dos cepas de *P. popilliae* a partir de *Phyllophaga crinita* y *Paranomala flavipencis* colectadas en México (Harrison *et al.* 2000). Una de las cepas es resistente y la otra sensible al antibiótico vancomicina, el cual es utilizado para el tratamiento de patógenos humanos que son resistentes a otros antibióticos. Harrison *et al.* (2000) plantean que México representa una zona de transición para la distribución de los genes de resistencia al antibiótico entre los patógenos de escarabajos. Este aspecto es interesante ya que México se encuentra localizado en una zona de transición biogeográfica, entre la región Neártica y la región Neotropical por lo que su biodiversidad es única y de gran riqueza (Halffter 1987). México posee una gran riqueza de especies de escarabajos por lo que se plantea que debe tener una gran riqueza de bacterias patógenas asociadas a ellos y puede representar una zona de distribución y evolución de microorganismos y sus genes. Las diferentes especies bacterianas mencionadas arriba son una muestra de esta gran diversidad.

Evaluaciones en Laboratorio y Campo

Se han identificado y evaluado una gama de cepas bacterianas de diferentes géneros con actividad entomopatógena a diferentes niveles. Las cepas han sido evaluadas en bioensayos orales en condiciones de laboratorio (Nuñez-Valdez *et al.* 2007, 2008). Unas especies provocan AFE en larvas de *Phyllophaga* spp y *Paranomala* spp. La inhibición va desde el 50% hasta el 90% bajo condiciones de laboratorio. Una de las cepas presenta un AFE reversible; es decir, inhibe la alimentación de la larva cuando la bacteria está presente en su alimento. Una vez que la misma se retira del alimento, la larva continúa con su alimentación. Algunas cepas que causan niveles altos de AFE causan también alta mortalidad en las larvas,

mientras que otras que causan un AFE relativamente bajo, no causan mortalidad significativa. Estas distintas características de los efectos de las cepas son importantes por su aplicación potencial dentro de la Agrobiotecnología. Por ejemplo, las bacterias pueden aplicarse con tres diferentes enfoques (a) si se busca la muerte del insecto como estrategia de control, se han identificado cepas que producen AFE y posteriormente la muerte; (b) ya que las larvas provocan el daño al alimentarse de las raíces y el efecto de algunas cepas inhibe tal proceso sin provocar la muerte del insecto, la probabilidad del desarrollo de resistencia a las toxinas involucradas en la patogenicidad, es menor, puesto que se disminuye la presión de selección (Núñez-Valdez 1993); y (c) si lo que se pretende es eliminar el daño del insecto y aprovechar la actividad benéfica del mismo en la fertilidad del suelo reorientando la actividad alimenticia de la larva de rizofagia a saprofagia, entonces se utilizarían cepas que inhiban la alimentación de manera reversible, como un sistema de control preventivo del daño. Este último enfoque presenta ventajas adicionales, como la mejora en la fertilidad de los suelos y un mejor aprovechamiento y conservación de los recursos (Núñez-Valdez *et al.* 2004). También evita el surgimiento de plagas secundarias y podría aprovechar además el potencial de las bacterias entomopatógenas mencionadas arriba que pertenecen a los géneros *Serratia*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Acinetobacter*, como promotoras de la germinación y el crecimiento vegetal. Resultados recientes han mostrado que algunas de estas cepas estimulan el proceso de germinación y se ha reportado que cepas de estos géneros presentan actividad estimulante del crecimiento vegetal.

No se han realizado pruebas con las cepas mencionadas para evaluar su potencial bajo condiciones de campo. Es de gran importancia iniciar su caracterización en invernadero y campo y seleccionar las que muestren mejores ventajas.

Perspectivas de Uso en México

En México, no está disponible ningún bioinsecticida de origen bacteriano para el control de

“gallina ciega”, por lo que es de gran relevancia la caracterización y el desarrollo de cepas bacterianas con potencial insecticida, así como aquellas capaces de producir inhibición de la alimentación contra estas larvas. Además, el uso de estos microorganismos como fuente de metabolitos con actividad tóxica, así como el aislamiento, la identificación y clonación de sus genes, es de gran relevancia para el desarrollo futuro de sistemas biotecnológicos en el control de estos insectos. Se han reportado 68 especies de “gallina ciega” como plagas potenciales en México (Morón, 1994), entre ellas las especies del género *Phyllophaga* como las más abundantes y dañinas. El control del daño causado por estos insectos deberá basarse en el futuro en el uso de productos amigables para el medio ambiente, como son las bacterias entomopatógenas, dentro de un programa de Manejo Integrado el cual se incluya en el marco de la agricultura sustentable (Villalobos 1992).

La búsqueda e identificación de cepas de *B. sphaericus* con actividad insecticida contra plagas subterráneas en otras regiones del mundo sería de gran utilidad, por el potencial de uso y las ventajas que presentan de mayor persistencia en aguas contaminadas comparada con la persistencia de las toxinas de *B. thuringiensis* en condiciones similares (Davidson *et al.* 1984). Por este motivo se puede esperar buen desempeño y persistencia de la bacteria *B. sphaericus* o las toxinas asociadas en un medio edáfico, donde las condiciones adversas para los microorganismos se incrementan.

HONGOS

Las condiciones de humedad y temperatura relativamente estables, así como la protección del suelo contra la luz ultravioleta, favorecen la infección de larvas de melolóntidos por hongos entomopatógenos (Villani *et al.* 1992). Sin embargo, los reportes tanto del patógeno como del huésped son frecuentemente incompletos, ya que los hongos son descritos solo de “Coleoptera” o “escarabajo” (Glare 1992). En México, los hon-

gos patógenos de melolóntidos han sido poco estudiados y solamente en algunos casos han sido identificados tanto el huésped como el patógeno, entre ellos *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (Villalobos 1992 y Hernández *et al.* 1996) y *Cordyceps* sp. (Villalobos 1992) como patógenos de *Phyllophaga* sp. Actualmente en la colección de hongos entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico se conservan 60 aislamientos de *M. anisopliae* y *Beauveria bassiana* purificados de larvas de melolóntidos.

Modo de Acción

Los hongos entomopatógenos usualmente causan la muerte del huésped por deficiencia nutricional, invasión o digestión de tejidos y liberación de toxinas. La infección por Deuteromycetes (*Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces*) es iniciada por conidios. El desarrollo de la micosis puede ser separado en tres fases: (1) adhesión y germinación del conidio sobre la cutícula del insecto, (2) penetración de la hifa en el hemocele y (3) desarrollo del hongo, lo cual generalmente resulta en la muerte del insecto (Ferron 1978, Bidochka *et al.* 1997).

Un prerrequisito para que se inicie el proceso de infección es la adhesión del conidio o de la unidad infectiva a la cutícula del insecto, si falta algún factor para que se realice la adhesión, la infección puede abortar (Hegedus y Kachaturians 1995, Hajek y St. Leger 1994). Debido a que el conidio y la cutícula del insecto son hidrofóbicos la primera interacción es pasiva (Charnley 1992, Bidochka *et al.* 1997).

La germinación es un proceso mediante el cual una espora emite uno o varios tubos germinativos que en algunos casos forman estructuras de adhesión llamadas apresorios, los cuales representan una adaptación para concentrar energía física y enzimática sobre una pequeña superficie del cuerpo del huésped, lo que hace más eficiente el proceso de penetración (Hajek y St. Leger 1994). El comportamiento germinativo de los conidios sobre la cutícula del huésped presenta

diversos patrones, desde la emisión de un tubo germinativo, el cual puede ser corto o largo y perforar o no el integumento, e inclusive no germinar (Lecuona *et al.* 1996), hasta la formación bidireccional o multidireccional de tubos germinativos, fenómeno que se ha asociado con la virulencia de las cepas (Talaie-Hassanloui *et al.* 2007).

Después de cruzar la barrera que representa el integumento, el hongo se desarrolla en el hemocele en presencia de reacciones defensivas celulares (Charnley 1992). Una vez en el hemocele, el hongo prolifera y se dispersa por el sistema circulatorio del insecto; los cuerpos hifales llenan el hemocele y el insecto muere con los tejidos invadidos y degradados; eventualmente la hifa emerge del cadáver produciendo conidios capaces de iniciar el ciclo una vez más. No obstante que el modelo ha sido comprobado con diferentes hongos y huéspedes, el mecanismo de invasión y proliferación dentro del insecto depende de interacciones específicas entre el insecto y el patógeno (Hegedus y Kachaturians 1995). La colonización de los diferentes órganos se produce en la siguiente secuencia: cuerpos grasos, sistema digestivo, tubos de Malpighi, hipodermis, sistema nervioso, músculos y traqueas. La muerte del insecto ocurre debido a la producción de micotoxinas, cambios patológicos en el hemocele, acción histolítica y bloqueo mecánico del aparato digestivo, secundario al crecimiento de las hifas. Después de 48 a 60 horas de la muerte del insecto, las hifas comienzan a emerger por los espiráculos, ano, boca y a través de las regiones intersegmentales. Después de la muerte del insecto, el hongo crece dentro del cadáver y todos los tejidos internos son penetrados por hifas filamentosas.

Sintomatología

La apariencia general de un insecto infectado por hongos entomopatógenos está asociada con el proceso de desarrollo de la enfermedad. Durante los estados iniciales de la infección, en los estados inmaduros del insecto, es frecuente

observar sobre la superficie del cuerpo diversas manchas necróticas de color pardo oscuro o negro, que 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 fisiológicas como convulsiones, carencia de coordinación y comportamientos alterados, ya que pierde actividad y reduce el apetito o deja de comer; en éste estado es frecuente observar el cambio de color en los estados inmaduros, con tonalidades oscuras o rosadas, tal como ocurre en infecciones por *Beauveria*, (Fig. 1C). En algunos casos, se ha observado la tendencia a desplazarse hacia la superficie del suelo. Finalmente, el insecto entra en un estado letárgico, se paraliza, muere y son cubiertos por una capa de micelio blanco si se trata de una infección provocada por *Beauveria* o *Verticillium* (Fig. 1D); verde oliva o ceniciento si la infección fue provocada por *Metarhizium*; blanco amarillento, rosa o rojo si corresponde a *Paecilomyces*. Finalmente, el

insecto se momifica sin perder su forma y tamaño. Como se mencionó anteriormente, los insectos muertos por hongos entomopatógenos no se descomponen y en consecuencia no despiden mal olor.

Cepas Mexicanas

En el Cuadro 2 se presentan las cepas de hongos aislados de “gallinas ciegas” en México, así como las cepas que presentan mayor potencial de control con base en su evaluación en laboratorio.

Evaluaciones en Laboratorio y Campo

Los hongos entomopatógenos más estudiados contra GC han sido *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Con base en la literatura disponible, los bioensayos contra insectos del suelo en México se registran a partir de los últimos 26 años, sin embargo, la mayor cantidad de trabajos de evaluación se han realizado en la última década (Zagal 1981, Berlanga y Hernández 1999, Ruiz-Vega *et al.* 2003, Nájera-Rincón *et al.* 2005, Rodríguez-del-

Cuadro 2. Cepas de hongos entomopatógenos con uso potencial contra “gallinas ciegas” en México.

Número de cepas	Género y especie	Huésped o substrato	Estado	Cepas con potencial en campo	Colección*
75	<i>B. bassiana</i>	<i>Phyllophaga spp.</i>	Michoacán Jalisco	6	CNRCB
20	<i>M. anisopliae</i>	<i>Phyllophaga spp.</i>	Michoacán Jalisco	4	CNRCB
9	<i>B. bassiana</i>	<i>Phyllophaga spp.</i>	Guanajuato	1	CINVESTAV
4	<i>M. anisopliae</i>	<i>Phyllophaga spp.</i>	Guanajuato	1	CINVESTAV
16	<i>B. bassiana</i>	<i>Phyllophaga spp.</i>	Chiapas	...**	ECOSUR
45	<i>B. bassiana</i>	<i>Phyllophaga spp.</i>	Michoacán	4	INIFAP
3	<i>M. anisopliae</i>	<i>Phyllophaga spp.</i>	Michoacán	0	INIFAP
9	<i>B. bassiana</i>	<i>Paranomala sp.</i>	Morelos	1	UAEM
7	<i>M. anisopliae</i>	<i>Phyllophaga sp.</i>	Morelos	1	UAEM
2	<i>M. anisopliae</i>	<i>Paranomala sp.</i>	Morelos	----	UAEM

*CNRCB: Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Dirección General de Sanidad Vegetal. CINVESTAV: Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Unidad Irapuato. ECOSUR: El Colegio de la Frontera Sur, Unidad San Cristóbal de Las Casas, Chiapas. INIFAP: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Uruapan, Michoacán. UAEM: Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Centro de Investigación en Biotecnología.

** No reportado aún.

Bosque *et al.* 2005, Hernández-Velázquez 2006, Velásquez-Cruz *et al.* 2006, Velásquez-López *et al.* 2006, Nájera-Rincón *et al.* 2006, Ruiz-Vega *et al.* 2006). Los bioensayos han sido tanto del tipo “prueba máxima” (Milner 1992) así como mediante la aplicación de concentraciones conocidas, con resultados promisorios que en algunos casos se encuentran a nivel de pruebas bajo condiciones de semi-campo o campo (Salazar *et al.* 1999, Nájera-Rincón *et al.* 2006, Ruiz-Vega *et al.* 2003, Ruiz-Vega *et al.* 2006).

Perspectivas de Uso en México

Existen diferencias contrastantes en los resultados de investigación, por lo que el principal reto para el trabajo con hongos entomopatógenos (HEP) deberá orientarse a normalizar y estandarizar protocolos, tanto para la elaboración de medios de cultivo, como tecnologías de producción y evaluación en laboratorio y campo (Laengle *et al.* 2005). Lo anterior con el objeto de integrar métodos y grupos de investigación capaces de generar resultados confiables, que demuestren el potencial y las ventajas del control microbiano con hongos entomopatógenos.

Será fundamental continuar con la búsqueda y selección de cepas altamente virulentas, así como iniciar investigaciones sobre su mejoramiento genético. Al mismo tiempo, será necesario incrementar la calidad en la producción, formulación y métodos de aplicación de los HEP (Strasser 2004). La producción y formulación de los HEP en forma comercial deberá regularse y registrarse bajo normas que aseguren la calidad y eficiencia de los productos, así como la suficiente asesoría para su manejo, aplicación y evaluación por parte de técnicos y productores. En la actualidad, estos agentes de control biológico se aplican sin un soporte científico, que asegure el éxito de su supervivencia, establecimiento, infección y permanencia en el ambiente.

Finalmente, es fundamental trabajar en la educación de técnicos y productores para que no conciban los HEP como una simple sustitución

de insumos, al compararlos frecuentemente con los insecticidas químicos convencionales.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es una contribución a los proyectos CONACYT No. 61816 y PROMEP/103.5/04/2862 (Aislamiento, identificación y evaluación de hongos entomopatógenos de gallina ciega *Phyllophaga* spp. de Morelos).

LITERATURA CITADA

- Alatorre-Rosas, R. 1999. Perspectivas del uso de nemátodos entomopatógenos en México. En: H. C. Arredondo-Bernal, J. Molina-Ochoa y V. M. Hernández-Velázquez (eds.), Potencial de Nemátodos Entomopatógenos en el Control de Plagas. Universidad de Colima, México. pp. 72-78.
- Alm, S. R., M. G. Villani, T. Yeh and R. Shutter. 1997. *Bacillus thuringiensis* serovar japonensis strain buibui for control of Japanese and Oriental beetle larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). Appl. Entomol. Zool. 32: 477-484.
- Baumann, P., M. A. Clark, L. Baumann and A. H. Broadwell. 1991. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxin. Microbiol. Rev. 55: 425-436.
- Berlanga-Padilla, A. M. y V. M. Hernández Velázquez. 1999. Búsqueda y selección de aislamientos de hongos entomopatógenos en larvas de gallina ciega, *Phyllophaga* spp. Memoria del XXXIV Congreso Nacional de Entomología. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Ags., México, 23-26 mayo. pp. 420-423.
- Bidochka, M. J., St. Leger R. J. and Roberts, D. W. 1997. Mechanism of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. Memoirs of the Entomological Society of Canada 171: 213-224.
- Bravo, A., S. Sarabia, L. López, H. Ontiveros, C. Abarca, A. Ortiz, M. Ortiz, L. Lina, F. J. Villalobos, G. Peña, M. E. Nuñez-Valdez, M. Soberón and R. Quintero. 1998. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. Appl. Environ. Microbiol. 164: 4965-4972.
- Burges, H. D. 1998. Formulation of mycoinsecticides. En: H. D. Burges (ed.). Formulation of Microbial Pesticides. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 131-186.

- Cabanillas H. E. and J. R. Raulston. 1994. Pathogenicity of *Steinernema riobravisi* against corn earworm, *Helicoverpa zea* (Boddie). *Fund. Appl. Nematol.* 17: 219-223.
- Carpusca, I., T. Jank and K. Aktories. 2006. *Bacillus sphaericus* mosquitocidal toxin (MTX) and pierisin: the enigmatic offspring from the family of ADP-ribosyltransferases. *Mol. Microbiol.* 62: 621-630.
- Chavarría H., N. 2001. Efecto de las condiciones hidrodinámicas sobre la propagación del nemátodo entomopatógeno *Steinernema feltiae* en cultivo monoxénico sumergido. CINVESTAV. IPN. Depto. de Biotecnología y Bioingeniería. México. 106 p.
- Ciche, T. 2007. The biology and genome of *Heterorhabditis bacteriophora* (February 20, 2007), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.135.1, <http://wormbook.org>. Consultado el 20 de noviembre de 2007.
- Ciche, T. A. and J. C. Ensign. 2003. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out?. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1890-1897.
- Darboux, I., C. Nielsen-LeRoux, J. F. Charles and D. Pauron. 2001. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 31: 981-990.
- Davidson, E. W., M. Urbina, J. Payne, M. S. Mulla, H. Darwazeh, H. T. Dulmage and J. A. Correa. 1984. Fate of *Bacillus sphaericus* 1593 and 2362 spores used as larvicides in the aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:125-129.
- Dow, J. A. T. 1986. Insect midgut function. *Adv. Insect. Physiol.* 19: 187-238.
- Estruch J. J., G. W. Warren, M. A. Mullins, G. J. Nye, J. A. Craig, M. G. Koziel. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 5389-5394.
- Federici, B. A. 2000. Foreword. p: ix-xi. EN: A. Navon and K. R. S. Archer (eds.), *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. CAB International, Oxon, UK. 324 p.
- Ferron, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annu. Rev. Entomol.* 23: 409-442.
- Ffrench-Constant, R. H., A. Dowling and N. R. Waterfield. 2007. Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. *Toxicol.* 49: 436-451.
- Fridlender, B. 2000. Biopesticides based on entomopathogenic nematodes, dream or reality? Abstracts of the XXI International Congress of Entomology, Vol. I, Foz do Iguassu, Brazil. p. 504.
- Georgis, R. and Manweiler. 1994. Entomopathogenic nematodes: a developing biological control technology. En: K. Evans (ed.), *Agricultural Zoology Reviews*, Vol. 6, Intercept, Andover, UK. pp. 63-94.
- Glare, T. R. 1992. Fungal pathogens of scarabs. En: T. A. Jackson y T. R. Glare (eds.), *Use of Pathogens in Scarab Pest Management*. Intercept. Andover, Hampshire, England. pp: 63-78.
- Glaser, R. W. 1932. Studies on *Neoplectana glaseri*, a nematode parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica*). New Jersey. Department of Agriculture Circ. No. 211.
- Glaser, R. W. and C. C. Farrell. 1935. Field experiments with the Japanese beetle and its nematode parasite. *J. New York Entomol. Soc.* 43: 345-348.
- González-Ramírez, M., R. Lezama-Gutiérrez, J. Molina-Ochoa, O. Rebolledo-Domínguez, M. López-Edwards and A. Pescador-Rubio. 2000. Susceptibility of *Mocis latipes* to *Heterorhabditis bacteriophora*. *J. Econ. Entomol.* 93: 1105-1108.
- Grewal, P. S., S. Selvan and R. Gaugler. 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breadth for infection, establishment and reproduction. *J. Therm. Biol.* 19: 245-253.
- Grimont, P.A.D., F. Grimont and O. Lysenko. 1979. Species and biotype identification of *Serratia* strains associated with insects. *Curr. Microbiol.* 2:139-142.
- Grimont, P.P.D., T. A. Jackson, E. E. Ageron and M.J. Noonan. 1988. *Serratia entomophila* sp. nov, a species associated with amber disease in the New Zealand grass grub, *Costelytra zealandica*. *Int. J. Syst. Bact.* 38:1-6.
- Guerchicoff, A., A. Dele'cluse and C. P. Rubinstein. 2001. The *Bacillus thuringiensis* cyt genes for hemolytic endotoxin constitute a gene family. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1090-1096.
- Haider, M. Z. and D. J. Ellar. 1989. Functional mapping of an entomocidal d-endotoxin: single amino acid changes produce by site directed mutagenesis influence toxicity and specificity of the protein. *J. Mol. Biol.* 208: 183-194.
- Hajek, A. E. and R. J. St. Leger. 1994 Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 293-322
- Halffter G. 1987. Biogeography of the Montane entomofauna of Mexico and Central America. *Annu Rev. Entomol.* 32: 95-114.
- Han, R. C. and R. U. Ehlers. 2000. Pathogenicity, development, and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic *in vivo* conditions. *J. Invertebr. Pathol.* 75: 55-58.
- Harrison, H., R. Patel and A. A. Yousten. 2000. *Paenibacillus* associated with milky disease in Central and South American scarabs. *J. Invertebr. Pathol.* 76:169-175.
- Hegedus, D. D. and Khachatourians, G. G. 1995. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnol. Adv.* 13: 455-490.

- Hernández-Velázquez, V. M. 2006. Enemigos naturales de larvas de *Phyllophaga* spp. (Coleoptera: Melolonthidae) y su potencial como agentes de control biológico. Memoria XXXII Simposio Nacional de Parasitología Agrícola. Ingenieros Agrónomos Parasitólogos. San Miguel de Allende, Gto., México. pp. 153-163.
- Hernández-Velázquez, V. M., A. M. Berlanga-Padilla, J. F. Pérez-Domínguez y E. Garza-González. 1996. Aislamiento de hongos patógenos de plagas de suelo en Jalisco y Nayarit. XIX Congreso Nacional de Control Biológico. 14 y 15 noviembre de 1996. Culiacán, Sin., México. pp. 5-7.
- Hori, H., N. Suzuki, K. Ogiwara, M. Himejima, L. S. Indrasith, S. Minami, R. Sato, M. Ohba and H. Iwahana. 1994. Characterization of larvicidal toxin protein from *Bacillus thuringiensis* serovar japonensis strain Buibui specific for scarabaeid beetles. J. Appl. Bacteriol. 76: 307-313.
- Hurst, M. R., T. R. Glare and T. A. Jackson. 2004. Cloning *Serratia entomophila* antifeeding genes - a putative defective prophage active against the grass grub *Costelytra zealandica*. J. Bacteriol. 186: 5116-5128.
- Hurst, M. R., T. R. Glare, T. A. Jackson and C. Ronson. 2000. Plasmid-located pathogenicity determinants of *Serratia entomophila*, the causal agent of amber disease of grass grub, show similarity to the insecticidal toxins of *Photobacterium luminescens*. J. Bact. 182: 5127-5138.
- Hurst, M. R. and T. R. Glare. 2002. Restriction map of the *Serratia entomophila* plasmid pADAP carrying virulence factors for *Costelytra zealandica*. Plasmid. 47: 51-60.
- Hurst, M. R., S. M. Jones, B. Tan and T. A. Jackson. 2007. Induced expression of the *Serratia entomophila* Sep proteins shows activity towards the larvae of the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. FEMS Microbiol. Lett. 275: 160-167.
- Jackson, T. A. 1995. Amber disease reduces trypsin activity in midgut of *Costelytra zealandica* Coleoptera:Scarabaeidae larvae. J. Invertebr. Pathol. 65: 68-69.
- Jackson, T. A., A. M. Huger and T. R. Glare. 1993. Pathology of amber disease in the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae). J. Invertebr. Pathol. 61: 123-130.
- Jackson, T. A., J. F. Pearson and M. O'Callaghan. 1992. Pathogen to product-development of *Serratia entomophila* (Enterobacteriaceae) as a commercial biological control agent for the New Zealand grass grub (*Costelytra zealandica*). En: T.A. Jackson y T.R. Glare (eds.), Use of Pathogens in Scarab Pest Management. Intercept Limited, Andover, Hampshire, England. pp. 191-198.
- Jackson, T. A., J. F. Pearson and G. Stucki. 1996. Control of grass grub *Costelytra zealandica* (White) (Coleoptera:Scarabaeidae), by application of the bacteria *Serratia* spp. causing honey disease. Bull. Ent. Res. 76: 69-76.
- Kard, B. M. R., F. Hain and W. M. Brooks. 1988. Field suppression of white grub species (Coleoptera: Scarabaeidae) by the entomogenous nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis heliothidis*. J. Econ. Entomol. 81: 1033-1040.
- Kaya, H. K. 1985. Entomogenous nematodes for insect control in IPM systems. En: M. A. Hoy y D. C. Herzog (eds.), Biological Control in Agricultural IPM Systems. Academic Press, New York. pp. 283-302.
- Kaya, H. K. and R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. Annu. Rev. Entomol. 38: 181-206.
- Keller, S. 1992. The *Beauveria-Melolontha* project: experiences with regrad to locust and grasshopper control. En: C. J. Lomer y C. Prior (eds.), Biological Control of Locusts and Grasshoppers. CAB International. pp. 279-286.
- Klein, M. G. 1981. Advances in the use of *Bacillus popilliae* for pest control. En: H. D. Burges (ed.), Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Academic Press, Inc., New York, pp. 183-192.
- Klein, M. G. 1988. Pest management of soil-inhabiting insects with microorganisms. Agric. Ecosyst. Environ. 24: 337-349.
- Klein, M. G. 1990. Efficacy against soil-inhabiting insect pests. En: R. Gaugler y H. K. Kaya (eds.). Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. pp. 195-214.
- Knowles, B. H. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxins. Adv. Insect. Physiol. 24: 275-308.
- Koppenhofer, A. M. 2000. Nematodos. En: L. A. Lacey y H. K. Kaya (eds.), Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 283-301.
- Laengle, T. B., C. Pernfuss, C. Seger and H. Strasser. 2005. Field efficacy evaluation of *Beauveria brongniartii* against *Melolontha melolontha* in potato cultures. Sydowia 57: 54-93.
- Lecuona, R., B. Papierok y G. Riba. 1996. Hongos entomopatógenos En: R. Lecuona (ed.), Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga. Buenos Aires, Argentina. pp. 35-60.
- Lemke, T, U. Stingl, M. Egert, M. W. Friedrich and A. Brune. 2003. Physicochemical conditions and microbial activities in the highly alkaline gut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). Appl. Environ. Microbiol. 69: 650-658.
- Lezama-Gutiérrez, R., J. J. Hamm, J. Molina-Ochoa, M. López-Edwards, A. Pescador-Rubio, M. González-Ramírez and E. L. Styer. 2001. Occurrence of entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican states of Michoacán, Colima, Jalisco and Tamaulipas. Fla. Entomol. 84: 23-30.

- McCoy, C. W., R. A. Samson and D. G. Boucias. 1988. Entomopathogenic fungi. En: C. M. Ignoffo (ed.), CRC Handbook of Natural Pesticides. Vol. V. Part. A. Entomopathogenus, Protozoa, and Fungi.
- Milner, R. J. 1992. The selection of strains of *Metarhizium anisopliae* for control of Australian sugarcane white grubs. En: T. A. Jackson y T. Glare (eds.), Use of Pathogens in Scarab Pest Management. Andover, U.K. Intercept. pp. 209-215.
- Milstead, J. E. 1979. *Heterorhabditis bacteriophora* as a vector for introducing its associated bacterium into the hemocoel of galleria-mellonella larvae. J. Invertebr. Pathol. 33: 324-327.
- Morón, M. A. 1994. Aspectos bioecológicos sobre Scarabaeidae (*sensu lato*) (Insecta: Coleoptera), Memorias. XXI Congreso Soc. Colombiana de Entomología. Colombia. pp. 151-158.
- Nájera-Rincón, M. B., T. A. Jackson y J. D. López-Mora. 2006. Hongos entomopatógenos para el control de *Phyllophaga vetula* (Horn) (Coleoptera: Melolonthidae) en cultivos de maíz en Zacapu, Michoacán, México. En: A. E. Castro Ramírez, M. A. Morón y A. Aragón (eds.), Diversidad, Importancia y Manejo de Escarabajos Edafícolas. Publicación Especial de El Colegio de la Frontera Sur, La Fundación Produce Chiapas, A. C. y la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. pp. 241-262.
- Nájera-Rincón, M. B., M. García-Martínez, R. L. Crocker, V. Hernández-Velázquez y L. A. Rodríguez-del-Bosque. 2005. Virulencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, nativos del Occidente de México, contra larvas de *Phyllophaga crinita* (Coleoptera: Melolonthidae) bajo condiciones de laboratorio. Fitosanidad 9: 33-36.
- Nájera-Rincón, M. B., V. M. Hernández y A. M. Berlanga. 2000. Banco de hongos entomopatógenos nativos del occidente de México: Un recurso para el manejo agroecológico de la "gallina ciega". Folleto Técnico No. 4 INIFAP-CENAPROS-SAGAR. México. 22 p.
- Núñez-Valdez, M. E. 1993. Perspectivas de la biología molecular en el control de larvas de Scarabaeidae de importancia agrícola, En: M. A. Morón (comp.), Diversidad y Manejo de Plagas Subterráneas. Publicación Especial de la Sociedad Mexicana de Entomología. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Veracruz, México. pp. 217- 233.
- Núñez-Valdez, M. E. and H. K. Mahanty. 1996. The *amb2* locus from *Serratia entomophila* confers anti-feeding effect on larvae of *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae). Gene 172: 75-79.
- Núñez-Valdez, M. E., M. A. Calderón, E. Aranda, L. Hernández, R. M. Ramírez-Gama, L. Lina, Z. Rodríguez-Segura, M. C. Gutiérrez and F. J. Villalobos. 2008. Identification of a putative *Serratia entomophila* mexican strain pathogenic against root damaging larvae of Scarabaeidae (Coleoptera). Appl. Environ. Microbiol. 74: 802-810.
- Núñez-Valdez, M. E., L. Hernández, Z. Rodríguez-Segura, A. Bravo y F. J. Villalobos. 2007. Actividad insecticida de cepas de *Bacillus sphaericus* (Bacillales: Bacillaceae) hacia larvas de Scarabaeidae (Coleoptera) de importancia agrícola. Memoria XXX Congreso Nacional de Control Biológico, 14-15 Noviembre, 2007, Mérida, Yucatán, México. pp. 150-253.
- Núñez-Valdez, M. E., F. J. Villalobos, S. Sarabia, M. A. Barreda, A. A. Romero, L. López y A. Bravo. 1999. Aislamiento de cepas de *Bacillus* spp. con actividad insecticida contra larvas de escarabajos Melolonthinae (Coleoptera: Scarabaeidae). Memoria del XXII Congreso Nacional de Control Biológico, Sociedad Mexicana de Control Biológico. Montecillo, Edo. de Méx., México. 28-29 Oct. p. 19.
- Núñez-Valdez, M. E., R. M. Ramírez-Gama, M. A. Calderón, L. Hernández, A. Romero, Z. Rodríguez-Segura, E. Aranda, A. Bravo y F. J. Villalobos. 2003. Bacterias entomopatógenas para el control de larvas de *Phyllophaga* spp. En: A. Aragón, M. A. Morón y A. Marín (eds.), Estudios sobre Coleópteros del Suelo en América. Publicación Especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. pp. 347-359.
- Núñez-Valdez, M. E., Z. Rodríguez-Segura, A. Gómez-Poupard, A. Romero-López y F. J. Villalobos. 2004. La agrobiotecnología como una estrategia promisoriosa para el manejo sustentable de la gallina ciega (Coleoptera: Scarabaeidae). En: C. A. Acosta-Durán, V. López-Martínez e I. Alía-Tejacal (eds.), Investigación Agropecuaria 2004. Publicación Especial de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Mor. México. pp. 74-80.
- Oppert, B., K. J. Kramer, R. W. Beeman, D. Johnson and W. H. McGaughey. 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. J. Biol. Chem. 272: 23473-23476.
- Poinar, G. O. 1990. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae, En: R. Gaulger y H. K. Kaya (eds.), Entomopathogenic Nematodes in Biological Control, CRC Press, Boca Raton. pp: 23-61.
- Poinar, O. G. and M. G. Thomas. 1978. Diagnostic Manual for the Identification of Insect Pathogens. Plenum Press. New York. 207 p.
- Poprawski, T. J. and W. N. Yule. 1990. Bacterial pathogens of *Phyllophaga* spp. (Col., Scarabaeidae) in southern Quebec, Canada. J. Appl. Entomol. 109: 414-422.
- Porter, A. G. E. W. Davidson and J. W. Liu. 1993. Mosquitoicidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. Microbiol Rev. 57: 838-861.
- Raulston, J. R., S. D. Pair, J. Loera and H. E. Cabañillas. 1992. Prepupal and pupal parasitism of *Helicoverpa zea*

- and *Spodoptera frugiperda* by *Steinernema* sp. in corn fields in the lower Río Grande Valley. J. Econ. Entomol. 85: 1666-1670.
- Ríos-Rosillo F. y S. Romero. 1982. Importancia de los daños al maíz por insectos del suelo. Folia Entomol. Mex. 52: 41-60.
- Rodríguez-del-Bosque, L. A. 1988. *Phyllophaga crinita* (Burmeister): Historia de una plaga del suelo. Tercera Mesa Redonda Sobre Plagas del Suelo. Sociedad Mexicana de Entomología Morelia, Mich., México. pp. 53-80.
- Rodríguez-del-Bosque, L. A., F. Silvestre, V. M. Hernández, H. Quiroz y J. E. Throne. 2005. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Phyllophaga crinita* and *Anomala flavipennis* (Coleoptera: Scarabaeidae). J. Entomol. Sci. 40: 67-73.
- Rodríguez-Segura, Z., F. J. Villalobos, L. Hernández, E. Aranda, y M. E. Núñez-Valdez. 2005. Bacterias entomopatógenas para el manejo de los daños provocados por "gallina ciega" (Coleoptera: Scarabaeidae). Claridades Agropecuarias 146: 50-58.
- Ruiz-Vega, J., R. Alatorre-Rosas and H. C. Arredondo-Bernal. 2002. Entomopathogenic nematodes: Research and implementation in Mexico and Central America countries. XXXV Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Iguazu Falls, Brazil. Documentos of The Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento No. 184. pp. 123-127.
- Ruiz-Vega, J., T. Aquino and H. K. Kaya. 2000. Controlling white grubs (*Phyllophaga* spp.) with entomopathogenic nematodes and fungi in Oaxaca, México. XXXIII Congress of The Society for Invertebrate Pathology, August 13-18, 2000. Guanajuato, Mexico. p. 84.
- Ruiz-Vega, J., T. Aquino B., H. K. Kaya y P. Stock. 2003. Colecta y evaluación de nemátodos entomopatógenos para el control de gallinas ciegas *Phyllophaga vetula* (Horn) en Oaxaca, México. Folia Entomol. Mex. 42: 169-175.
- Ruiz-Vega, J., S. Girón-Pablo y T. Aquino. 2006. Umbrales económicos para el uso de entomopatógenos en el control de gallinas ciegas (*Phyllophaga vetula* Horn). En: A. E. Castro-Ramírez, M. A. Morón y A. Aragón (eds.), Diversidad, Importancia y Manejo de Escarabajos Edafícolas. Publicación Especial de El Colegio de la Frontera Sur, la Fundación produce Chiapas, A. C. y la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. pp: 263-274.
- Salazar-Solís, E., M. D. Salas y H. Vallecillos. 1999. Evaluación del hongo *Metarhizium anisopliae* en el control de gallina ciega *Phyllophaga* sp. (Coleoptera: Melolonthidae) en dos localidades del Estado de Guanajuato. Memoria del XXXIV Congreso Nacional de Entomología. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Ags., México. pp. 428-433.
- Sezen K, I. Demir, H. Kati and Z. Demirbag. 2005. Investigations on bacteria as a potential biological control agent of summer chafer, *Amphimallon solstitialis* L. (Coleoptera: Scarabaeidae). J. Microbiol. 43: 463-8.
- Sezen, K. and Z. Demirbag. 2006. Insecticidal effects of some biological agents on *Agelastica alni* (Coleoptera: Chrysomelidae) J. Biol. 61: 687-692.
- Strasser, H. 2004. Biocontrol of important soil dwelling pests by improving the efficacy of insect pathogenic fungi. Laimburg Journal 1: 236-241.
- Strauch, O., J. Oestergaard, S. Hollmer and R. U. Ehlers. 2004. Genetic improvement of the desiccation tolerance of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* through selective breeding. Biol. Control 31: 218-226.
- Suarez, J. 2002. Evaluación de la demanda específica de oxígeno en cultivo sumergido del nemátodo entomopatógeno *Steinernema feltiae* y de su bacteria simbionte *Xenorhabdus nematophilus*. CINVESTAV-IPN. Depto. Biotecnología y Bioingeniería. México. 73p.
- Suzuki, N., H. Hori., K. Ogiwara, S. Asano, R. Sato, M. Ohba and H. Iwahana. 1992. Insecticidal spectrum of a novel isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar japonensis. Biol. Control 2: 136-142.
- Talaci-Hassanloui, R., A. Kharazi-Pakdel, M. S. Goettel, S. Little and J. Mozaffari. 2007. Germination polarity of *Beauveria bassiana* conidia and its possible correlation with virulence. J. Invertebr. Pathol. 94: 102-107
- Tao, K., X. Yu, Y. Liu, G. Shi, S. Liu and T. Hou. 2007. Cloning, expression, and purification of insecticidal protein Pr596 from locust pathogen *Serratia marcescens* HR-3. Curr. Microbiol. 55: 228-33.
- Velásquez-Cruz, E., A. E. Castro-Ramírez y C. Ramírez-Salinas. 2006. Manejo agroecológico de "gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae). En: A. E. Castro-Ramírez, M. A. Morón y A. Aragón (eds.), Diversidad, Importancia y Manejo de Escarabajos Edafícolas. ECOSUR, Fundación Produce Chiapas, A. C. y Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. pp. 209-220.
- Velásquez-López, O., C. Ramírez-Salinas, A. E. Castro-Ramírez y A. Flores-Ricardez. 2006. Aislamiento y evaluación de cepas nativas del hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin de la "gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae) en los Altos de Chiapas. En: A. E. Castro-Ramírez, M. A. Morón y A. Aragón (eds.), Diversidad, Importancia y Manejo de Escarabajos Edafícolas. ECOSUR, Fundación Produce Chiapas, A. C. y Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. pp. 231-240.
- Villalobos, F. J. 1992. The potential of entomopathogens for the control of White grubs pests in Mexico. En: T. A. Jackson y T. R. Glare (eds.), Use of Pathogens in Scarab Pest Management. Intercept, Andover, Hampshire. pp. 253-260.

- Villani, M. G., S. R. Krueger and J. P. Nyrop. 1992. A case study of the impact of the soil environment on insect/pathogen interactions: scarab in turfgrass. En: T. A. Jackson y T. R. Glare (eds.), *Use of Pathogens in Scarab Pest Management*. Intercept Limited, Andover, Hampshire, England. pp: 111-126.
- Wilson, C. J., H. K. Mahanty and T. A. Jackson. 1992. Adhesion of bacteria *Serratia* spp. to the foregut of grass grub *Costelytra zealandica* (White) and its relationship to the development of amber disease. *Biocont. Sci. Tech.* 2: 59-64.
- Yu H, J. Zhang, D. Huang, J. Gao and F. Song. 2006. Characterization of *Bacillus thuringiensis* strain Bt185 toxic to the Asian cockchafer: *Holotrichia parallela*. *Curr. Microbiol.* 53: 13-17.
- Zagal-Figueroa, A. 1981. Patogenicidad de *Beauveria* sp. sobre *Diabrotica undecimpunctata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Folia Entomol. Mex.* 48: 12-13.
- Zhang, J., T. C. Hodgman, L. Krieger, W. Schnetter and H. Ulrich Schairer. 1997. Cloning and analysis of the first *cry* gene from *Bacillus popilliae*. *J. Bact.* 179: 4336-4341.