



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS  
NATURALES RENOVABLES

CARRERA INGENIERÍA AGRONÓMICA

“HONGOS ENTOMOPATÓGENOS POTENCIALES PARA EL  
CONTROL BIOLÓGICO DE *Phyllophaga* spp. EN SISTEMAS AGRÍCOLAS  
DE LA COMUNIDAD LA MATARA, CANTÓN SARAGURO”

*Tesis de grado previo a la obtención  
del Título de Ingeniero Agrónomo*

**Autora:**

Norma Elizabeth Morocho Paqui

**Directora:**

Dra. Marina Mazón Morales PhD

**Loja – Ecuador**

2021

## CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS



**UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE LOJA**

**Carrera de Ingeniería Agronómica**

Loja, 28 de agosto 2020

Por medio de la presente **CERTIFICO** que la Srta **Norma Elizabeth Morocho Paqui** con número de identidad 1950015048, estudiante de la Carrera de Ingeniería Agronómica, ha culminado el proyecto de tesis titulado **Hongos entomopatógenos potenciales para el control biológico de *Phyllophaga* spp. en sistemas agrícolas de la comunidad La Matara, cantón Saraguro** dentro del cronograma aprobado. Además, cumplo en informar que he revisado y aprobado el documento final de tesis, por lo que autorizo la continuación de los trámites de graduación.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad.

Atentamente:

**MARINA  
MAZON  
MORALES**

Firmado digitalmente  
por MARINA MAZON  
MORALES  
Fecha: 2020.08.28  
08:01:15 -05'00'

**Marina Mazón Morales, PhD.**  
**Directora de tesis**  
**Ci: 0151669991**

## CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Una vez cumplida la reunión de calificación del trabajo final de tesis titulado, **“HONGOS ENTOMOPATÓGENOS POTENCIALES PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Phyllophaga* spp. EN SISTEMAS AGRÍCOLAS DE LA COMUNIDAD LA MATARA, CANTÓN SARAGURO”**, de autoría de la Srta. Norma Elizabeth Morocho Paqui, egresada de la carrera de Ingeniería Agronómica, misma que ha incorporado todas las sugerencias efectuadas por el tribunal en el documento final, por tal motivo se procede a la aprobación y calificación del trabajo de Tesis de Grado.

En tal virtud, nos permitimos certificar que el trabajo final consolidado de investigación está acorde a los requerimientos de la carrera de Ingeniería Agronómica de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, por lo tanto, se autoriza continuar con los trámites pertinentes.

Loja, 08 de febrero del 2021

MARIA  
NATALIA  
MORALES  
PALACIO

Firmado digitalmente por  
MARIA NATALIA  
MORALES PALACIO  
Fecha: 2021.02.08  
15:20:53 -05'00'

Dra. Natalia Morales, PhD.

**PRESIDENTE**



Firmado digitalmente por:  
MARLENE LORENA  
MOLINA MULLER

Dra. Marlene Molina, PhD.

**VOCAL**



Firmado digitalmente por:  
JORGE ISAAC  
ARMIJOS  
RIVERA

Dr. Jorge Armijos, PhD.

**VOCAL**

## AUTORÍA

“Yo, **Norma Elizabeth Morocho Paqui**, declaro ser el autor del presente TRABAJO DE TESIS y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes Jurídicos de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma.

Declaro, que durante la investigación y elaboración de la tesis el uso de referencias publicadas por otros autores cumplió con las normas y regulaciones establecidas.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.”

**Autor:** Norma Elizabeth Morocho Paqui

**Firma:**



firmado electrónicamente por:  
**NORMA ELIZABETH  
MOROCHO PAQUI**

**Cédula de identidad:** 1950015048

**Fecha:** 01/03/2021

## CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, Norma Elizabeth Morocho Paqui, declaro ser la autora de la tesis titulada “**HONGOS ENTOMOPATÓGENOS POTENCIALES PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Phyllophaga spp.* EN SISTEMAS AGRÍCOLAS DE LA COMUNIDAD LA MATARA, CANTÓN SARAGURO**” como requisito para optar al grado de Ingeniero Agrónomo, por lo que autorizo al sistema bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos muestre a mundo la publicación intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Digital Institucional.

Los usuarios pueden hacer uso de este trabajo investigativo en las redes de información del país (RID) y del exterior, con las que mantenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por el plagio de dicha tesis que realice una tercera persona.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja a los 25 días del mes de febrero del dos mil veinte y uno firma el autor:

### DATOS DEL AUTOR

**Firma:**



firmado electrónicamente por:  
**NORMA ELIZABETH  
MOROCHO PAQUI**

**Autor:** Norma Elizabeth Morocho Paqui

**Cédula:** 1950015048

**Dirección:** Parroquia 28 de mayo Yacuambi

**Correo electrónico:** nemorochop@unl.edu.ec

**Celular:** 0994321434

### DATOS COMPLEMENTARIOS

**Directora de tesis:** Dra. Marina Mazón Morales, PhD.

**Tribunal de grado:**

**PRESIDENTA:** Dra. María Natalia Morales Palacio, PhD.

**VOCAL:** Dr. Jorge Isaac Armijos Rivera, PhD.

**VOCAL:** Dra. Marlene Lorena Molina Muller, PhD.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de Loja por abrirme las puertas de su alma mater, a la Carrera de Ingeniería Agronómica a su personal docente, por los valiosos conocimientos impartidos y su apoyo para seguir adelante día a día.

Agradezco a mi directora de tesis, PhD Marina Mazón por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como por haber tenido toda la paciencia del mundo durante el desarrollo de la tesis.

Mi agradecimiento a la Ing. Jeamel Ruiz, técnica del Laboratorio de Sanidad Vegetal, por su apoyo incondicional durante la ejecución de mi tesis, quien impartió su conocimiento y experiencias para que este trabajo culmine de la mejor forma.

A mis padres, hermanos, tíos y toda mi familia que contribuyeron con un granito de arena en toda mi formación académica.

## **DEDICATORIA**

Para comenzar un proyecto hace falta valentía y para culminarlo hace falta perseverancia y amor, es por ello que dedico este triunfo a Dios a la Virgen Santísima.

A mis padres Manuel y Laudina, gracias por su apoyo, consejos, comprensión, cariño y amor que me brindaron en todo momento, fueron mi motor e inspiración para seguir adelante gracias, por ser el pilar más importante en mi vida.

A mi amada hija Nara Itzel fuiste mi luz, fortaleza y motivación más grande para concluir con éxito este proyecto de tesis.

A mis hermanos gracias por su apoyo, pero sobre todo gracias por estar en otro momento tan importante en mi vida.

***Norma Morocho***

## ÍNDICE GENERAL

PORTADA.....	i
CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS.....	ii
CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iii
AUTORÍA.....	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
ÍNDICE GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivo general.....	2
1.2. Objetivo específico.....	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. El género <i>Phyllophaga</i> .....	3
2.2. Clasificación taxonómica.....	3
2.3. Ciclo biológico del género <i>Phyllophaga</i> .....	4
2.3.1. Huevo.....	4
2.3.2. Larva.....	5
2.3.3. Pupa.....	5
2.3.4. Adulto.....	6
2.4. Caracteres para la identificación de larvas de <i>Phyllophaga</i> spp.....	6
2.4.1. <i>Phyllophaga menestriesi</i> .....	7
2.4.2. <i>Phyllophaga obsoleta</i> .....	8
2.4.3. <i>Phyllophaga ravidia</i> .....	10



2.4.4. <i>Phyllophaga vicina</i> .....	12
2.5. Síntomas y daños del ataque de <i>Phyllophaga</i> spp.....	14
2.6. Estrategias de control para <i>Phyllophaga</i> spp.....	14
2.6.1. Control Biológico.....	15
2.6.1.1. Efecto de los factores bióticos y abióticos sobre los hongos entomopatógenos.....	15
2.6.1.2. Principales hongos entomopatógenos con acción parasítica en <i>Phyllophaga</i> spp.....	16
- <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	16
- <i>Beauveria bassiana</i> .....	17
- <i>Lecanicillium lecanii</i> .....	18
2.7. Modo de acción.....	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1. Localización del estudio.....	21
3.2. Metodología para el primer objetivo.....	22
3.3. Metodología para el segundo objetivo.....	23
3.3.1. Aislamiento de hongos entomopatógenos de larvas de <i>Phyllophaga</i> del suelo.....	23
3.3.2. Caracterización del aislado del hongo entomopatógeno.....	24
3.3.2.1. Crecimiento radial.....	24
3.3.2.2. Caracterización microscópica.....	25
4. RESULTADOS.....	27
4.1. Recolección y caracterización de larvas de <i>Phyllophaga</i> spp.....	27
4.2. Obtención de aislados de hongos entomopatógenos .....	29
4.2.1. Características macroscópicas <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	29
4.2.2. Morfología microscópica de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	30
5. DISCUSIÓN.....	33
6. CONCLUSIONES.....	35
7. RECOMENDACIONES.....	36
8. BIBLIOGRAFÍA.....	38
9. ANEXOS.....	40

## ÍNDICES DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico de <i>Phyllophaga</i> spp. en sus cuatro formas biológicas, tomado de (Oliveira <i>et al.</i> , 1996).....	4
<b>Figura 2.</b> Larva de tercer estadio de <i>Phyllophaga menetriesi</i> (Blanchard). A) Aspecto frontal de la cápsula cefálica. B) Epifaringe. C) Vista ventral mandíbula derecha. D) Vista ventral mandíbula izquierda. F) Vista mesial del ápice de la mala derecha. E) Aspecto dorsal de la maxila derecha. G) Vista dorsal del labio y el escleroma hipofaríngeo (Morón <i>et al.</i> , 2000).....	7
<b>Figura 3.</b> Raster de larva de tercer estadio <i>Phyllophaga menetriesi</i> (Cueva, 2014).....	8
<b>Figura 4.</b> Larva de tercer estadio de <i>Phyllophaga obsoleta</i> (Blanchard). A) Aspecto frontal de la cápsula cefálica. B) Epifaringe. C) Vista ventral mandíbula derecha. D) Vista ventral mandíbula izquierda. E) Aspecto dorsal de la maxila derecha (Moron <i>et al.</i> , 2000).....	9
<b>Figura 5.</b> <i>Phyllophaga obsoleta</i> . Larva de tercer estadio, vista frontal del raster (Moron <i>et al.</i> , 2000).....	10
<b>Figura 6.</b> Larva de tercer estadio de <i>Phyllophaga ravidia</i> : A) Aspecto frontal de la cápsula cefálica. B) Epifaringe. C) Vista ventral mandíbula derecha. D) Vista ventral mandíbula izquierda. E) Vista mesial del ápice de la mala derecha. G) Aspecto dorsal de la maxila derecha. F) Vista dorsal del labio y el escleroma hipofaríngeo (Moron <i>et al.</i> , 2000).....	11
<b>Figura 7.</b> Larva de tercer estadio, vista frontal del raster de <i>Phyllophaga ravidia</i> con palia longitudinal, (Cueva, 2014).....	12
<b>Figura 8.</b> Larva de tercer estadio de <i>Phyllophaga vicina</i> . A) Aspecto frontal de la cápsula cefálica. B) Epifaringe. C) Vista ventral mandíbula derecha. D) Vista ventral mandíbula izquierda. G) Aspecto dorsal de la maxila derecha. E) Vista mesial del ápice de la mala derecha. F) Vista dorsal del labio y el escleroma hipofaríngeo (Moron <i>et al.</i> , 2000).....	13
<b>Figura 9.</b> Vista frontal del Raster (región setal ventral del último segmento abdominal) en larvas de tercer estadio de <i>Phyllophaga vicina</i> (Cueva, 2014).....	14
<b>Figura 10.</b> Estructura de <i>Metarhizium anosopliae</i> , conidióforos y conidias unicelulares cilíndricas (Petlamul, 2012).....	17
<b>Figura 11.</b> Detalle de estructuras de <i>Beauveria bassiana</i> . A) Esporas esféricas levemente ovaladas. B) Hifas septadas. C) Conidióforos simples. D) Proliferación simpodial del conidióforo, E) Esquema del proceso de maduración de conidióforo a partir de un conidio (inferior) y vista de un conidióforo completo (superior izquierda) (Vázquez, 2013).....	18
<b>Figura 12.</b> Estructura de <i>Lecanicillium lecanii</i> fiálides con punta delgada por donde salen las conidias (Cañedo, 2004).....	19
<b>Figura 13.</b> Modo de acción de los hongos entomopatógenos al insertarse en el cuerpo del insecto (Bustillo, 2011).....	20

<b>Figura 14.</b> Ubicación geográfica del área de estudio.....	21
<b>Figura 15.</b> Alimentación de larvas de <i>Phyllophaga</i> con papa, en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad Nacional de Loja.....	23
<b>Figura 16.</b> Larva de <i>Phyllophaga</i> con signos iniciales de estar parasitada por hongos.....	24
<b>Figura 17.</b> Siembra del hongo extraído del insecto, para medir el crecimiento radial.....	26
<b>Figura 18.</b> Larva de tercer estadio de <i>Phyllophaga obsoleta</i> ; A antenas; B cabeza; C mandíbulas; D raster, observadas en el estereomicroscopio.....	28
<b>Figura 19.</b> Características microscópicas de <i>Metarhizium anisopliae</i> : A) colonia invertida; B) colonia de 15 días.....	31
<b>Figura 20.</b> Características microscópicas: A) Fiálides alargada de longitud variable con apice redondeado; B) Conidióforo largo y tabicado con presencia de fiálides.....	32
<b>Figura 21.</b> Características microscópicas: A) conidióforos individuales ampliamente ramificados; B) Conidio hialino unicelular y cilíndrico en forma de cadena.....	32
<b>Figura 22.</b> Esporas de <i>Penicillium</i> .....	33
<b>Figura 23.</b> Esporas de hongo <i>Fusarium</i> .....	33

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Recuento de larvas del tercer estadio del complejo “gallina ciega” colectas en la comunidad La Matara, cantón Saraguro.....	27
<b>Tabla 2.</b> Crecimiento radial del aislado (MN) de <i>Metarhizium anisopliae</i> durante 15 días.....	28

**“HONGOS ENTOMOPATÓGENOS POTENCIALES PARA EL  
CONTROL BIOLÓGICO DE *Phyllophaga* spp. EN SISTEMAS  
AGRÍCOLAS DE LA COMUNIDAD LA MATARA, CANTÓN  
SARAGURO”**

## RESUMEN

En los últimos años las larvas del género *Phyllophaga* se han convertido en un serio problema en la agricultura, causando pérdidas que van del 10 al 100 % de la producción, por lo que los agricultores se ven en la necesidad de combatir esta plaga con productos químicos, los cuales son por lo general altamente tóxicos. Las consecuencias ecológicas del uso de insecticidas causan gran preocupación en la actualidad, ya que, aunque el objetivo de estos productos es matar insectos plaga, también pueden tener un impacto letal o subletal en organismos que no son su objetivo, reducir o contaminar productos alimenticios para los niveles tróficos superiores o generar contaminación del agua y afecciones a la salud humana. Sabemos que en la naturaleza existe una gran diversidad de microorganismos, entre ellos los hongos entomopatógenos, capaces de controlar y reducir favorablemente la población larval de *Phyllophaga* spp., mitigando el daño a los cultivos y disminuyendo las pérdidas en la producción. Con base en lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo caracterizar y evaluar la incidencia de larvas del género *Phyllophaga* en diversos cultivos de la comunidad La Matara (cantón Saraguro), así como buscar y caracterizar hongos entomopatógenos presentes localmente atacando larvas de *Phyllophaga*. Como resultado se encontraron larvas de la especie *Phyllophaga obsoleta* (89 % de la población total colectada, distribuidas de forma general en los cultivos evaluados) y larvas del género *Cyclocephala* (únicamente en el cultivo de aguacate). Además, se determinó la presencia del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* parasitando larvas de *Phyllophaga*, el cual podría ser usado para un control biológico en la comunidad.

**Palabras clave:** *Phyllophaga* spp., hongos entomopatógenos, *Cyclocephala*, *Metarhizium anisopliae*.

## ***ABSTRACT***

In recent years the larvae of the genus *Phyllophaga* have become a serious problema in agricultura, causing losses ranging from 10 to 100 % of production, so farmers need to fight this pest with chemicals which are usually highly toxic. The ecological consequences of the use of insecticides are currently of great concern. The objective of these products is to kill insect pests, consequently they may cause a lethal or sub-lethal impact on non-target organisms, and may reduce or contaminate food products for higher trophic levels, increase water pollution and possibly affect human health conditions. In nature, there is a great diversity of microorganisms, including entomopathogenic fungi, capable of controlling and reducing the larval population of *Phyllophaga* spp., mitigating damage to crops, and reducing production losses. Based on that, the objective of this research was to characterize and evaluate the incidence of larvae of the genus *Phyllophaga* in several cultures within 'La Matara' community, Saraguro canton, as well as to seek and characterize entomopathogenic fungi locally attacking *Phyllophaga* larvae. As a result, larvae from *Phyllophaga obsoleta* (representing 89% of the total population collected, distributed in all the crops evaluated) and from *Cyclocephala* genus were identified (only in the avocado crop) . Also, the presence of *Metarhizium anisopliae* was confirmed parasiting *Phyllophaga* larvae in the agricultural soils of the community, which may be used for a biological control in La Matara.

**Keywords:** *Phyllophaga* spp., entomopathogenic fungus, *Cyclocephala*, *Metarhizium anisoplia*

## 1. INTRODUCCIÓN

En Ecuador cada vez es más difícil de ignorar la creciente preocupación que tienen los agricultores debido al ataque de las larvas de *Phyllophaga* spp., convirtiéndose en un gran problema para la agricultura, debido a su gran capacidad de adaptabilidad se encuentra distribuida en varias regiones del país, causando una serie de inconvenientes en el desarrollo y producción de los cultivos (Quijije, 1995; Cueva, 2014).

Estas larvas son una de las plagas de importancia mundial: habitan en el suelo a una profundidad de 15 a 25 cm y se alimentan de las raíces de las plantas destruyendo su sistema radicular. En estado larval, específicamente en instar tres, provocan los mayores daños a los cultivos, con pérdidas que van desde el 10 al 100 % de la producción (CATIE, 2011).

En la provincia de Loja se registra un solo estudio realizado por Tambo y Gonzales (1999), quienes investigaron las especies que causan mayor daño a los cultivos, sin buscar alguna alternativa de control para esta plaga.

La herramienta principal que se está utilizando para el control y erradicación de esta plaga es la aplicación de insecticidas granulados al suelo, Ruiz *et al* (2012), convirtiéndose en un problema más que una solución, según informes realizado por la FAO (2018), a nivel mundial cada año se rocían 4,6 millones de toneladas de plaguicidas químicos, provocando la más severa contaminación al agua, suelo y seres vivos en general, incluido el ser humano. Estudios preliminares del CATIE (2011), manifiestan que “*los pesticidas utilizados para el control de Phyllophaga spp. se encuentran entre los más tóxicos, siendo responsables de los casos más severos de intoxicación de los campesinos*”.

Debido al hábito subterráneo que *Phyllophaga* tiene durante su desarrollo larval es susceptible a la infección por microorganismos, siendo esta una alternativa para su control. Entre los microorganismos utilizados en el control biológico se encuentran los hongos entomopatógenos, que tienen la particularidad de parasitar a diferentes tipos de artrópodos (insectos y ácaros) y de encontrarse en los hábitats más variados. Entre estas



especies de hongos ampliamente reconocidas como bioinsecticidas se encuentran *Beauveria bassiana* (Bals) y *Metarhizium anisopliae* (Metschn.), las mismas han mostrado excelentes resultados en el control de varias plagas agrícolas, particularmente de larvas y adultos del género *Phyllophaga* (Rustiguel *et al.*, 2018).

Considerando lo antes mencionado, esta investigación se basa en profundizar los conocimientos existentes sobre esta plaga para lo cual, se hace necesario identificar taxonómicamente las especies del género *Phyllophaga*, sus preferencias alimenticias, su incidencia y nivel de daño que provoca en los cultivos. Así mismo, es esencial conocer las cepas nativas de hongos entomopatógenos que atacan a estas especies, para poder planificar una estrategia de manejo que pueda funcionar en la zona particular de estudio. Al aislar las cepas de dichos hongos se deja un campo abierto para la realización de estudios posteriores enfocados en el control de esta plaga.

#### 1.1. OBJETIVO GENERAL

- Generar una propuesta de control biológico para *Phyllophaga* spp. en sistemas agrícolas de la comunidad La Matara, cantón Saraguro.

#### 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las especies del género *Phyllophaga* de mayor incidencia en sistemas agrícolas de la comunidad La Matara, cantón Saraguro.
- Aislar y caracterizar hongos entomopatógenos de las especies de mayor incidencia de *Phyllophaga* spp. en la comunidad La Matara.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. El género *Phyllophaga*

Este género está distribuido en todo el mundo, tanto en climas tropicales como templados, desde los 50 hasta 2 550 m.s.n.m (Ruiz *et al.*, 2012).

Comúnmente, se le conoce como “gallina ciega o cutzo” constituye una plaga de gran importancia económica y una amenaza para la seguridad alimentaria, ya que estos insectos causan notables estragos en los cultivos al alimentarse de sus raíces; su voracidad aumenta cada año, así como su población debido a las nuevas posturas de las hembras (Olmedo, 2016).

### 2.2. Clasificación taxonómica

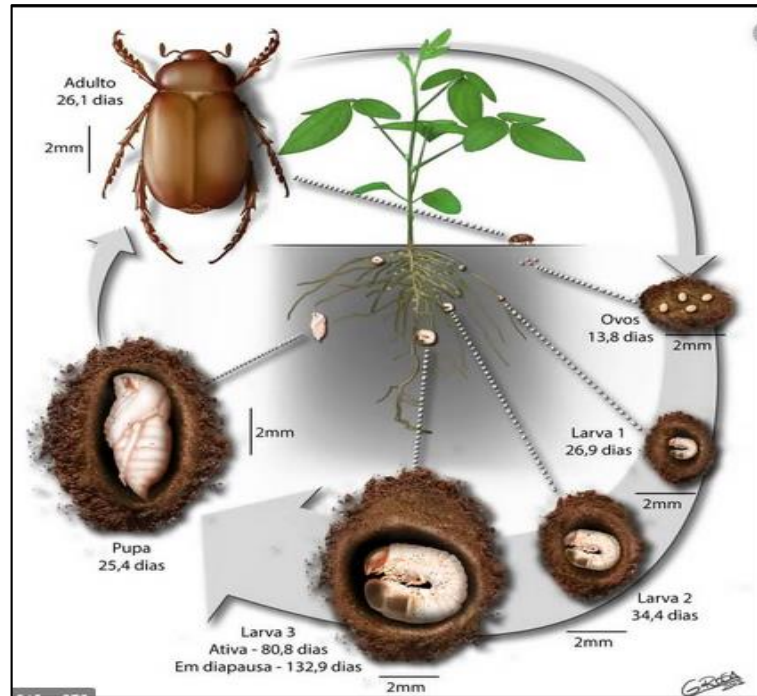
Según Morón (1986), el género *Phyllophaga* presenta la siguiente clasificación.

Reino	Animal
Phylum	Artropoda
Clase	Insécta
Orden	Coléoptera
Familia	Scarabaeidae
Género	<i>Phyllophaga</i>
Especie/s	<i>Phyllophaga</i> spp.

Estudios realizados en la provincia de Loja se han identificado dos especies: *Phyllophaga obsoleta* y *Phyllophaga menetriesi* (Tampo y González, 1999).

### 2.3. Ciclo biológico del género *Phyllophaga*

El ciclo de *Phyllophaga* es holometábolo, por lo que comprende las fases de huevo, larva, pupa y adulto (Fig. 1).



**Figura 1.** Ciclo biológico de *Phyllophaga* spp. en sus cuatro formas biológicas. Tomado de (Oliveira *et al.*, 1996)

### 2.3.1. Huevo

Pueden ser esferoides, elípticos o ligeramente cilíndricos, inicialmente ovales y de color blanco mate pero al final se tornan esféricos y ligeramente lustrosos; conforme se desarrolla el embrión, el huevo incrementa su volumen al doble de su tamaño inicial, eclosionando entre 10 y 14 días desde la puesta (King, 1994).

### 2.3.2. Larva

Las larvas tienen una longitud variable dependiendo del *instar* en el que se encuentren y de la especie a la que pertenezcan. Son de color blanco cremoso, la cabeza es de color café, las patas son muy peludas y desarrolladas (Bayer, 2009). Pasan por tres instares:

- **Instar 1:** en este estado las larvas de *Phyllophaga* spp. se alimentan de materia orgánica y raíces pequeñas, son susceptibles a condiciones ambientales desfavorables, así como a la falta de alimento, encharcamiento del suelo y

enfermedades fungosas o causadas por entomopatógenos, lo cual puede llevar rápidamente a la muerte de las larvas CATIE (2002). Las larvas del primer instar tienen una duración de 30 días y se pueden encontrar a 10 cm de profundidad (King, 1994).

- **Instar 2:** las larvas se alimentan de materia orgánica y raíces pequeñas CATIE (2002). Este instar tiene una duración de 60 días, encontrándose a 20 o 25 cm de profundidad en el suelo (King, 1994).

- **Instar 3:** las larvas que están en el instar 3 son gusanos de color blanco o cremoso, carnosos y arrugados, el cuerpo tiene la forma de una “C”. Es este instar en donde tiene la mayor importancia económica pues es estrictamente rizófaga, alimentándose vorazmente de las raíces secundarias y primarias de las plantas CATIE (2002). Tiene una duración de 120 días (King, 1994).

### 2.3.3. Pupa

Después de encontrarse bien alimentadas, las larvas expulsan su contenido intestinal y producen una celda en el suelo, en donde invierten una etapa de descanso pre-crisálida que por regla general dura 5 a 6 meses, antes de su transformación en pupa o crisálida requiriendo de un mes de desarrollo para emerger en su etapa adulta (Morón, 1986).

### 2.3.4. Adulto

El adulto recién mudado posee una cutícula blanda, y permanece en la celda pupal hasta que se endurece la quitina de la cutícula, se expanden las alas a su tamaño normal y maduran los órganos sexuales Bayer (2009).

Al emerger los adultos se alimentan principalmente de hojas de árboles; algunas de estas especies son: el malinche (*Delonix regia*), el guácimo (*Guazuma ulmifolia*) y la yuca (*Manihot esculenta*) Corrales (2017).

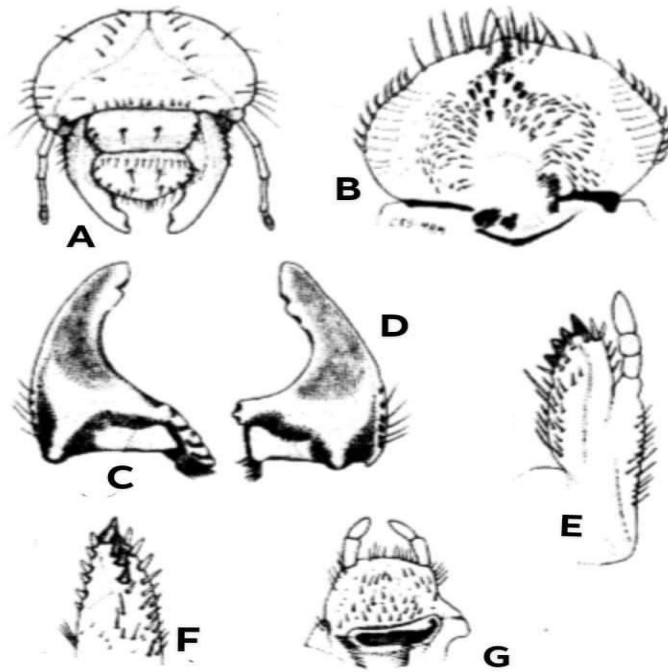
Tienen actividad nocturna, y una longevidad de 8 a 30 días, pero algunas hembras pueden vivir hasta 60 días (Morón, 1986).

## 2.4. Caracteres para la identificación de larvas de *Phyllophaga* spp

Para la identificación de las diferentes especies de *Phyllophaga*, se utiliza la característica más importante que es la forma del raster (región setal ventral del último segmento abdominal) en larvas de tercer estadio según como sugiere (Morón *et al.*, 2000). Adicionalmente, el pronoto (superficie dorsal del primer segmento del tórax) y los élitros (alas anteriores endurecidas) pueden ser caracteres diagnósticos en varias de las especies en estado adulto. Las especies más frecuentes son: *Phyllophaga valeriana*, *P. ravida*, *P. obsoleta*, *P. menestriesi* y *P. elenanssee* describiremos a continuación:

### 2.4.1. *Phyllophaga menestriesi*

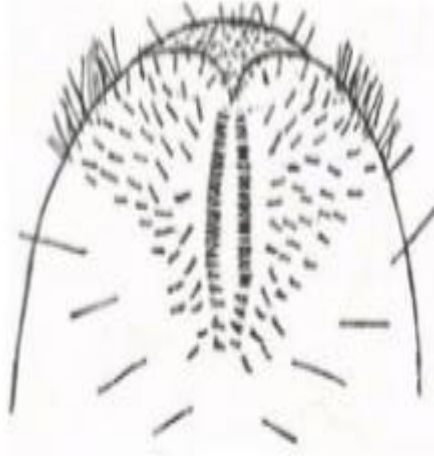
Larva de tercer estadio (Fig. 2): Cabeza; Anchura máxima de la cápsula cefálica: 5,62 a 6,25 mm; superficie del cráneo lisa, parda amarillenta, frente con una seda frontal exterior y una seda frontal posterior a cada lado y 9 a 15 sedas frontales anteriores, con una seda en los ángulos anteriores de la frente; el resto de la superficie craneal con dos o tres sedas dorso epicraneales, tres a cuatro sedas epicraneales y ocho o diez sedas a cada lado. Clípeo con dos sedas centrales y dos sedas laterales a cada lado. Labro ligeramente asimétrico, con los márgenes laterales redondeados, 10-13 sedas posteriores, dos sedas centrales y cuatro o cinco sedas laterales a cada lado. Manchas oculares ausentes (Fig. 2A). Epifaringe sin *zygum* y con *epizygum* alargado, irregular, pardo oscuro; haptomero prominente con 8 a 12 heli; cada *plegmation* formado con 9-13 *plegmata* anchos.



**Figura 2.** Larva de tercer estadio de *Phyllophaga menetriesi* (Blanchard). A) Aspecto frontal de la cápsula cefálica. B) Epifaringe. C) Vista ventral mandíbula derecha. D) Vista ventral mandíbula izquierda. F) Vista mesial del ápice de la mala derecha. E) Aspecto dorsal de la maxila derecha. G) Vista dorsal del labio y el escleroma hipofaríngeo (Moron *et al.*, 2000).

*Dexiophoba* amplia y fragmentada y *laeophoba* grande, extendida a través del borde de la *laeotorma*. *Dexiotorma* casi recta; *laeotorma* corta; apotorma aguda pequeña o inapreciable; epitorma indefinida; *haptolachus* reducido, en parte cubierto por la *dexiophoba*. Placa esclerosada reducida, estrecha, angulosa. Cono sensorial pequeño. *Chaetoparia* moderadamente desarrollada con pocas sensilas en el límite de la *gymnoparia* (Fig. 2B). Mandíbula 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 con el lóbulo distal bien desarrollado; con tres a cuatro sedas dorso molares; acia corta y redondeada; brustia multisetosa (Fig. 2D). Área molar de la mandíbula derecha con el lóbulo distal poco desarrollado; calx prominente. (Fig. 2C). Maxilas con un uncus terminal en la galea y tres uncí alineados en la lacinia, y con hileras de cinco a seis heli a cada lado (Fig. 2F). Área estriduladora maxilar con 11-18 dientecillos sin proceso anterior definido (Fig. 2E). Escleroma hipofaríngeo asimétrico, con el lado derecho muy prominente (Fig. 2G).

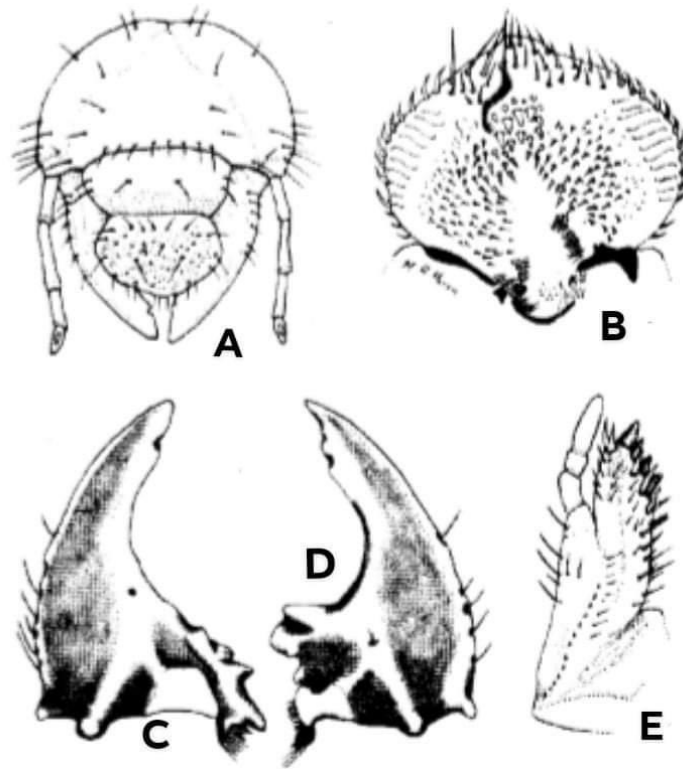
Raster con un par de palidia longitudinales que se aproximan al borde del labio anal inferior (Fig. 3).



**Figura 3.** Raster de larva de tercer estadio *Phyllophaga menetriesi* (Cueva, 2014).

#### 2.4.2. *Phyllophaga obsoleta*

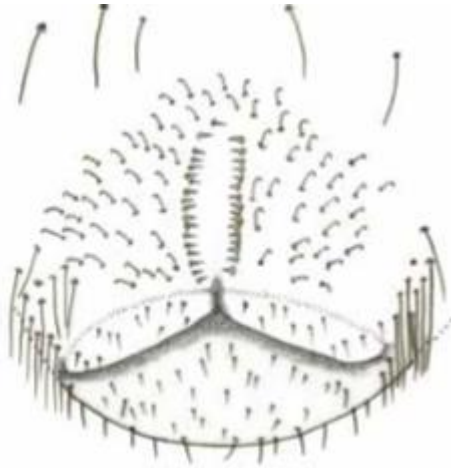
Larva de tercer estadio (Fig. 4): Cabeza. Anchura máxima de la cápsula cefálica: 4,16 a 4,83 mm. Superficie de cráneo casi lisa, pardo amarillenta. Frente con una seda frontal exterior y 1 seda frontal posterior a cada *lado*; y 8 o 13 sedas frontales anteriores; con una seda en los ángulos anteriores a la frente; el resto de la superficie craneal con una o dos sedas dorso epicraneales, tres o cuatro sedas epicraneales y cinco o nueve sedas paraocelares a cada lado. Clípeo con dos sedas centrales y dos sedas laterales a cada lado. Labro simétrico, con los márgenes laterales redondeados, 5 o 12 sedas posteriores, dos sedas centrales y cuatro o cinco sedas laterales a cada lado. Manchas oculares ausentes (Fig. 4A). Epifaringe sin *zygum* y con *epizygum* estrecho, irregular, pardo oscuro; *haptomerum* moderadamente prominente con ocho o diez heli; cada *plegmatium* formado de 9 o 14 *plegmata*. *Dexiophoba* fragmentada y *laeophoba* grande, extendida a través del borde de la *laeotorma*. *Dexiotorma* casi recta; *laeotorma* corta; apotorma aguda o bífida; epitorma vagamente indicada. Haptolachus parcialmente cubierto por la dexiophoba. Placa esclerosada reducida, estrecha, angulosa. Crepis bien diferenciado. Cada acanthoparia con 7 -10 sedas espiniformes recurvadas.



**Figura 4.** Larva de tercer estadio de *Phyllophaga obsoleta* (Blanchard). A) Aspecto frontal de la cápsula cefálica. B) Epifaringe. C) Vista ventral mandíbula derecha. D) Vista ventral mandíbula izquierda. E) Aspecto dorsal de la maxila derecha (Moron *et al.*, 2000).

*Chaetoparia* moderadamente desarrollada con numerosas sensilas en el límite con la gymnoparia (Fig. 4B). 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 con el lóbulo distal bien desarrollado con 3 a 4 sedas dorso molares; acia reducida; brustia densamente setosa (Fig. 4D); área molar de la mandíbula derecha con el lóbulo distal poco desarrollado; calx prominente y brustia densamente setosa (Fig. 4C). Área estriduladora maxilar de 11-15 dientecillos (Fig. 4E). Raster con un par de palidia longitudinales ligeramente convergentes en ambos extremos, con longitud de 1,50 a 1,83 mm, definen una septula estrecha y se encuentran separadas en su parte central por un espacio de 0,42 a 0,58 mm (Fig. 5).

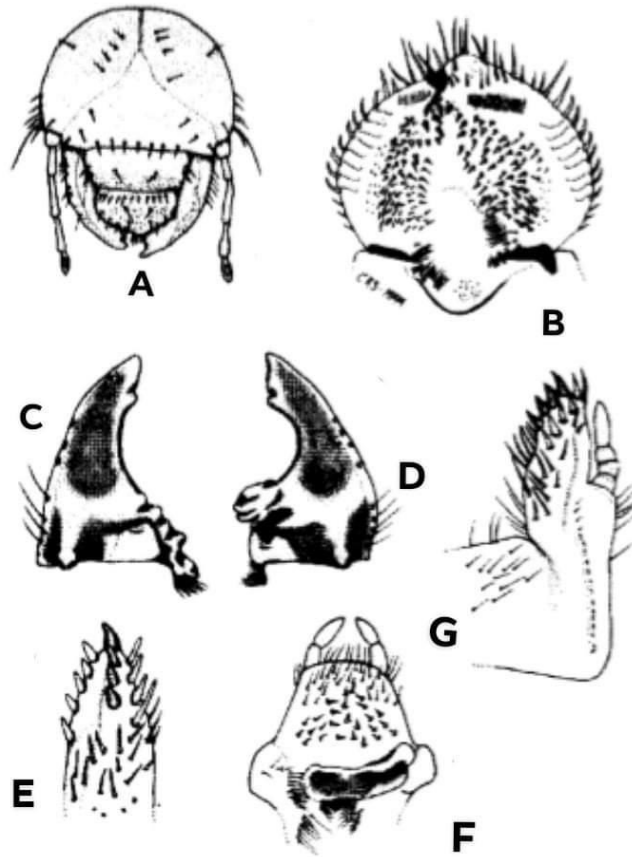




**Figura 5.** *Phyllophaga obsoleta*. Larva de tercer estadio, vista frontal del raster (Moron *et al.*, 2000).

#### 2.4.3. *Phyllophaga ravidia*

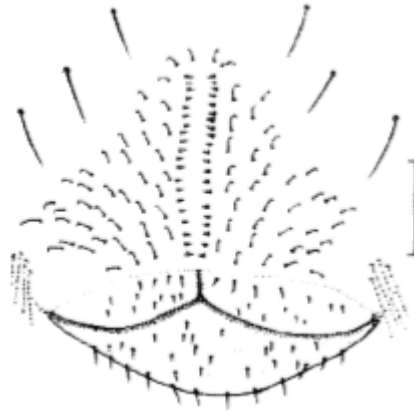
Larva de tercer estadio (Fig. 6): Cabeza. Anchura máxima de la cápsula cefálica: 4,58 a 5,16 mm. Superficie del *cranium* casi lisa, parda amarillenta. Frente con 1 seda frontal exterior y una seda frontal posterior a cada lado, y 7 o 12 sedas frontales anteriores, con una seda en los ángulos anteriores de la frente, ~1 resto de la superficie craneal con uno o tres sedas dorso epicraneales, tres o cuatro sedas epicraneales y ocho o nueve sedas paraocelares a cada lado. Clípeo con dos sedas centrales y dos sedas laterales a cada lado. Labro simétrico a ligeramente asimétrico, con los márgenes laterales redondeados, 8 a 12 sedas posteriores, dos sedas centrales, dos sedas antera-centrales y 4 sedas laterales a cada lado. Manchas oculares ausentes (Fig. 6A). *Epifaringe* sin *zygum* y con *epizygum* alargado y angosto, irregular, pardo obscuro; *haptomerum* prominente con ocho o un heli; cada *plegmatium* formado con 9-13 *plegmata* ampliamente separados. *Proplegmatia* 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.



**Figura 6.** Larva de tercer estadio de *Phyllophaga ravidia* (Blanchard). A) Aspecto frontal de la cápsula cefálica. B) Epifaringe. C) Vista ventral mandíbula derecha. D) Vista ventral mandíbula izquierda. E) Vista mesial del ápice de la mala derecha. G) Aspecto dorsal de la maxila derecha. F) Vista dorsal del labio y el escleroma hipofaríngeo (Moron *et al.*, 2000).

Cada *acanthoparia* con ocho a diez sedas espiniformes recurvadas. *Chaetoparia* bien desarrollada con pocas sensilas en el límite de la *gymnoparia* (Fig. 6B). Mandíbulas sin área estriduladora ventral. Áreas incisivas de ambas mandíbulas con una lámina cortante distal separada de un diente incisivo proximal por una escotadura incisiva; márgenes internos sin dientes; área molar de la mandíbula izquierda (Fig. 6C) con el lóbulo distal bien desarrollado; con cuatro a cinco 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. 6D). Maxilas con un uncus terminal en la *galea* y tres unci alineados en *lacinia*, y con cuatro a cinco heli a cada lado (Fig. 6E). Área estriduladora maxilar con 11 a 14 dienteillos agudos, sin proceso anterior definido (Fig. 6F). Escleroma hipofaríngeo asimétrico con el lado izquierdo reducido (Fig. 6G). Raster con un par alidia longitudinales, paralelas y angostas que convergen ligeramente hacia el labio

anal inferior y definen una *septula* estrecha (Fig. 7) con una longitud de 1,74 a 2,08 mm y se encuentran separados 0,33 mm en promedio en su parte central.

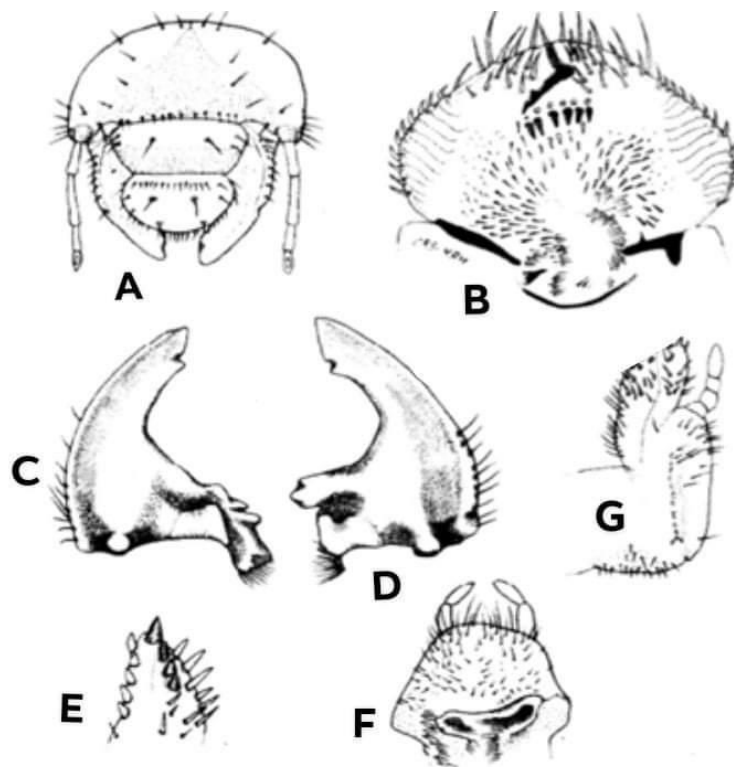


**Figura 7.** Larva de tercer estadio, vista frontal del raster de *Phyllophaga ravida* con palia longitudinal, (Cueva, 2014).

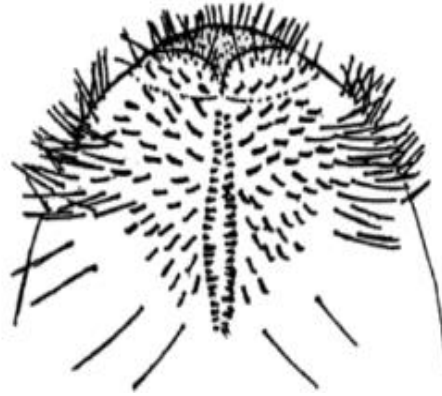
#### 2.4.4. *Phyllophaga vicina*

Larva de tercer estadio (Fig. 8): Cabeza. Anchura máxima de la cápsula cefálica: 4,5 a 5,1 mm. Superficie del *cranium* finamente rugosa, parda amarillenta. Frente con una seda frontal exterior y una seda frontal posterior a cada lado; y 8 a 14 sedas frontales anteriores; con una seda en los ángulos anteriores de la frente; el resto de la superficie craneal con una seda dorso-epicraneal, tres sedas epicraneales y seis o nueve sedas a cada lado. Clípeo con dos sedas centrales y dos 2 sedas laterales a cada lado. Labro ligeramente asimétrico, con los márgenes laterales redondeados, 15 a 16 sedas posteriores, 2 sedas centrales y 5 laterales a cada lado. Manchas oculares ausentes (Fig. 8A). *Epifaringe* sin *zygum* y con *epizygum* alargado, irregular, pardo oscuro; *haptomerum* prominente con 11 a 12 heli; cada *plegmatium* formado con 10-15 *plegmata* anchos. *Proplegmatia* ausente. *Dexiophoba* irregular y fragmentada y *laeophoba* grande, extendida a través del borde de la *laeotorma*. *Dexiotorma* casi recta, con los extremos redondeados; *laeotorma* corta; *apotorma* estrecha y aguzada; *epitorma* indefinida. *Haptolachus* parcialmente cubierto por la *dexiophoba*. Placa esclerosada reducida, estrecha, angulosa. *Crepis* muy estrecho, reducido. Cada *acanthoparia* con 9 o 12 sedas espiniformes recurvadas. Cono sensorial estrecho, reducido. *Chaetoparia* moderadamente desarrollada con numerosas sensilas en el límite con la *gymnoparia* (Fig. 8B). Mandíbulas sin área estriduladora ventral. Áreas

incisivas de ambas mandíbulas con una lámina cortante distal separada de un diente incisivo proximal por una escotadura incisiva; márgenes internos sin dientes; área molar de la mandíbula izquierda con el lóbulo distal bien desarrollado; con 5 sedas dorso molares; acia reducido; brustia multisetosa; área molar de la mandíbula derecha con el lóbulo distal poco desarrollado; *calx* prominente y brustia multisetosa (Fig. 8C-D). Maxilas con uncus terminal en la *galea* y tres uncí alineados en la lacinia, y con hileras de 4-5 heli a cada lado (Figs. 8G-E). Área estriduladora maxilar con 11 a 16 dienteccillos en su mayoría agudos (Fig. 8F).



**Figura 8.** Larva de tercer estadio de *Phyllophaga vicina*. A) Aspecto frontal de la cápsula cefálica. B) Epifaringe. C) Vista ventral mandíbula derecha. D) Vista ventral mandíbula izquierda. G) Aspecto dorsal de la maxila derecha. E) Vista mesial del ápice de la mala derecha. F) Vista dorsal del labio y el escleroma hipofaríngeo (Moron *et al.*, 2000).



**Figura 9.** Vista frontal del Raster (región setal ventral del último segmento abdominal) en larvas de tercer estadio de *Phyllophaga vicina* (Cueva, 2014).

## 2.5. Síntomas y daños del ataque de *Phyllophaga* spp

De forma general las plantas atacadas por larvas de *phyllophaga* presentan marchitamiento, amarillamiento, desnutrición y raíces cortas, es por esta razón que las plantas son susceptibles a caídas. Al ocurrir el daño la planta detiene su crecimiento, posteriormente las plantas adquieren un color amarillo y después lucen quemadas, ocasionando su muerte, las plantas jóvenes son las que se ven mayormente afectadas en cuanto a su desarrollo y producción (Corrales, 2017).

Los daños que provocan pueden ocurrir con menor o mayor severidad dependiendo del número de larvas presentes en la raíz de la planta Olmedo (2016).

## 2.6. Estrategias de control para *Phyllophaga* spp.,

En cuanto a las estrategias de control se está utilizando la aplicación de insecticidas granulados al suelo, los cuales han demostrado ser altamente perjudiciales para salud humana y el ecosistema. Por otro lado los hongos entomopatógenos como (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*), han demostrado una amplia capacidad de control para *Phyllophaga*. Dentro de este grupo de estrategias de control también podemos citar a la bacteria como *Bacillus popilliae* y el nemátodo *Heterorhabditis bacteriophora*, para controlar larvas de gallina ciega, sobre todo las larvas del primer instar. Otra estrategia de control es la labor cultural como el barbecho y rastreo del

suelo, que permiten exponer las larvas a los rayos solares o a la depredación principalmente por aves, así como usar trampas de luz fluorescente para capturar a los adultos (Ruiz *et al.*, 2012).

### **2.6.1. Control biológico**

El control biológico fue originalmente definido como "*la acción de parásitos, depredadores o patógenos que mantienen poblaciones de otros organismos a un nivel más bajo de lo que pudiera ocurrir en su ausencia*" (Pérez, 2004).

Se utiliza para la regulación de poblaciones de insectos plaga y evitar la inducción de resistencia de los insectos por el uso excesivo de agroquímicos (Hernández *et al.*, 2019).

Respecto a los hongos entomopatógenos, los más estudiados que han dado mejores resultados son *Bauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii* y *Metarhizium anisopliae*. Su modo de acción es de contacto, solo que el primero tiene una estrategia tóxica mediante oosproteínas e invade al hospedero mientras que el segundo tiene una estrategia de crecimiento con la formación de apresorios e invasión del hospedero, en el caso del tercero las esporas del hongo se pegan en la cutícula y van penetrando hacia el interior del insecto provocando su muerte, siendo una estrategia efectiva para el control biológico de plagas (Rustiguel *et al.*, 2018).

#### **2.6.1.1. Efecto de los factores bióticos y abióticos sobre los hongos entomopatógenos**

El porcentaje de infección o mortalidad resultante está ampliamente influenciado por el estado susceptible del hospedante, el método de aplicación y los factores ambientales como la temperatura, humedad, velocidad del viento y estructura de la vegetación. La segunda ruta de infección, en el caso de los adultos es por los residuos o deriva de la aspersión (Márquez, 2016).

La temperatura afecta directamente el proceso de desarrollo de la enfermedad, las variaciones de temperatura se considera como un punto de partida para la selección de cepas fúngicas con potencial para el control biológico, por incidir en el crecimiento vegetativo y persistencia en el campo y por tanto, en su eficacia (Souza *et al.*, 2014)

La temperatura y la humedad relativa interactúan para incidir sobre la viabilidad de los conidios. El desarrollo de las micosis es afectado por temperaturas extremas (<15 °C y 32 °C). La humedad relativa es un factor esencial para la germinación de los conidios, no solo afecta la eficacia sino también la sobrevivencia del entomopatógeno en condiciones naturales. Generalmente, se necesita una alta humedad relativa para la germinación de los conidios, la humedad relativa óptima de germinación ocurre con un 100 %, con un 92,5 % puede observarse cierta germinación y con valores menores al 85 % no se logran resultados satisfactorios (Márquez, 2016).

### **2.6.1.2. Principales hongos entomopatógenos con acción parasítica en *Phyllophaga* spp**

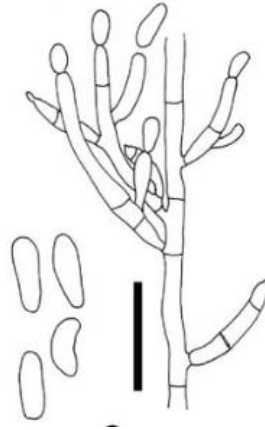
Los hongos entomopatógenos son enemigos naturales de algunos artrópodos, por lo que juegan un papel fundamental en la regulación de sus poblaciones. Estos hongos, se encuentran presentes de forma natural en el suelo, en el filoplano de las plantas e incluso en el aire, están unidos de manera intrínseca a sus hospedantes en un procesos de continua coevolución, que hace que estén adaptados a vivir a expensas del hospedante de los que obtienen la energía necesaria para su desarrollo. (Rodríguez *et al.*, 2010).

A continuación se presentan los hongos que se han utilizado como controladores de esta plaga.

#### **- *Metarhizium anisopliae***

Agente entomopatógeno de la clase Deuteromicetes, orden Moniliales y familia *Moniliaceae*, coloniza la rizosfera y se adhiere a la superficie de las raíces de las plantas por lo que puede tener una alta influencia como repelente de insectos de suelo en estos nichos ecológicos (Leger *et al.*, 2011). Presenta una colonia pegada al medio, completamente redonda, de colores oliváceo, amarillento, verdoso, marrón oscuro, dependiendo del aislamiento, con un revés incoloro a marrón, a veces verdoso citrino. Los conidióforos nacen del micelio y son irregularmente ramificados con dos a tres ramas en cada septo (Fig. 10), miden de 4 a 14  $\mu$  de longitud x 1,5 a 2,5 ancho. Las fiálides son cilíndricas en forma de clava, adelgazados en el ápice, miden de 6 a 13  $\mu$

de longitud y de 2 a 4  $\mu$  ancho. Las conidias son unicelulares, cilíndricas y truncadas, formadas en cadenas muy largas, hialinas a verde oliváceo, miden de 3.5 a 9  $\mu$  de longitud x 1.5 a 3.5 $\mu$  ancho (González *et al.*, 2012).



**Figura 10.** Estructura de *Metarhizium anisopliae*, conidióforos y conidias unicelulares cilíndricas (Petlamul, 2012).

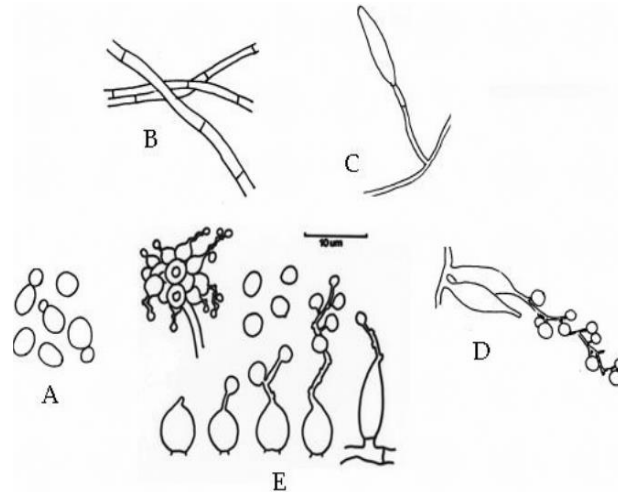
Según (Alcalá *et al.*, 2017), el modo de acción de *Metarhizium anisopliae* es por contacto, contaminando la microflora de la cutícula del insecto. La espora germina sobre el insecto plaga y la hifa se introduce al integumento e ingresa al hemocele, para después propagarse mediante la hemolinfa por todo el insecto, causando su muerte por las toxinas (por toxemia) que esta secreta.

#### - *Beauveria bassiana*

Es un hongo saprófito facultativo de clase Hyphomycete, orden Moniliales y familia Moniliaceae, en medio de cultivo específico Agar Papa y Dextrosa (APD) crece formando una estructura algodonosa y polvosa, de color blanco conocida como muscardina blanca, cuando la colonia va envejeciendo se vuelve crema amarillenta. El revés es de color rojizo en el centro cuando está en crecimiento y amarillo alrededor, está conformada por esporas ovaladas (Fig. 11A), hifas septadas (Fig. 11B) de 2,5 a 25  $\mu$ m de diámetro, de donde se forman conidióforos simples (Fig. 11C) raramente agrupados, los cuales sostienen los conidios, originados de forma simpodial o acrópeta, dando una apariencia en zigzag al raquis (Chirioga *et al.*, 2015).



*B. bassiana*, al igual que otros hongos entomopatógenos, antes de matar a su hospedero le causa síntomas importantes como son: pérdida de sensibilidad, falta de coordinación, letargo, inapetencia, melanización y parálisis. Con la muerte del insecto, el beneficio se incrementa pues la esporulación y posterior dispersión del hongo, permite un control más allá de la aplicación (Mirhaghparast, 2013).

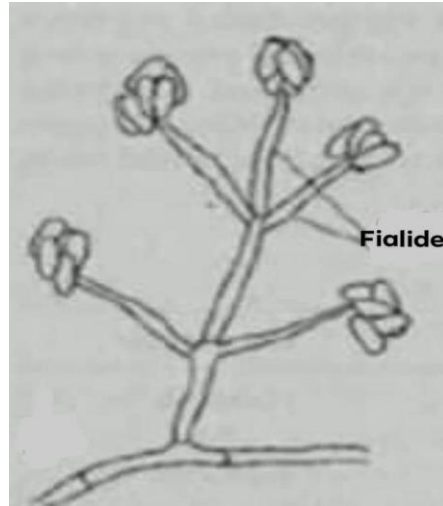


**Figura 11.** Detalle de estructuras de *Beauveria bassiana*. A) Esporas esféricas levemente ovaladas. B) Hifas septadas. C) Conidióforo simples. D) Proliferación simpodial del conidióforo. E) Esquema del proceso de maduración de conidióforo a partir de un conidio (inferior) y vista de un conidióforo completo (superior izquierda) (Vázquez, 2013).

Estudios realizados por Hernández *et al.* (2011) catalogaron a *Beauveria bassiana* como la especie que infectó un mayor número de larvas de *Phyllophaga*, mientras que *M. anisopliae* y *Paecilomyces* spp presentaron un porcentaje similar de colonización.

- *Lecanicillium lecanii*

Este hongo se encuentra distribuido por todo el mundo, pertenece a la clase Hyphomycetidae, orden Moniliales, familia Moniliaceae, presenta micelio tabicado, conidióforos simples, fiálides más anchos en la base y adelgazándose hacia los extremos, en donde se encuentran las conidias agrupadas en cabezuelas (Fig. 12), rodeadas de una sustancia mucilaginosa. Conidias unicelulares, hialinas, de forma cilíndrica a ovoide. Este hongo cubre con un micelio de color blanco a sus hospederos, rodeándolos como con un halo, de allí que se le conoce con el nombre de “hongo blanco de la corona” (Gómez *et al.*, 2014).



**Figura 12.** Estructura de *Lecanicillium lecanii* fialides con punta delgada por donde salen las conidias (Cañedo, 2004).

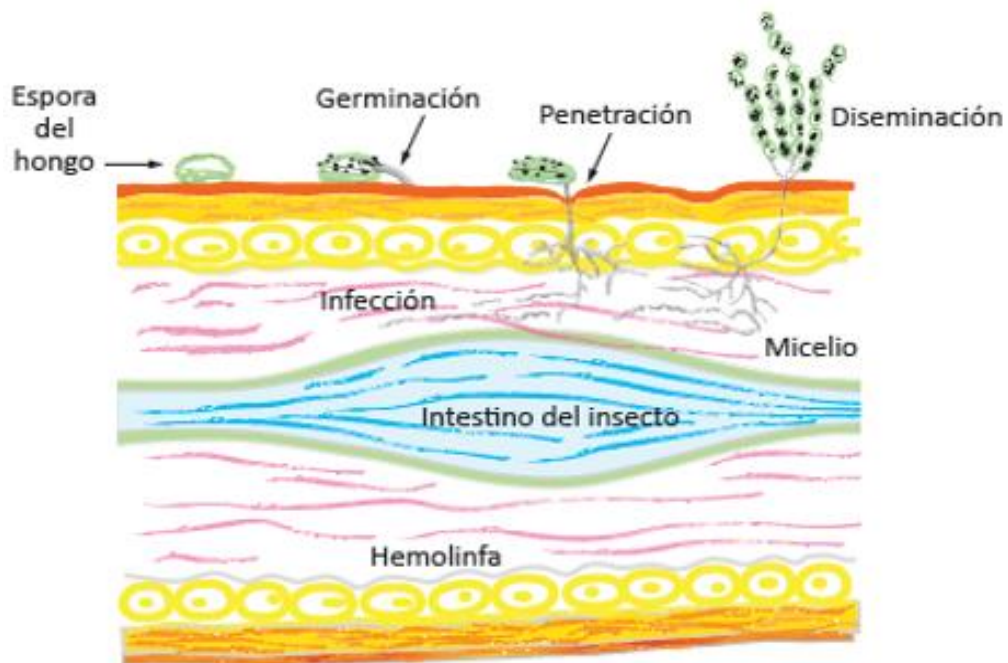
Mora (2017) menciona que *Lecanicillium lecanii* es un hongo que ha mostrado gran agresividad contra *Phyllophaga* spp., específicamente en larvas de tercer estadio, penetrándose en su cutícula y ejerciendo mecanismos de acción confiriéndole una alta capacidad de ataque para evitar que el hospedero desarrolle resistencia.

### 2.6.2. Modo de acción

Carvajal y Troya (2017), mencionan que hongos entomopatógenos ingresan al insecto huésped en cuatro fases:

1. Cuando la espora se adhiere a la cutícula externa del insecto. La espora, al entrar en contacto con su integumento, reconoce ciertas sustancias que exuda la epicutícula, produciendo usualmente un mucilago que evita la desecación y la mantiene unida al huésped.
2. Cuando la espora comienza a germinar. Una vez que la espora se ha adherido a la cutícula del insecto, comienza a penetrar a través de estructuras germinativas, entre las cuales se destacan los apresorios, que son estructuras cubiertas de una sustancia mucilaginosa que les permite crear una inter-fase entre el tubo germinativo y la epicutícula. Este proceso requiere de condiciones de humedad y temperatura particulares.

3. Cuando la espore penetra vía tubo germinativo. La penetración del tubo germinativo en la epicutícula externa y la procutícula, se produce por la activación de mecanismos enzimáticos y físicos que promueven la digestión de la cutícula, con la ayuda de enzimas como quitinasas, lipasas y proteasas; así, el tubo germinativo penetra la cutícula del insecto e invade el celoma.
4. Cuando el hongo se desarrolla en el interior del insecto (celoma). Al ingresar el hongo en el interior del insecto, debido a su primitivo sistema inmunológico, apenas responde produciendo algunas toxinas que pueden retrasar mas no limitar su desarrollo. Ya en el interior del artrópodo, el hongo comienza por atacar el tejido muscular y adiposo; aquí, las hifas se fragmentan en pequeños cilindros que se transportan por la hemolinfa del insecto. En estas condiciones su número se incrementa, hasta alcanzar todas las estructuras y tejidos del invertebrado, produciendo finalmente su muerte, todo este proceso de infección se puede observar gráficamente en la (Fig. 13).



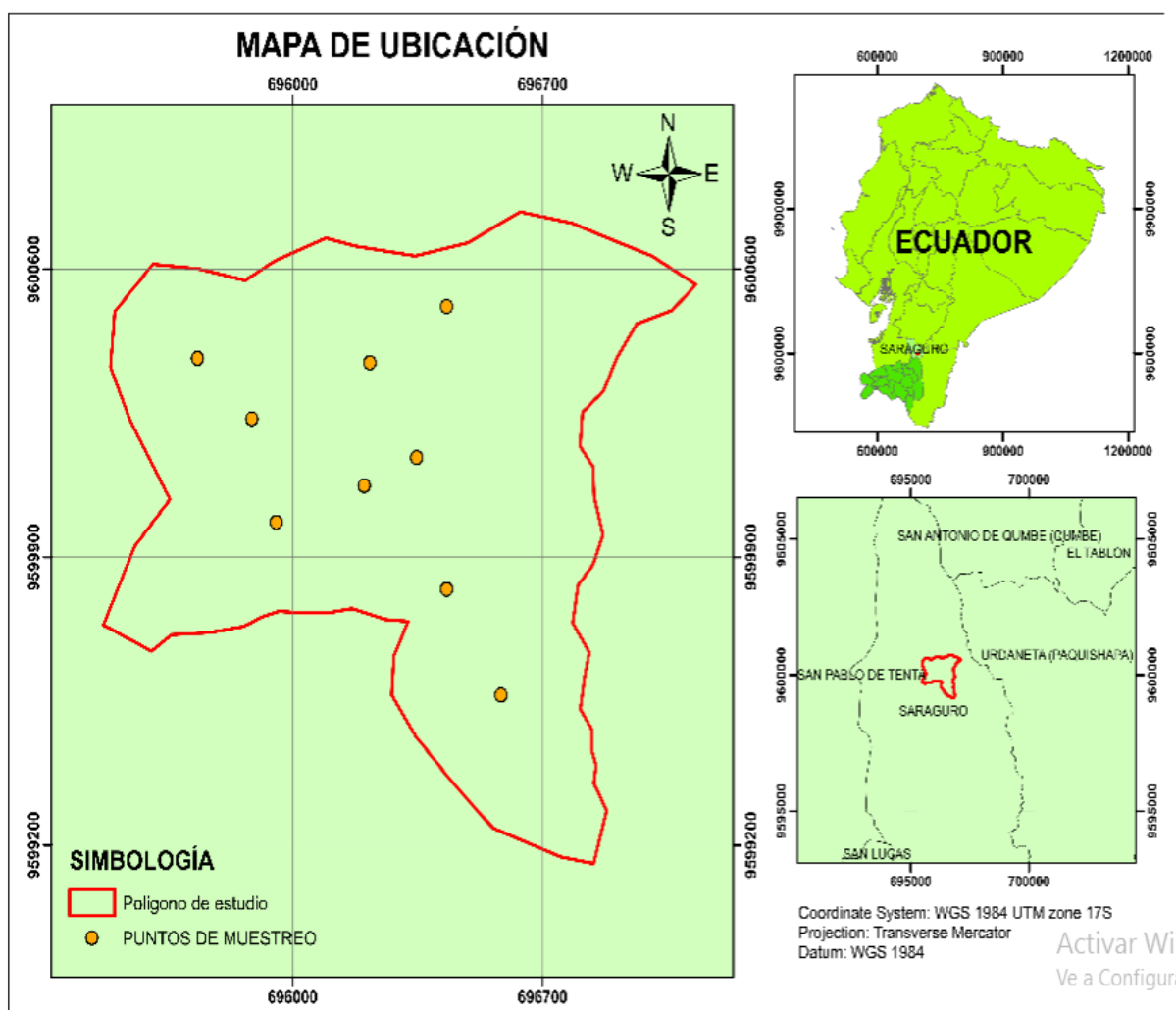
**Figura 13.** Modo de acción de los hongos entomopatógenos al insertarse en el cuerpo del insecto (Bustillo, 2011).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Localización del estudio

La investigación se realizó en la comunidad La Matara (Fig. 14), cantón Saraguro, provincia de Loja. Sus coordenadas son  $3^{\circ} 3' 38''$  Latitud sur y  $79^{\circ} 43' 41''$  Longitud oeste, y altitud de 2 350 m.s.n.m.

La comunidad cuenta con una extensión de 144 ha, desde sus inicios se ha dedicado a la producción agrícola destinada al consumo familiar y comercialización. Su suelo es franco-acillo so, cuenta con un sistema de riego que abastece a toda la comunidad y su pendiente va del 2 % al 20 %.



**Figura 14.** Mapa de ubicación geográfica de la comunidad La Matara.

**Fuente.** El autor 2020

### 3.2. Metodología para el primer objetivo

Identificar las especies del género *Phyllophaga* de mayor incidencia en sistemas agrícolas de la comunidad La Matara, cantón Saraguro.

La selección de los sitios de estudio se realizó de acuerdo a los cultivos presentes en la localidad, sin tomar en cuenta su extensión ni topografía. Se seleccionaron 9 sembríos aleatorios con 10 repeticiones en cada uno, dando un total de 90 muestras. En cada sembrío se registraron los siguientes datos: fecha de muestreo, cultivo, ubicación geográfica, altitud sobre el nivel del mar, nombre del propietario.

El muestreo de larvas se realizó una sola vez en cada punto durante el tiempo de estudio desde el mes de octubre 2019 hasta marzo 2020. En cada punto de muestreo se sacó un cubo de suelo de 30 x 30 x 30 cm, del que se separaron manualmente las larvas presentes. Las larvas recolectadas se depositaron en recipientes plásticos, con suelo húmedo propio del lugar y posteriormente fueron trasladadas al laboratorio de entomología de la Universidad Nacional de Loja para su caracterización.

La identificación taxonómica de las especies del género *Phyllophaga* se realizó en el laboratorio de entomología de la Universidad Nacional de Loja, con larvas de tercer estadio; aquellas larvas que se encontraron en estadio uno y dos fueron alimentadas con trocitos de papa de ½ cm de diámetro (Fig. 15) tres veces por semana de la misma forma controlando la humedad del suelo. Una vez alcanzado el tercer estadio, se procedió a conservar las muestras en una solución de alcohol 75 % más ácido acético 80 % más glicerina.

Se utilizó el microscopio estereoscopio, para la observación morfológica de las larvas, la identificación se realizó con las claves taxonómicas propuestas por Morón *et al* (2000) las cuales priorizan la forma del raster como la principal características para la identificación.



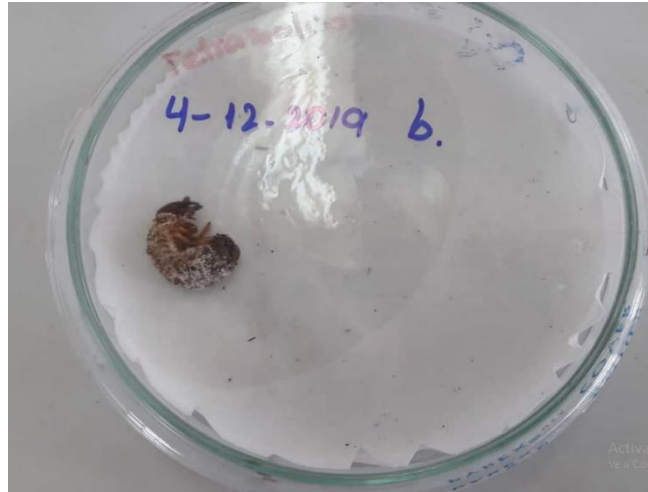
**Figura 15.** Alimentación de larvas de *Phyllophaga* con papa, en el laboratorio de entomología de la Universidad Nacional de Loja.

### **3.3. Metodología para el segundo objetivo**

Aislar y caracterizar hongos entomopatógenos de las especies de mayor incidencia de *Phyllophaga* spp., en La comunidad La Matara.

#### **3.3.1. Aislamiento de hongos entomopatógenos de larvas de *Phyllophaga* del suelo**

Para el aislamiento de hongos entomopatógenos se procedió a realizar tres muestreos de forma general por toda la comunidad, en terrenos cultivados, barbecho o matorrales, en ellos se buscaron larvas de *Phyllophaga* en diferentes estados de desarrollo que presentaran signos iniciales o avanzados de estar parasitados por hongos (Fig. 16). Por cada larva colectada se procedió a llenar una ficha que contenía los siguientes datos: nombre del colector, nombre del insecto colectado (familia, género, especie), lugar, cultivo, altitud, fecha. Las larvas colectadas se colocaron en fundas plásticas con su debida etiqueta y fueron trasladadas al laboratorio de Sanidad vegetal de la Universidad Nacional de Loja.



**Figura 16.** Larva de *Phyllophaga* con signos iniciales de estar parasitada por hongos.

Una vez en laboratorio se siguió el protocolo de Cañero y Ames (2004) se remojó al insecto en hipoclorito de sodio (0,5 % del producto activo) durante cinco minutos, seguidamente se enjuagó tres veces con agua destilada y se colocó en papel de filtro estéril en una caja petri esterilizada, la cual se selló con papel Parafilm y se dejó incubar a 25 °C hasta observar la germinación del hongo. Después, con ayuda de una aguja de siembra previamente desinfectada, en la cámara de flujo laminar se tocó levemente el cuerpo del insecto donde se veía crecimiento fungoso, se realizó un ligero raspado y se transfirió su contenido a una caja Petri con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (APD).

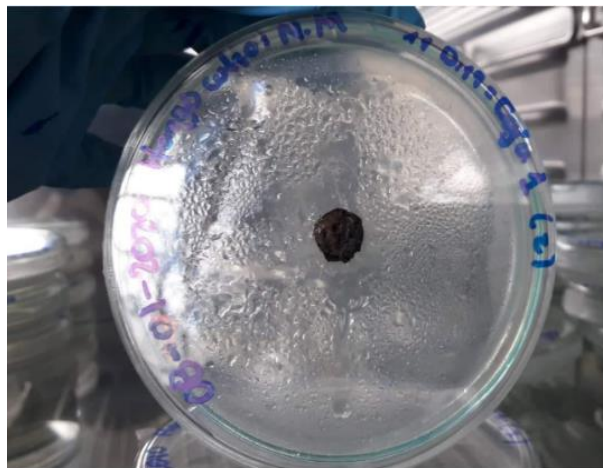
### **3.3.2. Caracterización del aislado del hongo entomopatígeno**

La identificación morfológica de los aislados fue desarrollada con base en las claves descritas por Humber (2012). A nivel macroscópico, se analizaron caracteres como la forma y coloración de la colonia. También se realizó un análisis de aspectos microscópicos en este sentido, las características morfológicas para el género *Metarhizium* son: conidióforos densamente entrelazados, conidios ovoides de color verde, formados en cadenas paralelas largas o cortas, los conidióforos son ramificados, con forma de candelabro y entrelazados.

### 3.3.2.1. Crecimiento radial

En la cámara de flujo laminar a partir de los aislamientos se tomaron discos con un sacabocado de 10 mm de diámetro, como se observa en la (Fig. 17) se sembró en el centro de la caja que contenía 15 mL del medio APD (composición para un litro de agua: extracto de papa 200 g, dextrosa 20 g, agar 15 g) a una temperatura de  $25\pm 1$  °C, finalmente se selló la caja con Parafilm.

El tiempo de incubación y evaluación comprendió un total de 15 días; pasado ese tiempo se observó la forma de crecimiento de la colonia, tamaño (el cual se mide de lado a lado pasando por el centro en dos puntos de la colonia), aspecto, textura y coloración de ambas caras y la producción de pigmentos. Se realizaron cinco repeticiones por colonia madre, todas con la misma temperatura y medio de cultivo.



**Figura 17.** Hongo entomopatógeno extraído del insecto, sembrado en medio de cultivo APD para medir su crecimiento radial.

### 3.3.2.2. Caracterización microscópica

Para la caracterización microscópica, de las estructuras del hongo se realizó según la técnica del Microcultivos utilizada por Valle (2015). Para ello se colocó papel filtro en el interior de cada caja de petri de 90 mm y sobre él se pusieron dos portaobjetos colocados en cruz. Se esterilizaron y posteriormente se adicionó agar agua al 1,5 % sobre el portaobjeto de la parte superior, en el cual se sembró una porción del aislamiento, con ayuda de un asa recta. Seguidamente, se humedeció el papel de filtro con agua destilada estéril, se sellaron con Parafilm y se llevaron las



placas a incubación a  $25\pm 1$  °C. Se esperó el crecimiento de 2 a 3 días para realizar las observaciones al microscopio con aumento de 40X para verificar su crecimiento y estructura. La toma de microfotografías de la morfología, disposición de los conidios y la medición de conidios (largo y ancho) se realizó con ayuda de la cámara digital del microscopio MC-500-W.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterización de larvas de *Phyllophaga* spp.

Los individuos del género *Phyllophaga* encontrados en el estudio correspondieron a la especie *Phyllophaga obsoleta* (Fig. 18), el mismo que se registraron en los cultivos de ciclo corto: maíz, hortalizas, mora, fresa y papa. También se pudo identificar el género *Cyclocephala* presente en el cultivo de aguacate.

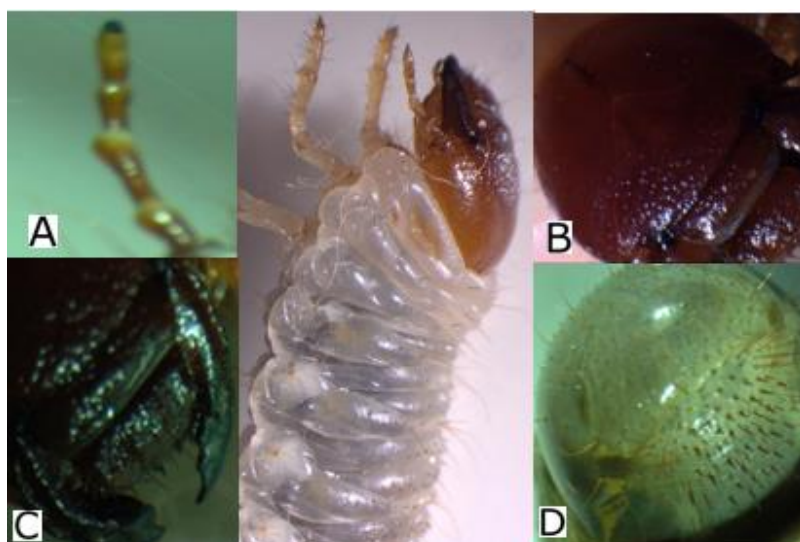
Los caracteres diagnósticos observados para la identificación de *Phyllophaga obsoleta* en la presente investigación se describen a continuación:

La larva presentó una cabeza color café de 5 a 6 mm de ancho (Fig. 18B); en la región del pronoto no esclerotizada se encuentra una sutura longitudinal que se prolonga por el centro del cráneo y se divide en dos partes extendiéndose hacia los lados y terminando en la base de la mandíbula; presenta dos antenas de color café de 4 mm de longitud con 4 artejos (Fig. 18A); de los bordes laterales del labium se desprenden los palpos labiales, los cuales son de 1 mm y cubiertos de vellosidades; dos mandíbulas muy fuertes de 4 mm de longitud (Fig. 18C), terminando en una coloración negra.

Presentó tres pares de patas, las primeras son de 6 mm, las segundas de 7 mm y el tercer par de 9 mm de largo, con vellosidades en toda su superficie.

Su región anal presenta una hendidura en forma de Y; raster (Fig. 18D), con palidia de forma regular; setas tegilladas encorvadas en su extremo semejándose a un bastón, extendiéndose más allá del extremo anterior de la palidia.

Su cuerpo se encuentra cubierto de vellosidades, el mismo que es de color blanco crema y presenta forma de 'C', con espiráculos en cada uno de sus segmentos, el primero más grande que el resto, en su parte terminal presenta un ensanchamiento en forma de saco de color oscuro en donde se encuentra su sistema digestivo. El tamaño de las larvas oscila entre los 4 a 5 cm.



**Figura 18.** Larva de tercer estadio de *Phyllophaga obsoleta*; A antenas; B cabeza; C mandíbulas; D raster, observadas en el estereomicroscopio.

Los datos presentados en la Tabla 1 corresponden a las larvas recolectadas en el sitio de estudio, con un total de 176. La especie de *Phyllophaga obsoleta* se encontró con el mayor porcentaje alcanzando el 89 % de la población total, teniendo como preferencia los cultivos de fresa, papa, hortalizas y maíz. En bajas proporciones se pudo identificar el género *Cyclocephala*, con el 11 % encontrándose en el cultivo de aguacate, este presenta un tamaño más grande que *Phyllophaga obsoleta*, causándole daño a sus raíces.

**Tabla 1.** Recuento de larvas del tercer estadio del complejo “gallina ciega” recolectas en la comunidad La Matara, cantón Saraguro.

Cultivos	Especies de <i>Phyllophaga</i>	Otro género	Subtotal	Total
	<i>Phyllophaga obsoleta</i>	<i>Cyclocephala</i>		
<b>Fresa</b>	31	0	31	31
<b>Hortaliza</b>	11	0	11	11
<b>Papa</b>	43	0	43	43
<b>Mora</b>	17	0	17	17
<b>Maíz</b>	55	0	55	55
<b>Aguacate</b>	0	19	19	19
<b>Total</b>	157	19	176	176
<b>Valor (%)</b>	89 %	11 %		100 %

#### 4.2. Obtención de aislados de hongos entomopatógenos

Durante las prospecciones realizadas dentro de la comunidad La Matara, se obtuvo un aislamiento de hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. Debido a que las larvas colectados con presencia de hongos fueron tomados del suelo se pudo evidenciar la presencia hongos fitopatógenos como (*Fusarium* y *Penicillium*) colectados de larvas de *Phyllophaga* spp. muertas dentro de los cultivos presentes en la zona de estudio, durante un período de 5 meses comprendido entre el mes de octubre del 2019 a marzo 2020.

##### 4.2.1. Características macroscópicas *Metarhizium anisopliae*

El crecimiento de las colonias en las cajas de petri fue de forma expansiva y homogénea alrededor del disco inocular, se efectuaron observaciones para describir las características morfológicas en cuanto al color y diámetro de la colonia hasta los 15 días después de la siembra. El crecimiento radial de cada una de las cepas mostró que existe una relación entre el crecimiento radial y el tiempo, iniciando un aumento evidente a partir del día 5 después de la siembra.

**Tabla 2.** Medición del crecimiento radial durante 15 días de la cepa MN de *Metarhizium anisopliae* con seis repeticiones.

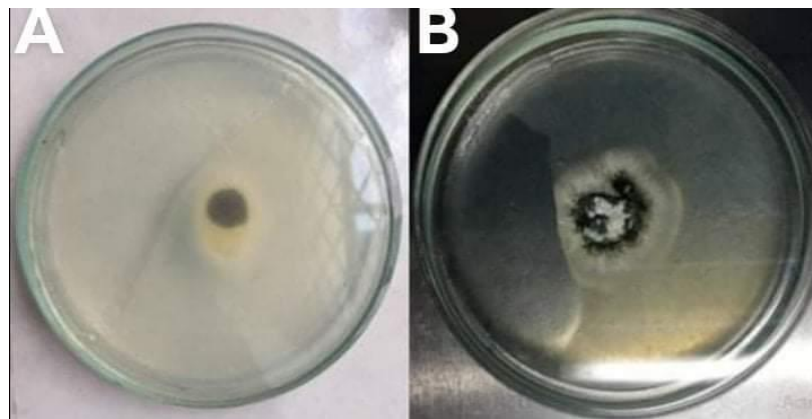
Cepa	Rpt	Diámetro (mm)												
		1 día	2 día	3 día	4 día	5 día	6 día	7 día	8 día	9 día	10 día	11 día	12 día	13 día
MNr	1	0	0	10	11	13	17	17	20	20	25	25	27	29
	2	0	0	10	11	16	22	29	34	34	34	34	34	35
	3	0	0	11	12	16	19	30	35	35	35	35	35	35
	4	0	0	11	13	18	23	35	41	41	41	41	41	42
	5	0	0	10	11	11	13	20	23	23	23	25	25	27
	6	0	0	12	13	16	24	30	39	39	39	40	40	40

En la tabla 2 se representa el crecimiento radial de un aislado (MN) de *Metarhizium anisopliae* con seis repeticiones, que fue colectado en los terrenos de la comunidad La Matara.

La colonia MNr4 fue la que presento un mejor crecimiento con un diámetro de 42 mm en 15 días (tasa de crecimiento 5 mm cada 24h) en los primeros 4 días, después

se evidencio un crecimiento acelerado desde el día quinto hasta el séptimo (tasa de crecimiento 9 mm cada 24h), manteniendo los 42 mm hasta el último día de medición.

Los resultados de la caracterización morfológica (macroscópica y microscópica) de las colonias, fueron comparadas con las claves taxonómicas de Humber (2012). Las colonias presentaron un crecimiento lento con un promedio de 15 días para un desarrollo óptimo, son de textura algodonosa, margen de micelio color blanco y esporulación de color verde oscuro (Fig. 19B), el reverso de la colonia es de color amarillo anaranjado y miel (Fig. 19A), presentan pigmentación y un borde fino de color blanco alrededor de la colonia.

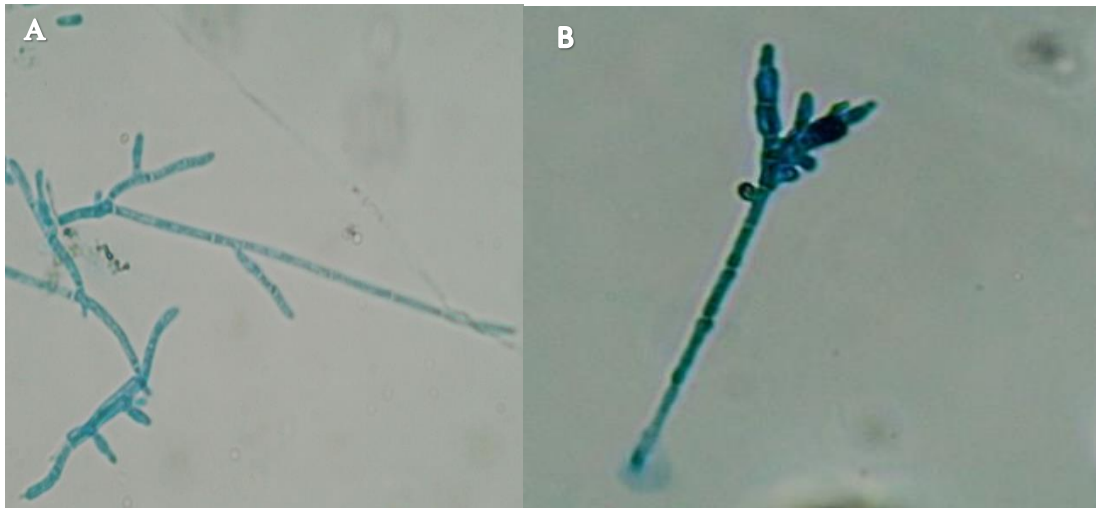


**Figura 19.** Características microscópicas de *Metarhizium anisopliae*: A) colonia invertida; B) colonia de 15 días.

#### **4.2.2. Morfología microscópica de *Metarhizium anisopliae***

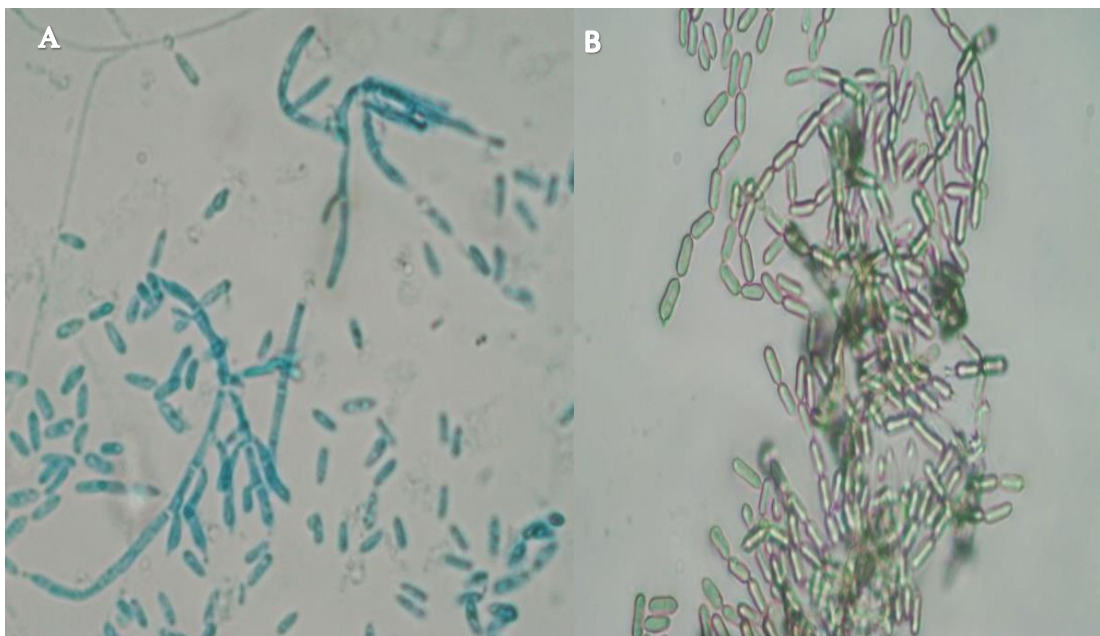
Presenta hifas septadas y ramificadas, los conidióforos crecen a partir del micelio de forma irregular con dos a tres ramificaciones. Se midieron 65 conidios mismos que obtuvieron un tamaño de 6,2 a 8,5  $\mu\text{m}$  de largo y 2,1 a 3,7  $\mu\text{m}$  de ancho.

Su fiálides presentan una longitud variable, su ápice es redondeada (Fig. 20B).



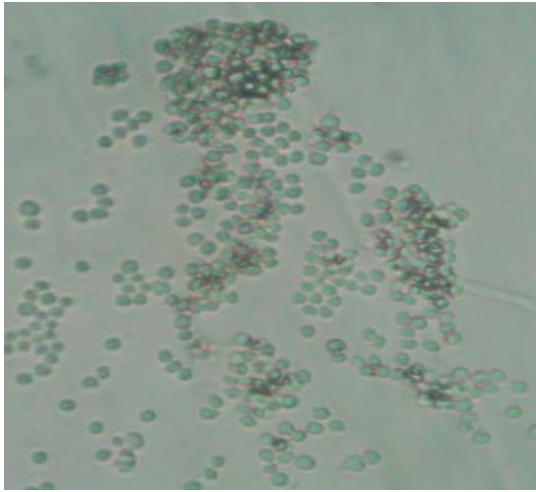
**Figura 20.** Características microscópicas: A) Fíalides alargada de longitud variable con ápice redondeado; B) Conidióforo largo y tabicado con presencia de fíalides.

Conidio cilíndricos con una coloración verde pálido brillante (Fig. 21B), de extremos redondeados agrupadas en cadenas a menudo largas o formando pirámides.



**Figura 21.** Características microscópicas: A) conidióforos individuales ampliamente ramificados; B) Conidio hialino unicelular y cilíndrico en forma de cadena.

Por otra parte, también se pudo constatar la presencia de hongos fitopatógenos los mismos que se muestran en las Fig. 22 y 23 que corresponden al género *Penicillium* y *Fusarium*.



**Figura 22.** Esporas de *Penicillium* spp.



**Figura 23.** Esporas de hongo *Fusarium*.

## 5. DISCUSIÓN

En la presente investigación se ha detectado la presencia de *Phyllophaga obsoleta* en los cultivos de papa, mora, maíz, hortalizas y fresa de la comunidad de La Matara, una especie que ya se ha reportado en la provincia de Loja (Tambo y Gonzales, 1999), especie que ha sido catalogada como plaga de cultivos de fréjol y maíz (Cueva, 2014)..

Los especímenes de *Phyllophaga obsoleta*, fueron encontrados a los 2 525 m.s.n.m, una altitud que se encuentra dentro del rango determinado para el género, ya que su gran capacidad de adaptación y dispersión le permite vivir desde el nivel del mar hasta los 3 500 m de altitud (Calberto, 2004).

En el cultivo de aguacate se determinó la presencia de larvas género *Cyclocephala* spp., cuya identificación no se pudo realizar hasta el nivel de especie debido a la falta de claves. En cualquier caso, este género ha sido encontrado atacando cultivos de cacao, maíz, aguacate y café (Cueva, 2014), aunque se ha visto que suele ser el género predominante particularmente en el cultivo de aguacate (Tobarda, 2019).

Los muestreos se realizaron a los 15 a 20 cm de profundidad del suelo y alrededor de las raíces de los cultivos, encontrándose mayor cantidad de larvas por superficie en los cultivos de papa, fresa, hortalizas y maíz, fréjol y haba, causando una pérdida parcial o total del cultivo, exponiendo el mismo tema Vallejo (2008) y Villegas (2006), mencionan que *Phyllophaga obsoleta* se encuentra presente en el cultivo de papa, maíz, hortalizas y ornamentales, causando pérdidas económicas de hasta el 80 % en la producción.

El hongo que se encontró parasitando las larvas de *Phyllophaga* spp. fue *Metarhizium anisopliae*, el cual presentó un crecimiento circular lento cambiando de tonalidad después del noveno o décimo día conforme iba madurando la colonia, pasando de blanco a verde oscuro, una característica típica del género *Metarhizium* (Gallegos, 2003; Vázquez, 2013). Para la identificación de la especie, la presencia de esporas hialinas unicelulares y cilíndricas formando cadenas, y los conidióforos largos y tabicados con presencia de fiálides fueron los caracteres clave que caracterizan a *M. anisopliae* (Torres *et al.*, 2013)



La tasa de crecimiento radial diaria que se registró fue de 9 mm cada 24 h, una tasa ligeramente inferior a la registrada por Contreras y Bustillo (2019) (10,40 mm cada 24 h).

El tamaño de los conidióforos fue desde 6,2 a 8,5  $\mu\text{m}$  de largo y de 2,1 a 3,7  $\mu\text{m}$  de ancho, coincidiendo con los datos expuestos por Vázquez (2013), según el cual los conidios de esta especie tienen una longitud de 4 a 10  $\mu\text{m}$  y un diámetro que va de 2 a 4  $\mu\text{m}$ .

## 6. CONCLUSIÓN

Dentro del género *Phyllophaga* se identificó la especie *Phyllophaga obsoleta*, también se pudo establecer la presencia del género *Cyclocephala* en los cultivos estudiados dentro de la comunidad La Matara.

La distribución espacial de las larvas presente en los cultivos de la comunidad La Matara muestra que estas tienen preferencia por el cultivo de maíz y papa, estos dos cultivos fueron los que presentaron un mayor daño por el ataque de estas larvas.

La cepa aislada de *Metarhizium anisopliae* se caracterizó por tener colonias circulares, con bordes definidos, predominando en todo el color verde oscuro que es característico de este género.

El uso de especies de *Metarhizium anisopliae* como entomopatógeno puede ser una alternativa muy eficiente para el control de larvas de *Phyllophaga* y otros insectos plaga, pero previo a la utilización del hongo se debe de realizar pruebas de patogenicidad que garanticen la efectividad de la cepa.

## 7. RECOMENDACIONES

Investigar que especies de *Phyllophaga* que se encuentran presentes en los cantones de la provincia de Loja, determinar el porcentaje de daño la susceptibilidad del cultivo al ataque de la misma, teniendo como base esta información buscar alternativas de control biológico para mitigar el ataque de las mismas.

Utilizar las cepas de *Metarhizium anisopliae* para estudios futuros, en donde se trabaje en buscar una concentración efectiva mediante ensayos in vitro y campo para el control de esta plaga.

Las instalaciones donde se vaya a llevar a cabo el aislamiento y cauterización de los hongos entomopatógenos deben de ser inocuo, evitando al máximo la presencia de material vegetal o suelo que sirvan como focos infecciosos.

Para obtener mejores resultados en crecimiento del hongo es recomendable tomar muestras de la parte que une la cabeza con el cuerpo, ya que esta zona presenta una menor contaminación por hongos fitopatógenos logrando obtener una cepa inocua.

## 8. BIBLIOGRAFÍA.

- Alcalá, J., Cruz, C., Fernández, M., -Sahagún, C y Mendoza, I. *Virulence of Metarhizium anisopliae and Beauveria bassiana isolates and the effects of fungal infection on the reproduction potential of Rhipicephalus microplus engorged females*. Biocontrol Sci. Technol, 2017. págs 27.
- Bustillo P., Obando B., Matabanchoy S., y Castro V. *Uso del hongo Metarhizium anisopliae (Metsch) Sorokin*. Colombia : CENICAÑA, 2011. págs 12.
- Cañero, V y Ames, T. *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Centro Internacional de la Papa (CIP). 2004. págs 62.
- Calberdo, G. *Estudio del ciclo de vida de Phyllophaga menetriesi (blanchard) en condiciones controladas de temperatura, humedad e intensidad lumínica*. Tesis para la obtención del título de Administrador del Medio Ambiente y de los Recursos Naturales de la Unv Autónoma de occidente. 2004. págs 27-65.
- CATIE, C. *Seminario taller centroamericano sobre la biología y control de Turrialba*. Costa Rica. 2002. págs 35.
- Chiriboga, H., Gómez, G y Gárces, K. *Beauveria bassiana, Hongo entomopatógeno para el control biológico*. . IICA. 2015. págs 40.
- Corrales, C. *Uso de trampas para la captura de "Abejones de Mayo" (Phyllophaga spp)*. Información y Comunicación/Hoja divulgatoria #10. 2017. págs 12.
- Contreras, L y Bustillo, A. *Caracterización morfológica de cepas de hongos entomopatógenos de Beauveria bassiana, Cordyceps spp., Metarhizium spp. y Purpureocillium lilacinum*. XV Reunión técnica nacional de palma de aceite. Colombia, 2019. págs 3.
- Cueva, M. *Identificación taxonómica de las especies de Phyllophaga (col. scarabaeidae) presentes en diez cultivos del Ecuador*. Tesis para obtener el título de ingeniero agronomo. Univ ESPE. 2014. págs 46.
- FAO. *Los contaminantes agrícolas: una grave amenaza para el agua del planeta*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2018. págs 5.
- Gallegos, G. *Entomopatógenos*. México: Trikkas, S. A. DE C. V., Av. Río Chubusco 385, Col. Pedro María Anaya, C.P. 0 3340, México. D. F. 2003. págs 59-91
- Hernández, Z., Cervantes, F., Peña, L y Garcia G. *Aislamiento de hongos entomopatógenos en suelo y sobre gallinas ciegas (Coleoptera: Melolonthidae) en agroecosistemas de maíz*. Acta zoológica mexicana (n. s.). 2011. págs 2
- Hernández, F., Garcia, L., Figueroa, K., Figueroa, B., Salinas, J., Sangerman y D., Díaz, E. *Análisis de las investigaciones sobre Metarhizium anisopliae en los últimos 40 años*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas publicación número 22. 2019. Págs. 155-166.

- Humber, R. A. Identification of entomopathogenic fungi. En: Lacey, L.A. (Ed.). *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Second Edition)*. 2012. págs. 151-187. San Diego: Academic Press Disponible en: <http://file.zums.ac.ir/ebook/705-Manual%20of%20Techniques%20in%20Invertebrate%20Pathology,%20Second%20Edition=Lawrence%20A.%20Lacey=0123868998=A.pdf>
- Mejía. E. *El agucate (Persea americana Miller)*, Colombia: Bayer Crop Science. 2011 págs 34-48.
- Mirhaghparast, S y Zibae, A. *Effects of Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae on cellular immunity and intermediary metabolism of Spodoptera littoralis Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae)*. Invertebrate Survival J. 2013. Págs 10
- Mora, C. *Control biológico del Joboto o Gallina Ciega (Phyllophaga spp.)*. Fundación para el fomento y promoción de la investigación y transferencia de tecnología agropecuaria de Costa Rica. 2017. págs 6.
- Morón, M. *El género Phyllophaga en México. Morfología, distribución y sistemática supra específica (Insecta: Coleoptera)*. México, D.F. Instituto de Ecología. Publ. No. 19. 1986. págs 344.
- Moron, M., Ramíres, C y Castro , A. *Descripción de los Estados Inmaduros de Seis Especies de Phyllophaga (Coleoptera: Melolonthidae; Melolonthinae) de la región altos de Chiapas, Mexico* . Folia Entomol. Mex. 2000. págs 73-106.
- Olmedo, E. *Evaluación de tres Insecticidas Biológicos y un Insecticida Químico, para el Control de Gallina Ciega Phyllophaga spp.* Tesis Doctoral, Univ. San Carlos de Guatemala. 2016. págs 105.
- Oliveira, L., Santos, J., Parra, M., Amaral, B., Magri, C. *Ciclo biológico de Phyllophaga cuyabana (Moser) (Scarabaeidae: Melolonthinae)*. An. Soc. Entomol. Brasil 25 (3). 1996. págs, 431-437.
- Pérez, Nilda. *Manejo ecológico de Plagas. Transformando el campo cubano: Avances de Agricultura sostenible*. ACTAF-CEAS-Food First. La Habana, Cuba. 2004. Págs. 191-224
- Petlamul, W. *Evaluation of strains of Metarhizium anisopliae and Beauveria bassiana against Spodoptera litura on the basis of their virulence, germination rate, conidia production, radial growth and enzyme activity*. Mycobiology. 2012 págs 11-116.
- Quijije, R. *El Orozco y su control*. Boletín divulgativo (252). 1995. págs. 2-7.
- Rustiguel, C., Fernández, M., Guimaraes, L y Moraga, E. *Different strategies to kill the host presented by Metarhizium anisopliae and Beauveria bassiana*. Pubmed. 2018. págs 200.
- Ruiz, V., Aquino, B., Silva, R y Girón, P. *Control Integrado de la Gallina Ciega Phyllophaga vetula Horn (Coleoptera: Melolonthidae) con Agentes Entomopatógenos en Oaxaca, México*. UDO Agrícola. 2012. págs 609-616.

- Tampo, V y González, L. (1999). *Taxonomía del Género Phyllopha spp. e Incidencia en los Principales Cultivos Bajo el Proyecto de Riego Chiriacu-Lucero*. Loja.
- Torres, M., Cortez, H., Ortiz, C., CAPPELLO, S y Cruz, A. *Caracterización de aislamientos nativos de Metarhizium anisopliae y su patogenicidad hacia Aeneolamia postica, en Tabasco, México*. Revista colombiana de entomología 39 (1). 2013. págs. 40-46.
- Vallejo, F., Morón, M y Orduz S. *Biología de Phyllophaga obsoleta Blanchard (coleoptera: melolonthidae), especie rizófaga del complejo "chisa" de Colombia*. 2008 págs. 17.
- Vázquez, C. *Características, taxonomía y morfología de Metarhizium anisopliae*. Lifider.com. 2013. págs 12.
- Villegas, N. *Reconocimiento de especies del complejo chisa (Coleoptera Melolonthidae) asociados al cultivo de cebolla y pastos en la localidad de Florida, Risaralda, Manizales*: Universidad de Calvas, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Tesis para obtener el título de Ingeniera Agrónoma. 2006 págs 92

## 9. ANEXO.

Anexo 1. Tabla con las medición del largo y ancho de las conidias de *Metarhizium anisopliae*.

<b>Número</b>	<b>Largo conidias</b>	<b>Ancho conidias</b>
1	7,50 $\mu\text{m}$	2,80 $\mu\text{m}$
2	7,58 $\mu\text{m}$	2,62 $\mu\text{m}$
3	7,29 $\mu\text{m}$	3,70 $\mu\text{m}$
4	7,74 $\mu\text{m}$	2,98 $\mu\text{m}$
5	8,04 $\mu\text{m}$	2,18 $\mu\text{m}$
6	6,93 $\mu\text{m}$	2,77 $\mu\text{m}$
7	6,33 $\mu\text{m}$	2,68 $\mu\text{m}$
8	6,24 $\mu\text{m}$	3,15 $\mu\text{m}$
9	8,26 $\mu\text{m}$	3,16 $\mu\text{m}$
10	7,32 $\mu\text{m}$	3,45 $\mu\text{m}$
11	7,16 $\mu\text{m}$	2,03 $\mu\text{m}$
12	7,60 $\mu\text{m}$	3,27 $\mu\text{m}$
13	7,17 $\mu\text{m}$	2,24 $\mu\text{m}$
14	7,64 $\mu\text{m}$	2,26 $\mu\text{m}$
15	8,52 $\mu\text{m}$	2,75 $\mu\text{m}$
16	7,52 $\mu\text{m}$	2,82 $\mu\text{m}$
17	7,76 $\mu\text{m}$	2,86 $\mu\text{m}$
18	7,81 $\mu\text{m}$	3,38 $\mu\text{m}$
19	7,08 $\mu\text{m}$	2,82 $\mu\text{m}$
20	7,39 $\mu\text{m}$	2,42 $\mu\text{m}$
21	7,48 $\mu\text{m}$	2,71 $\mu\text{m}$
22	6,65 $\mu\text{m}$	2,82 $\mu\text{m}$
23	5,16 $\mu\text{m}$	3,60 $\mu\text{m}$
24	7,41 $\mu\text{m}$	2,71 $\mu\text{m}$
25	8,65 $\mu\text{m}$	2,40 $\mu\text{m}$
26	6,75 $\mu\text{m}$	3,30 $\mu\text{m}$
27	6,21 $\mu\text{m}$	3,04 $\mu\text{m}$
28	7,24 $\mu\text{m}$	2,52 $\mu\text{m}$
29	7,79 $\mu\text{m}$	2,03 $\mu\text{m}$
30	6,98 $\mu\text{m}$	2,86 $\mu\text{m}$
31	7,94 $\mu\text{m}$	2,11 $\mu\text{m}$
32	7,25 $\mu\text{m}$	2,52 $\mu\text{m}$
33	6,82 $\mu\text{m}$	2,30 $\mu\text{m}$
34	6,64 $\mu\text{m}$	3,30 $\mu\text{m}$
35	7,20 $\mu\text{m}$	2,33 $\mu\text{m}$
36	7,47 $\mu\text{m}$	3,26 $\mu\text{m}$

<b>37</b>	7,08 µm	2,68 µm
<b>38</b>	7,32 µm	2,97 µm
<b>39</b>	6,72 µm	3,66 µm
<b>40</b>	6,54 µm	3,33 µm
<b>41</b>	7,21 µm	2,08 µm
<b>42</b>	6,62 µm	3,82 µm
<b>43</b>	8,59 µm	2,77 µm
<b>44</b>	7,74 µm	3,25 µm
<b>45</b>	7,17 µm	2,66 µm
<b>46</b>	7,98 µm	2,17 µm
<b>47</b>	7,28 µm	2,40 µm
<b>48</b>	7,18 µm	3,07 µm
<b>49</b>	7,41 µm	2,49 µm
<b>50</b>	6,61 µm	2,48 µm
<b>51</b>	7,18 µm	2,24 µm
<b>52</b>	7,43 µm	2,30 µm
<b>53</b>	6,64 µm	2,10 µm
<b>54</b>	6,93 µm	2,10 µm
<b>55</b>	6,73 µm	2,90 µm
<b>56</b>	7,18 µm	2,66 µm
<b>57</b>	7,90 µm	2,50 µm
<b>58</b>	6,94 µm	2,66 µm
<b>59</b>	6,81 µm	2,40 µm
<b>60</b>	6,56 µm	2,98 µm
<b>61</b>	6,90 µm	2,94 µm
<b>62</b>	6,28 µm	2,75 µm
<b>63</b>	6,25 µm	2,84 µm
<b>64</b>	7,13 µm	3,52 µm
<b>65</b>	7,86 µm	3,10 µm