

Philip J. Shannon ✓  
Proyecto CATIE/NRI  
Turrialba  
Costa Rica

## A. Introducción

Uno de los primeros intentos a usar un microorganismo para el control de un insecto fue con escarabaeidos: fue hecho por un ruso, Elie Metschnikoff, en 1879 cuando usó el hongo, *Metarhizium anisopliae*, contra *Anisoplia austriaca*, una plaga del trigo. Posteriormente, su estudiante, Krassilstchik, inició la producción en masiva del hongo para uso contra un rango de las plagas del suelo. En los años que intervienen se ha intentado varias veces aprovechar de los microorganismos como agentes de control de plagas.

Las últimas dos décadas han visto una explosión de interés y investigación en este campo, y los escarabaeidos han sido objetos favorecidos. Los escarabaeidos son atractivos como marco para el control microbiano por una variedad de razones. Siendo plagas del suelo, viven en un medio con temperaturas relativamente estables, con alta humedad relativa (la mayoría de hongos patógenos requieren más que la 90% de humedad relativa para germinar, y sufren reducciones de su tasa de crecimiento a temperaturas por debajo de los 15°C y arriba de los 34°C). En el suelo están protegidos de la luz ultravioleta que puede matar las esporas de muchos hongos. Muchas enfermedades de escarabaeidos ya son conocidas y algunas causan epizootias en la naturaleza. A veces las epizootias son responsables de altos niveles de mortalidad y la desaparición de infestaciones; la atracción de trabajar con organismos que tienen una capacidad demostrada de control es obvia. También, hay muchos conocimientos ya generados sobre aspectos del control microbiano en escarabaeidos. Su importancia como plagas de céspedes y canchas de golf en Estados Unidos ha sido uno de los factores principales que ha estimulado el interés en el control microbiano. La sensibilidad de esos mercados prósperos al uso de insecticidas ha resultado en la dedicación de altos niveles de financiamiento al desarrollo de productos biológicos.

La mayoría del trabajo sobre el control microbiano ha sido hecho sobre otros géneros de escarabaeidos que no son *Phyllophaga*. Sin embargo, mucho de este trabajo es de relevancia a la discusión del problema de *Phyllophaga* y, en la siguiente discusión, se hace referencia a estos trabajos cuando no existe información específica sobre *Phyllophaga*.

## B. Estrategias en el uso de entomopatógenos

La categorización convencional de estrategias de control biológico no se adapta bien al control microbiano porque frecuentemente el enfoque del control microbiano combina tácticas que pertenecen a más que una categoría. Sin embargo, puede ser instructivo discutir el enfoque bajo estas categorías porque los conceptos involucrados están ya conocidos por la mayoría de investigadores y practicadores de Manejo Integrado de Plagas.

### i. Control biológico clásico y la introducción de patógenos exóticos para plagas nativas.

El control biológico clásico se define como la introducción, para el control de una plaga introducida, de un enemigo natural de la zona de origen de la plaga. En general, este enfoque no ha sido usado para patógenos de insectos, con la excepción notoria del uso de baculovirus para el control de *Oryctes rhinoceros*, una plaga escarabaeida de cocos (Bedford, 1980)

Siendo que *Phyllophaga* es un género nativo al continente americano, no cabe bien la definición estricta de control biológico clásico cuando se considera la introducción de patógenos exóticos. Sin embargo, muchos entomopatógenos son especies cosmopólitas (ej. los nemátodos *Neoplectana* spp., *Heterorhabditis* spp., y los hongos *Beauveria* spp. y *Metarhizium* spp.), y se ha sugerido que nuevas introducciones podrían ser más efectivas que aislamientos que han coevolucionado con el hospedante. Este punto de vista supone que el proceso de coevolución en aislamientos nativos habrá resultado en la pérdida de virulencia. El argumento contrario es que un organismo coevolucionado tiene mayor probabilidad de ser específico en el hospedante. En balance Prior (1992) concluyó que las mejores posibilidades de encontrar un aislamiento que combina alta virulencia con especificidad existen en lugares donde el hospedante es siempre presente. La experiencia con *Metarhizium* en *Phyllophaga* spp. ha sido que se encuentra la alta virulencia en aislamientos del hongo que provienen de suelos en zonas donde el género *Phyllophaga* ocurre, pero no necesariamente la misma especie. La más alta virulencia ocurrió en un aislamiento de una larva de *P. vicina* criada en suelo de una zona donde esa especie no ocurre (Shannon et al., 1993; Shannon et al., datos no publicados). La mayoría de aislamientos de otros insectos y aislamientos extranjeros, aun aquellos con buena infectividad en otras especies de escarabaeido, tuvieron baja o ninguna infectividad en *P. menetriesi*, *P. vicina* y *P. obsoleta*. Aunque aislamientos de suelo podrían tener otras especies hospedantes, las indicaciones hasta ahora sugieren que "nuevas introducciones" ofrecen esperanza de encontrar cepas virulentas en *Phyllophaga*, pero que probablemente sea mejor buscar adentro del mismo género. Todavía no hay una opinión aceptada sobre este tema y, en la práctica, la mayoría de programas de control microbiano prueban todos los aislamientos que pueden conseguir irrespectivamente de su origen.

Jackson (1992) lista 19 instancias de introducciones de especies exóticas de escarabaeidos que se han convertido en plagas. Cabe la posibilidad que algo parecido podría suceder en América Central, tal vez con un

nuevo género de escarabaeido de otro continente, o por la introducción de una especie de *Phyllophaga* a una nueva zona donde antes no existía. La lista de Jackson falta mencionar *Phyllophaga smithii*, especie que fue introducido de Barbados a la isla de Mauritio en 1912, y que se convirtió en una plaga importante de caña de azúcar. A partir de los 1930s sufrió una reducción de su población que resultó en que hoy no se considera una plaga. Mas recientemente *Hoplochelus marginalis*, otra plaga de la caña, fue introducido a la isla de Reunion y en las primeras areas que fueron infestadas, ahora se esta notando una reducción de las poblaciones (Prior, 1992a). Se cree que patógenos nativos, no-específicos son responsables de la disminución de las poblaciones de estas plagas. En estos casos, ha sido sugerido la introducción de patógenos que no se han registrado en esas islas, por ejemplo *Bacillus popilliae*.

- Mucho del trabajo de investigación en el control microbiano de escarabaeidos se debe a una especie introducida. En 1916 el escarabajo japonés, *Popillia japonica*, fue introducido en los EEUU y rapidamente se estableció como plaga de cespedes, canchas de golf y pastos. Sin embargo, aunque se intentó varias introducciones de enemigos naturales artrópodos desde Japón y otros países asiáticos, el éxito mas notorio se obtuvo con una bacteria, *Bacillus popilliae* que se cree era nativa.

## ii. Inoculación e inducción de epizooticos

La estrategia de inoculación se fundamenta en la observación con agentes artrópodos y con algunas enfermedades de plantas que, a principios de una infestación, el inóculo del enemigo natural es tan bajo que no logra incrementar su población suficientemente rápido para regular la población de la plaga. Si se proporciona suficiente inóculo para superar el establecimiento inicial de una mínima población, la tasa natural de aumento es suficiente para permitir que la población se incremente y regula la plaga. El mismo principio es mucho menos documentado en el caso de la relación entre insectos plagas y sus patógenos, pero en casos donde el costo de usar grandes cantidades de inóculo seria prohibitivo (ver sección posterior sobre *Bacillus popilliae*), esta estrategia se ha implementado. Implícitamente, se espera que habrá un componente de este fenómeno en la aplicación de la mayoría de patógenos, ya que el insecto infectado teóricamente sirve de fuente de inóculo a otros insectos.

## iii. Inundación

La inundación esencialmente es el uso de patógenos como insecticidas (resultando en terminología como "micoinsecticida, "insecticida biológico") y, en gran parte, el uso de patógenos en esta manera obedece los mismos principios y posee algunos de los problemas del uso de insecticidas. Pueden usarse en forma profiláctica o como una respuesta a determinados niveles poblacionales de la plaga. Existe un problema potencial pero no cuantificado de desarrollo de resistencia (un fenómeno ya registrado en el caso de *Bacillus thuringiensis* usado contra *Plutella xylostella*), aunque se supone que será mas difícil que se desarrolle resistencia a organismos que tienen modos de acción mas complejos. Como entidades biológicas, muchos entomopatógenos requieren

formulaciones que protegen contra factores ambientales que pueden ser nocivos, ej. luz ultravioleta, baja humedad, o necesitan manejo especial, tal como almacenamiento a temperaturas bajas. La mayoría de usos actuales y previstos de entomopatógenos son principalmente de este tipo, aunque frecuentemente incluyen aspectos inoculativos.

#### iv. Manipuleo del ambiente

Como organismos vivos, los insectos y sus patógenos son susceptibles a variaciones en su ambiente. Además de efectos directos sobre ambos grupos de organismos, la incidencia de enfermedad en una población de insectos depende en parte de las interacciones de los insectos, los patógenos y el ambiente.

Por lo menos en la teoría, el manipuleo intencional del ambiente podría cambiar la incidencia de enfermedad y, como consecuencia, los niveles poblacionales de los insectos. En la práctica, es probable que esta es una de las maneras en que manejos culturales y prácticas agronómicas ejercen sus efectos. Sin embargo, en la mayoría de casos nuestro conocimiento de cómo afectan estos factores a las poblaciones de plagas, y mucho menos a sus interacciones con patógenos, es muy deficiente y no permite del manipuleo intencional del ambiente para este fin. Como se puede detectar en otras secciones de esta memoria, nuestro entendimiento de las relaciones ecológicas y dinámica poblacional de *Phyllophaga* no es buena y no nos da mucha esperanza de poder hacer uso de esta estrategia. No obstante lo anterior, vale siempre tener en cuenta que tales interacciones existen y están operando en el campo y en experimentos de manejo: observaciones empíricas en estas situaciones podrían ser la fuente de valiosa información. Parecería que estudios sobre efectos de manejos de labranzas, residuos vegetales y tratamientos que, de una manera u otra, afectan al suelo serían los más promisorios en este contexto.

#### C. Los principales patógenos de escarabajos.

Los patógenos que se discuten en esta sección se denominan "principales" porque son los grupos de organismos que han recibido más atención como agentes potenciales para el control biológico. El término no necesariamente implica que juegan un papel importante en regular poblaciones de *Phyllophaga* en la naturaleza. La dinámica poblacional de estas plagas es poco entendida y es posible que a lo largo, uno o varios de los organismos denominados "menores" podrían resultar ser más importantes que pensamos.

Los organismos en esta sección comparten una característica importante: existen métodos más o menos conocidos para producir cantidades grandes. Es muy posible que esto, y no su habilidad intrínseca para matar a *Phyllophaga*, sea lo más importante en determinar su éxito como un agente de control biológico. En otras palabras, es más útil un patógeno débil que se puede producir que uno muy virulento que no se sabe reproducir.

## i. Bacterias

### a) Bacterias formadores de esporas

Las bacterias formadoras de esporas tienen una ventaja teórica como agentes de control microbiano sobre bacterias que no las forman porque la spora representa un estado resistente a las condiciones adversas que la bacteria puede encontrar en periodos de ausencia de un hospedero (ej. baja humedad). Esta característica implica que estas bacterias serán más fáciles de formular en un producto microbiano estable y almacenable.

#### 1. *Bacillus popilliae* Dutky

La enfermedad de spora lechosa es causada por infecciones con *Bacillus popilliae* y ocurre solamente en escarabaeidos. Larvas que padecen de la enfermedad son reconocidas por su color blanco lechoso causado por el color de su hemolinfa. Esto se puede ver por la cutícula transparente de los últimos segmentos abdominales, zona que en una larva sana tiene color gris-oscuro porque se ven los sacos de fermentación del tracto digestivo. El diagnóstico puede confirmarse perforando la cápsula cefálica con un alfiler, lo que permite escapar una gota de hemolinfa que tendrá la apariencia de leche en una larva enferma, y amarillenta-transparente en una larva sana. Antes se reconocía otra especie, *B. lentimorbus*, pero hoy se considera que es un tipo (B1) de *B. popilliae*. Con base en la forma y tamaño de la spora y la inclusión paraesporal, se conocen cinco tipos, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>mult</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>: probablemente existen más tipos que todavía no han sido descubiertos o descritos.

Las larvas se infectan cuando ingieren esporas de la bacteria con su alimento. Las esporas pueden sobrevivir muchos años en el suelo. En el tracto digestivo, las esporas germinan y las formas vegetativas penetran la pared del tracto medio y pasan al hemocelo. Allí se reproducen en la hemolinfa, y eventualmente esporulan, dando altas concentraciones de esporas que cambian el color de la hemolinfa a blanco: la hemolinfa de una larva infectada puede contener  $5 \times 10^{10}$ /ml. La muerte típicamente ocurre un mes o más después.

Típicamente las cepas de *B. popilliae* son muy específicas; infectan un rango muy limitado de otros escarabaeidos, por lo menos, en forma natural (algunas cepas infectan mejor cuando se inyectan directamente en la hemolinfa). La cepa para uso comercial en EEUU contra *Popillia japonica* (Doom, Japidemic) ha sido sujeta a pruebas exhaustivas de laboratorio y se demostró que tiene casi cero infectividad en *Phyllophaga menetriesi* (Díaz, 1992). Dado los resultados generalmente negativos en pruebas sobre la infectividad cruzada entre especies (Klein y Jackson, 1992), parece probable que estos resultados también sean válidos para otras especies de *Phyllophaga*. La implicación de lo anterior es que los casos de infección que se encuentran en el campo son causados por cepas nativas que se espera tendrán especificidad en el género *Phyllophaga*. También implica que reportes de efectividad con la aplicación de productos comerciales sean cuestionables. Gaugler (citado por Klein y Jackson, 1992) encontró larvas con infección de *B. popilliae* en Panamá, y infecciones en el campo han sido encontrados en Costa Rica en *P. menetriesi* (Badilla y Jackson, y Shannon et al., datos no

publicados). Según T. Jackson (comm. pers.), los aislamientos de Costa Rica tienen morfología distinta de la espora y paraespora comparado con otros aislamientos.

La producción comercial de *B. popilliae* se hace solo para la cepa usada en el control de *P. japonica*, y el producto vale entre \$US 300-500 para tratar una hectarea. El alto costo se debe a que la etapa que posee esporas solo puede producirse en insectos vivos. Antes, se produjo inyectando larvas colectadas en el campo pero ahora se colectan larvas enfermas directamente del campo. Recientemente la compañía Ringer vendió un producto "Grub Attack" producido de esporas cultivadas en medio artificial. Sin embargo, el producto fue sacado del mercado debido a dudas sobre eficacia y la identidad de las esporas bacterianas que contenía.

El uso de productos que contienen *B. popilliae* es del tipo inoculativo debido principalmente al costo prohibitivo de usarlos en las dosis necesarias para un insecticida biológico. Originalmente se aplicó 2g de polvo con  $10^8$  esporas/g sobre la superficie del suelo a cada 1.3m en un arreglo cuadrado. Posteriormente, para grandes extensiones de pastos, se recomendó reducir la dosis al 20% de esta. También existen formulaciones granuladas par aplicación mecanizada. En *P. japonica* la aplicación demora cuatro a cinco años antes de infectar una proporción suficientemente grande de insectos para tener un efecto sobre la población de la plaga. Después de esto, el efecto persiste muchos años, aunque en EEUU hay algunos informes que sugieren la pérdida de infectividad después de más de una década en el campo (ej. Dunbar y Beard, 1975).

El futuro para el uso de este organismo en el control de *Phyllophaga* probablemente depende de encontrar un método de producirlo *in vitro*, o de encontrar una cepa con características extraordinarias de virulencia (tales como matanza muy rápida o en dosis muy bajas).

## \*2. *Bacillus thuringiensis* Berliner

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es una bacteria que produce un cristal tóxico a algunos insectos cuando es consumido. Se pueden aislar cepas de *Bt* de suelos pero son pocas las especies de insecto que inhaben el suelo que son susceptibles a las cepas actualmente en uso o bajo investigación. Presumiblemente, insectos del suelo, especialmente géneros como *Phyllophaga* que consumen suelo con su alimento, han desarrollado mecanismos de resistencia a la mayoría de los genotipos de la bacteria.

Sin embargo, en años recientes se han aislado varias cepas de *Bt* que son patogénicos en escarabaeidos, aunque hasta ahora no han sido evaluadas en *Phyllophaga* spp. Klein y Jackson (1992), citando Crocker *et al.* (1982), notan un reporte de *Bt* infectando *Phyllophaga* sp.

Al igual que su uso contra plagas lepidópteros, el uso de *Bt* contra escarabaeidos casi por cierto será inundativa porque la propagación de la enfermedad en la población es casi siempre muy baja. Klein y Jackson (1992) plantean que, dada la dificultad anticipada para formular

*Bt* para estabilidad en el suelo, podría ser de mas utilidad contra el estado adulto. Los mismos autores citan Liu *et al.* (1988) que *Bt* var. *kurstaki* (una cepa activa contra lepidópteros), aplicado como tratamiento a la semilla en maní, dió protección excelente contra larvas.

Dado el interés de la industria en todo relacionado con *Bt*, en los próximos años se podría oír mas sobre *Bt* para *Phyllophaga*. Sin embargo, por el momento faltan varios pasos antes de tener algo práctico para uso en la agricultura.

### 3. Otras especies

Otras especies de bacterias formadores de esporas han sido implicado en causar enfermedades en escarabaeidos, incluyendo *Clostridium* sp., *Bacillus cereus* y *B. laterosporus*. Vargas y Abarca (1991) reportan patogenicidad de *B. cereus* en *Phyllophaga* spp. con el inicio de síntomas ocurriendo entre los 7 a 14 días después de aplicación. También reportan reducciones del daño en plantulas de maíz bañadas en suspensión de bacterias en pruebas de invernadero. Poprawski y Yule (1990) tambien reportaron patogenicidad de *B. cereus* en larvas L3 de *P. anxia*.

Klein y Jackson (1992) cuestionan si este grupo de bacterias sean verdaderos patógenos porque ocurren abundantemente en suelos y podrían desarrollar saprofiticamente sobre sus hospederos. Bucher (1981) señala que infecciones bacterianas de insectos son frecuentemente causadas por las mismas especies que se encuentran en el tracto digestivo de insectos sanos, y que infecciones ocurren cuando un estrés resulta en la falla de los mecanismos homeostáticos, permitiendo la multiplicación anormal de las bacterias en el tracto digestivo. A su turno esto incrementa el estrés y eventualmente permite que las bacterias invaden el hemocelo, cuasando septicemia.

No hay evidencias concretas publicadas a nivel de campo que estas bacterias pueden usarse para el control de una población de escarabaeidos sanos. Tampoco no existen métodos de formulación o producción adaptables a empresas pequeñas. Por lo tanto es preferible considerar por el momento que todavía falta mucho trabajo de investigación que justifique demasiado optimismo que estas bacteris van a ofrecer una respuesta al corto o mediano plazo.

#### b) Bacterias que no forman esporas

##### 1. *Serratia entomophila* Grimont *et al.* y *S. proteamaculans* (Paine & Stansfield) Grimont *et al.*

Algunas cepas de estas dos bacterias causan la "enfermedad amber" en *Costelytra zealandica*, un escarabaeido en pastos en Nueva Zelandia. Las bacterias, que dependen de la presencia de un plasmido para ser patogénicas, son totalmente especificas y no causan enfermedad en otros escarabaeidos, aun los que inhacen el mismo pasto. Una formulación de *S. entomophila* esta comercializado por Monsanto en Nueva Zelandia como "Invade", y es de especial interés porque es el primer ejemplo del uso comercial de una bacteria que no forma esporas. Previamente, la falta

de una etapa resistente fue considerado un impedimento insuperable al aprovechamiento de este grupo de patógenos.

Después de infectarse, la larva deja de comer y evacua el tracto digestivo, quedando así medio transparente con un color a miel. Varias semanas después, la larva se muere, con grandes cantidades de bacterias en la hemolinfa. La causa exacta de la muerte es desconocida, pero se sabe que las bacterias dañan al membrano que protege el tracto digestivo anterior, y se sospecha que esto "engaña" a la larva simulando el estado de muda (cuando naturalmente el insecto pierde el membrano y evacua el tracto digestivo).

Ninguna enfermedad análoga ha sido confirmada en otras especies de escarabaeido, pero esto quizás refleja el poco que se ha buscado mas que una realidad biológica. Síntomas parecidos han sido reportado en larvas de *Rhizotrogus majalis* en Europa, y Klein (1992) cita datos no publicados de él y Jackson que asocian bacterias similares a *Serratia* con síntomas parecidos en *P. japonica* en EEUU. Dados los antecedentes del éxito comercial de *S. entomophila* en NZ, parecería interesante buscar asociaciones similares en América Central en *Phyllophaga*.

## 2. Otras especies

Otro grupo de bacterias no formadores de esporas son clasificados para conveniencia como invasores rápidos. Este grupo incluye algunas cepas de *Serratia*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* y *Acinetobacter*. Estas bacterias son ingeridas del suelo y pueden producir septicemia en pocos días. Las larvas normalmente tienen el cadaver negro y suave. La determinación de cepas verdaderamente patogénicas es difícil porque otros factores pueden afectar la susceptibilidad del insecto (ej. el estrés, insecticidas, otras enfermedades, alta densidad poblacional). Pocas cepas de estas bacterias resultan ser consistentemente patogénicas *via oral*. Vargas y Abarca (1991) reportaron patogenicidad y protección de plántulas de maíz tratadas con *Erwinia* sp. en *Phyllophaga* spp. Otros han reportado las siguientes especies como patógenos de *Phyllophaga* spp.: *Diplococcus* sp. (*Lachnosterna* (= *Phyllophaga*) *consanguinea*); *Micrococcus nigrofasciens* (*Phyllophaga* sp., *P. vandine*); *Pseudomonas aeruginosa* (*Phyllophaga* sp., *P. anxia*); *Pseudomonas* sp. (*P. smithii*); *Serratia marcesens* (*P. anxia*, *P. smithii*).

Al igual que las especies menos investigadas de bacterias que producen esporas, hace falta bastante trabajo antes de poder decidir si, entre el rango amplio de cepas disponibles, existen cepas que podrían desarrollarse como agentes de control microbiano.

## ii. Hongos

Los hongos, con algunas excepciones, se reproducen por esporas y no tienen clorofilo. La mayoría de las partes del organismo pueden continuar de crecer cuando se separan del resto del organismo. La mayoría producen micelio, una estructura en forma de filamentos que frecuentemente tiene ramificaciones. Las esporas se producen sobre estructuras especializadas y pueden ser asexuales o sexuales.



Taxonomicamente, los hongos se dividen en cuatro Divisiones: Mastigomycota y Zygomycota (los hongos inferiores), y Ascomycota y Basidiomycota (los hongos superiores); mas una división, Deuteromycetes (o Fungi Imperfecti) que contiene especies de hongos superiores que solo se conocen en su forma asexual. Estrañamente, algunos hongos se clasifican con dos o mas nombres si la forma sexual (el teleomorfo) y asexual (el anamorfo) se descubrieron por separado. A veces la relación entre las formas no se ha demostrado o solo una forma ahora existe. Se sospecha que esto es el caso en algunos de los hongos entomopatógenos mas comunes que se clasifican en los Deuteromycetes, como *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*.

#### a) Hongos asociados con insectos del suelo

Samson *et al.*, (1988) en el libro *Atlas of Entomopathogenic Fungi* registran 51 géneros de hongos que son patógenos de insectos, pero no son todos asociados con insectos del suelo. Además de los patógenos, hay muchos otros géneros que se encuentran asociados con insectos muertos que solo son saprófitos o patógenos oportunisticos (ej. *Penicillium* y la mayoría de los *Aspergillus*). Algunos de los hongos comunmente llamado patógenos, estrictamente se consideran patógenos facultativos, es decir que tambien pueden crecer en otros medios. Sin embargo, en el suelo su germinación y crecimiento son mas lentos que los organismos saprófitos, y se piensa que en la práctica son principalmente patógenos de insectos. En mucha de la siguiente discusión se concentra sobre *Beauveria* y *Metarhizium*, porque son los dos géneros que han sido considerado mas para uso en control microbiano de insectos del suelo. Sin embargo, existen otros géneros con especies entomopatógenicas a los insectos del suelo (Cuadro 1).

#### b) Patogénesis y ciclos de vida

Una larva muerta por un hongo patogénico frecuentemente tiene el cadaver duro, siendo lleno de micelio. Posteriormente, si se incuba en condiciones de alta humedad (casi siempre el caso en el suelo), frecuentemente producen abundante crecimiento de micelio afuera del cadaver, con los conidios (esporas) incluidos adentro de la masa de micelio (ej. *Beauveria*) o conidios sobre una base de micelio (ej. *Metarhizium*). A veces el cadaver se encuentra pigmentado.

La infección de un insecto se inicia con la adhesión de una o mas esporas a la cutícula. Las esporas pueden adquerirse durante movimientos naturales en el suelo (se estima que en forma natural existen  $10^2$  a  $10^3$  conidios/ml suelo) o como una consecuencia de dosificación por el hombre en una formulación de un producto microbiano. Una vez germinados, los conidios penetran la cutícula por una combinación de acción enzimática y presión física. Por lo tanto, a diferencia de las bacterias y los protozoarios, los conidios de los hongos no tienen que ingerirse para infectar el hospedante; al contrario, casi nunca ocurre la penetración después de la ingestión. Sitios comunes para la penetración son en las áreas intersegmentales, quizás porque los conidios tienden a no ser eliminadas tan facilmente en estas zonas cuando el insecto se moviliza en el suelo.

Cuadro 1. Clases de hongos que contienen géneros patógenos de insectos del suelo.

Deuteromycetes	Ascomycetes	Zygomycetes
<i>Akanthomyces</i>	<i>Cordyceps</i>	Entomophthorales
<i>Beauveria</i>	<i>Torrubiella</i>	
<i>Hirsutella</i> *		
<i>Metarhizium</i>	Chytridiomycetes	
<i>Paecilomyces</i> *	Coelomycetes	
<i>Tolytocladium</i>	<i>Entoderma</i>	
<i>Verticillium</i>		

\* Géneros que contienen anamorfas de *Cordyceps*

Después de lograr la penetración, el hongo prolifera en el hemocelo, típicamente llegando a llenarlo con micelio. La muerte se causa cuando uno o varios de los efectos del hongo supera un umbral crítico: la interferencia del micelio con órganos y tejidos claves; el desgaste de nutrientes claves; la producción de toxinas. El tiempo que dura entre la infección y la muerte varía según múltiples factores que interactúan. Como ejemplos de tiempos para algunas especies de escarabajos expuestas a *Metarhizium* o *Beauveria* en bioensayos, pueden citarse 2 a 3 semanas para el L3 de *Costelytra zealandica* a 20°C, 8 a 21 días para el L2 y L3 de *P. menetriesi* a 28°C y 1 a 3 meses para el L3 de *P. obsoleta* a 21°C.

Después de la muerte, las hifas del micelio emergen del cadáver y producen conidióforos, estructuras especializadas para la producción de conidios. Se supone que la cantidad de conidios producida es importante en determinar la potencialidad del hongo para provocar un epizootico. Aunque en la teoría esta es una característica deseable, no es claro si en la práctica esta acción o la de micoinsecticida será la más importante.

El proceso de patogénesis puede ser modificado en cuanto a la proporción de insectos expuestos que se infectan, en la tasa de desarrollo de la infección, en el punto en que se concluye, y en la cantidad de nuevo inóculo producido. El tipo y magnitud de la modificación dependen de la interacción de variables del hospedante, el patógeno y el ambiente (Cuadro 2). El efecto de varios de estos factores son pobremente entendidos y frecuentemente son ignorados durante la investigación para desarrollar hongos como agentes de control. Aún menos entendidos son las interacciones entre los factores, y esto probablemente explica porque los resultados de laboratorio frecuentemente no pueden duplicarse directamente en el campo. Sin embargo, la complejidad y duración larga de la investigación necesaria para entender todos los factores y sus interacciones significa que la mayoría de intentos a desarrollar hongos para control dependen de ensayos empíricos.

## c) Especies con potencial para uso en el control microbiano

### 1. Deuteromycetes

El grupo de los Deuteromycetes contiene los dos géneros de entomopatógenos más estudiados para el control microbiano, *Beauveria* y *Metarhizium*. Ambos hongos son ubíquitos en suelos, donde ocurren como conidios (esporas asexuales). Aunque algunos investigadores los consideran como patógenos facultativos, capaces de crecer saprofiticamente, la asociación con insectos es probablemente su modo principal de vivir. Ambos tienen un rango amplio de genotipos (cepas) que son adaptados a diferentes especies o grupos de especies de insecto. Ambos hongos causan epizooticos en insectos del suelo en la naturaleza. Las diferentes cepas normalmente no tienen la misma virulencia contra diferentes estadios del hospedante. La variabilidad en la virulencia entre cepas de los hongos hace destacar la importancia de

**Cuadro 2. Factores que interactúan para determinar la tasa de mortalidad y el tiempo a la muerte de un hongo entomopatógeno.**

Clasificación de factores		
Hospedante	Patógeno	Ambiente
Especie	Virulencia	Temperatura
Estadio	Cantidad de Inóculo	Humedad (HR%)
Estado fisiológico*	Adherencia de Inóculo*	Competidores*
Sexo*	Viabilidad	Hiperparásitos*
Otras enfermedades*	¿Estado Fisiológico?*	
	ej. madurez	

\*Factores cuyo efecto sobre la patogénesis son pobremente entendidos

la selección de cepas en programas de control microbiano. En general, insectos de las partes aéreas son más susceptibles que insectos del suelo, quizás porque no entran en contacto con el inóculo con mucha frecuencia y por lo tanto no han desarrollado mecanismos de defensa.

Bajo condiciones estériles, ambos hongos también crecen fácilmente y producen conidios sobre medios simples como agar o granos de cereales, una característica que los hace atractivos desde el punto de vista de producción de inóculo. En sistemas sencillas de producción en arroz cocido es posible producir en la región de  $10^9$  conidios/g ( $10^{12}$  conidios/kg arroz).

En el laboratorio, cepas de ambos hongos tienen la  $CL_{50}$  en larvas de una especie susceptible de escarabajo de  $10^5$ - $10^8$  conidios /ml suelo.

En Australia, en lo que parece ser una especie especialmente susceptible la  $CL_{50}$  es  $10^3$ - $10^4$  conidios/g suelo.

Se pueden facilmente encontrar nuevos aislamientos de ambos hongos de insectos enfermos, o en suelos usando medios selectivos o usando insectos como *Galleria* como cebos. Son faciles de conservar; existen varios métodos que permiten almacenar cultivos por periodos de 2 a 3 años sin necesidad de subcultivar, y en nitrógeno líquido se puede preservar durante decadas. Para mantener la viabilidad de inóculo producido para uso comercial, se puede almacenar a temperaturas bajas durante varios meses, pero parece que la baja humedad podría ser el factor clave en determinar la vida en el almacen.

*Paecilomyces*, *Hirsutella*, *Verticillium* y *Akanthomyces* son otros géneros del Deuteromycetes que han sido registrado en especies de escarabaeido pero ninguno hasta ahora ha sido seriamente considerado para desarrollo como agente de control microbiano.

### 1. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y otras *Beauveria* spp.

Todas las especies de *Beauveria* tipicamente producen cantidades abundantes de micelio blanco sobre el cadaver de un insecto, frecuentemente concentrado en las areas de membrana intersegmental. En insectos en suelo, el crecimiento de micelio puede extenderse varios centímetros del cadaver. Tipicamente, el cadaver infectado de larvas de escarabaeidos toma un color rosado antes de la producción de micelio. Los conidios se producen distribuidos sobre y adentro de la masa de micelio y tambien tienen color blanco a blanco-cremoso. En general, se considera que los conidios de *Beauveria* son menos persistentes en el suelo que los de *Metarhizium*.

Hay cuatro especies de *Beauveria* que son activas contra escarabaeidos: *B. bassiana*, *B. brongniartii* (= *B. tenella* y *B. densa*), *B. amorpha* (= *Isaria amorpha* y *Isaria orthopterorum*), y *B. vermicornia*.

*B. brongniartii* es mas comunmente encontrado sobre escarabaeidos, y ha sido utilizado con exito para controlar adultos y, mas recientemente, larvas de dos escarabaeidos europeos, *Melolontha melolontha* y *M. hippocastani*. Se ha experimentado variación en los resultados, pero en balance el programa se considera bastante exitoso (Zimmermann, 1992).

- *B. bassiana* y una posible especie nueva de *Beauveria* han sido aislado de larvas de campo de *P. obsoleta* en Costa Rica, y *Beauveria* sp. es un patógeno bastante común en adultos de *P. menetriesi* (Shannon et al, datos no publicados). En pruebas de selección con altas dosificaciones de hongo, se encontraron altos niveles de mortalidad en larvas L2 de *P. menetriesi* en la mayoría de 16 aislamientos de *Beauveria*. Sin embargo, ninguno esporuló y mortalidad en el L3 y en otras especies de *Phyllophaga* fue muy bajo (Shannon et al, 1993).

- Con base en la evidencia actual, se considera que *Beauveria* es menos promisorio que *Metarhizium* para desarrollo contra *Phyllophaga*. Sin embargo, esta hipótesis podría cambiar a medida que se evalúen mas aislamientos o si se incrementa el interés en control de adultos como estrategia de manejo.

## 2. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin y otras *Metarhizium* spp.

Las especies de *Metarhizium* producen micelio de color blanco a amarillo sobre todo o partes del cadáver, que posteriormente producen una capa de conidios en columnas sobre la superficie. Los conidios son verdes, verde-gris a amarillo en color.

Hay tres especies que se separan según el tamaño y forma de los conidios. *M. anisopliae* (var. *majus*, y var. *anisopliae*), *M. album* y *M. flavoviride*. La validez de las especies y las variedades está cuestionada y hay algunas que consideran que solo existe una especie, *anisopliae* con 6 o 7 variedades o subespecies. En general, se considera que las formas con esporas grandes (aproximándose a var. *majus*) son mas virulentas en escarabaeidos.

En diferentes ocasiones se ha intentado formular *Metarhizium* para control de insectos, el primer intento, de Metschnikoff, ya se citó. Mas recientemente, una formulación de *M. anisopliae* fue comercializada para uso en Australia contra un escarabaeido de pastos *Adoryphorus couloni*, bajo el nombre comercial "BioGreen". Hasta recientemente, Bayer estaba desarrollando una formulación de una cepa élite, BIO 1020, para uso contra un picudo, *Otiorhynchus sulcatus*, como micelio granulado. Se rumoró que tambien iba a tener uso contra escarabaeidos. Esta formulación aprovechó de una característica de algunas cepas que cuando se fermentan en medio líquido, forman nucleos de micelio (Wolfram, Jurgen *et al.*, 1990). Cuando se secan, estos tienen la apariencia de granulados. Son mas faciles de almacenar que el polvo de conidios y, en condiciones húmedas, crecen y producen nuevos conidios. Inesperadamente, en 1993 Bayer abandonaron planes para producir BIO 1020 comercialmente, en parte porque iba a competir con otros productos biológicos como los nemátodos entomopatógenos.

- e Cepas de *Metarhizium* con buena actividad en especies de *Phyllophaga* parecen ser escasos. De 160 aislamientos evaluados en pruebas preliminares contra *P. menetriesi*, *P. vicina* y *P. obsoleta*, solamente tres infectaron suficiente larvas de dos o mas de las especies para justificar continuar investigandolos. Un mayor número de aislamientos manifestó buena infectividad en solo una de las especies evaluadas, destacando la especificidad de muchos aislamientos de este hongo. Muchos aislamientos resultaron avirulentos o de muy baja virulencia (Shannon *et al.*, 1993 y datos no publicados) y es evidente que la adecuada selección de genotipo probablemente sea crítico para el uso de este hongo. Excepto en dosificaciones muy altas, aún los aislamientos mas virulentos no esporularon bien sobre el cadáver en pruebas realizadas hasta ahora; esta característica, si se la confirme, limitaría el uso inoculativo de estos aislamientos y casi obligaría su uso como micoinsecticida.

Aunque *Metarhizium* todavía no esta listo para uso comercial, actualmente existe mas información sobre este agente que para otros organismos con potencial de uso en el control microbiano de *Phyllophaga*.

#### d) Otros hongos entomopatógenos de escarabaeidos

El Cuadro 1 cita varios géneros mas de hongos que han sido reportados de plagas el suelo, la mayoría tambien en escarabaeidos. Algunos han sido probabados para control (ej *Verticillium lecanii* contra *Holotrichia consanguinea* en la India) aparentemente con resultados aceptables. Es posible que con mas investigación otros hongos podrían convertirse en candidatos para el control microbiano; por el momento, no hay suficiente información o métodos disponibles para su producción y formulación para concluir definitivamente si tengan potencial.

#### iii. Nemátodos entomopatógenos

A veces denominados nemátodos entomógenos, los nemátodos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae poseen varias características que los hacen especialmente interesantes como agentes de control microbiano, especialmente en cuanto a las plagas del suelo. Aunque otros nemátodos invaden oportunisticamente a insectos en el suelo, estas familias son las únicas que estan seriamente consideradas para el uso comercial. El suelo es su medio natural y matan rapidamente al hospedante debido a una infección bacteriana que transmiten. Algunos pueden "cazar" su presa, aunque esta habilidad puede variar con su edad y raramente excede dos a tres centímetros de distancia en un suelo arenoso. Pueden producirse y comercialmente algunas cepas ya se producen en masiva por empresas privadas (ej BioSys) y, porque no son estrictamente patógenos y no afectan otros organismos, son exentos de registro de la EPA.

Las dos familias de nemátodos tienen una relación mutualista con bacterias que portan en estructuras especializadas y que liberan en el hospedante cuando lo penetran en estado de "infectivo juvenil" (IJ). La multiplicación de las bacterias previene que otras bacterias pueden colonizar el cadaver y asegura que los nemátodos tengan alimento para terminar su desarrollo. Normalmente sufren dos o tres ciclos de reproducción en el cadaver antes de emerger al suelo como IJs. El IJ es el el estadio que se usa para control microbiano y, en cuanto al desarrollo del nemátodo es un juvenil del tercer estadio que posee resistencia a condiciones ambientales adversas. Es el único estadio que se encuentra afuera del cadaver. Las características únicas de las dos familias de nemátodos se resumen en el Cuadro 3.

Pruebas de laboratorio y campo han demostrado la susceptibilidad de las larvas de escarabaeidos a los nemátodos entomopatógenos. *Steinernema glaseri* y *Heterorhabditis bacteriophora* parecen ser mas efectivas que *S. carpocapsae*, pero los resultados varían, en parte debido a factores ambientales pero tambien debido a diferencias en cuanto a las cepas usadas y métodos de producción. *S. glaseri* es la especie mas grande conocida y presenta problemas especiales en la producción, formulación y transporte (parece ser mas delicada que *S. carpocapsae*).

**Cuadro 3. Comparación de las características claves de los nemátodos Steinernematidae y Heterorhabditidae.**

Característica	Steinernematidae	Heterorhabditidae
Bacterias mutualistas	<i>Xenorhabdus</i>	<i>Photorhabdus</i>
Entrada en la presa	solo por aperturas ej. ano, espiráculo	tambien por cutícula por medio de ganchos
Reproducción	solo Amfimita	Hermafrodita y Amfimita
Color del cadaver (48h)	negro	rojizo

- Kard *et al.* (1988) probaron varias cepas de nemátodos contra *Phyllophaga fusca*, *P. anxia* y *P. comes*, logrando obtener mortalidades de 60-80% en el laboratorio después de 2-4 días en los casos de la cepa DD-136 de *S. carpocapsae* y *H. bacteriophora*. Resultados en el campo fueron mas variables. Forschler y Gardner (1991) reportaron que la cepa HP-88 de *H. bacteriophora* fue mas efectiva que la cepa ALL de *S. carpocapsae* y *S. glaseri* (una cepa no especificada proveniente de Biosys) contra *P. hirticula* en suelo en el laboratorio. in soil arenas. En pruebas de selección preliminar de 21 cepas realizadas sobre larvas de *Phyllophaga* centroamericanas, *S. glaseri* (cepa USA) resultó ser superior en *P. vicina* (L2 y L3) y *P. obsoleta* (L3), pero una cepa local de *Steinernema* sp. (cepa CERV) fue superior a las demás cepas contra *P. menetriesi* (L2 y L3) (Caroline Smith, datos no publicados). Estos resultados demuestran la potencial que puede existir en la diversidad nativa no explorada, y se pretende evaluar mas cepas nativas durante 1994, algunas que han sido provisionalmente identificadas como especies nuevas (T. Jackson, comm. pers.).

A pesar de los resultados promisorios de laboratorio, existen serios impedimentos biológicos y técnicos al uso de nemátodos a nivel de campo que probablemente limitarán su uso a condiciones especiales para el futuro inmediato. Actualmente su uso principal es en condiciones protegidas de invernadero o en cultivos de alto valor. Métodos de producción, formulación, condiciones de almacenamiento y transporte continuan bajo investigación debido a los efectos negativos que condiciones subóptimas pueden tener sobre la viabilidad, vigor y infectividad de los nemátodos usados en el campo.

#### D. Patógenos menores de escarabaeidos

Un grupo diverso de otros organismos causan enfermedades en larvas y adultos de escarabaeidos al nivel mundial, pero son poco estudiados en general y especialmente en América Central. Representan organismos

que pueden jugar un papel importante en regular poblaciones en la naturaleza pero, por una razón u otra, no son considerados como buenos candidatos para uso por el ser humano. Quizás el mayor potencial de aprovechar de estos organismos existe en modificación del ambiente para mejorar su impacto sobre poblaciones de plagas. Sin embargo, el pobre conocimiento actual de la ecología de escarabaeidos y sus patógenos dificulta el manipuleo intencional para estos fines.

### i. Virus

Con la excepción del baculovirus de *Oryctes* y el entomopoxvirus de *Melolontha melolontha*, los virus de escarabaeidos tienen poco potencial actual para uso debido a las dificultades de producción, tasas lentas de infección, y consideraciones de seguridad de producción y uso. Ningún VPN ha sido descubierto en escarabaeidos y el único caso reportado de un VG probablemente es mal identificado. Ningún virus de *Phyllophaga* ha sido reportado en América Central, y sólo dos (un iridovirus y un poxvirus) a nivel mundial. Sin embargo, pocos estudios han sido realizados en escarabaeidos y podrían existir más tipos de virus con mayor potencial de uso.

La mayoría de los virus de insectos tienen un rango limitado de hospederos y actúan lentamente. La producción depende de la producción en insectos vivos. Hay preocupaciones en cuanto a posibles problemas en la salud humana debido a la similitud de algunos virus de insectos a los virus de mamíferos. Más estudios y el posible descubrimiento de otros tipos de virus podrían quitar los obstáculos actuales al uso y producción de virus, pero por ahora, su uso contra escarabaeidos queda varios años para el futuro.

### ii. Protozoarios

Formas entomopatógenicas de protozoarios ocurren en los grupos Microsporida, Eucoccidiida, Neogregarinida y algunos del Eugregarinida. Otros grupos, como los demás del Eugregarinida, Sarcocystophora (flagelados) y Sarcodina (amebas), aparentemente inhabitan el lumen del tracto digestivo sin causar daño al hospedante. La mayoría se transmiten por ingestión de esporas con la comida.

Aunque *Nosema locustae* (Microsporida) ha sido usado durante muchos años para control de chapulines en EEUU, se conoce mucho menos de los protozoarios de escarabaeidos. En especial, se sabe poco de la identidad y ciclos de vida de estos organismos en *Phyllophaga* en América Central. En Costa Rica se ha encontrado infecciones de un eucoccido similar en apariencia a *Adelina* en *P. menetriesi* y *P. obsoleta*, y un eugregarino en el tracto digestivo de *P. menetriesi* (P. Shannon, datos no publicados). Larvas infectadas por el eucoccido tenían gránulos negros visibles a simple ojo en el cuerpo graso donde el insecto había enquistado a los oocistos.

### iii. Rickettsia

Las Rickettsias tienen características similares a los virus; son patógenos obligados que se reproducen en el citoplasma de la célula. También



tienen características similares a las bacterias; poseen tanto ADN como ARN y tienen una pared celular. Se han encontrado *Rickettsia* causando enfermedad letal en varias especies de escarabaeidos, y se sospecha que juegan un papel importante en la dinámica de las poblaciones de algunas especies. Todos los que infectan a escarabaeidos que se han caracterizado hasta ahora pertenecen a una sola especie, *Rickettsiella popilliae*, aunque se reconocen tres subespecies o biotipos. Adicionalmente se reportan muchas infecciones de *Rickettsia* no identificadas. La infección ocurre después de la ingestión de propágulos infectivos, y la muerte ocurre hasta seis meses después. A pesar de algunos resultados promisorios con el uso de *Rickettsia* en ensayos contra *Melolontha melolontha*, hay serias preocupaciones sobre la seguridad de su uso para control comercial. Tienen poca especificidad y pueden infectar a vertebrados. Diagnóstico es difícil y la producción es posible solo en insectos o células vivas.

#### E. Necesidades para trabajos futuros

Se sugiere que entre la multitud de actividades que se podrían hacer para avanzar el control microbiano, los siguientes son algunas que deben asignarse cierta prioridad (sin ningún orden especial):

- i. ) Detectar, identificar y preservar los patógenos nativos.
- ii ) Entender el papel de patógenos en la mortalidad natural.
  - a) ¿Cuándo (en que estadio) ocurren?
  - b) ¿Porque fallan los patógenos en infestaciones dañinas?
- iii) Seleccionar cepas con potencial de control biológico.
  - a) ¿Podemos ir mas allá que la evaluación de virulencia?
- iv ) Documentar casos exitosos de control microbiano en C.A., y distribuir organismos promisorios a otros investigadores.
- v ) Investigar feromonas de *Phyllophaga* spp. para su uso potencial en la dosificación de adultos distribuidores de patógenos
- vi ) Buscar formulaciones de organismos seleccionados para mejorar su efectividad
- vii) Investigar la economía de la producción de productos microbianos basados en industrias locales.
- viii) Investigar el comportamiento de las diferentes especies de *Phyllophaga* en el suelo para identificar oportunidades para uso de productos microbianos.

## F. Bibliografía

Bedford, 1980. Biology, ecology and control of palm rhinoceros beetles. *Annual Review of Entomology* 25: 309-339

Bucher, G.E. 1981. Identification of bacteria found in insects. pp. 7-33 *In: Burges, H.D. (ed.), Microbial control of plant pests and diseases 1970-1980.* London, Academic Press.

Crocker, R.L., Gaylor, M.J. *et al.*, 1982. Field records of pathogens and parasites of scarabs in Texas. *Texas Turfgrass Research* 1982: 41-42.

Díaz M., 1992. Respuesta de *Phyllophaga menetriesi* (Blanchard) y *Phyllophaga obsoleta* (Blanchard) (Coleoptera: Scarabaeidae) a *Bacillus popilliae* Dutky. Tesis MSc, CATIE, Turrialba, Costa Rica. 67pp.

Dunbar, D.M. y Beard, R.L., 1975. Present status of milky disease of Japanese and Oriental beetles in Connecticut. *Journal of Economic Entomology* 68: 453-457.

Glare T.R., 1992. Fungal pathogens of scarabs. pp. 63-77 *In: Jackson, T.A. y Glare, T.R. (eds), Use of pathogens in scarab pest management.* Andover, Gran Bretaña. Intercept. 298pp.

Klein, M.G. y Jackson, T.A., 1992. Bacterial diseases of scarabs. pp. 43-61 *In: Jackson, T.A. y Glare, T.R. (eds), Use of pathogens in scarab pest management.* Andover, Gran Bretaña. Intercept. 298pp.

Liu, J., Zhu, R. *et al.*, 1988. Biocontrol of scarab larvae (Scarabaeidae) in peanut fields by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Nanjing Agricultural University* 11: 54-59.

Poprawski, T.J. y Yule, W.N., 1990. Bacterial pathogens of *Phyllophaga* spp. (Col., Scarabaeidae) in southern Quebec. *Journal of Applied Entomology* 109: 414-422.

Prior, 1992. Discovery and characterization of fungal pathogens for locust and grasshopper control. pp. 159-180 *In: Lomer, C.J. y Prior, C. (eds), Biological control of locusts and grasshoppers. Proceedings of a workshop held at the International Institute of Tropical Agriculture, Cotonou, Republic of Benin, 29 April-1 May 1991.* Wallingford, Reino Unido, CAB International.

Prior, 1992a. Pathogens of Scarabaeid pests of sugar-cane in Mauritius and Reunion and potential control strategies. pp. 237-245 *In: Jackson, T.A. y Glare, T.R. (eds), Use of pathogens in scarab pest management.* Andover, Gran Bretaña. Intercept. 298pp.

Samson, R.A., Evans, H.C. y Latge, J.-P., 1988. *Atlas of Entomopathogenic Fungi.* Berlin, Springer-Verlag.

Shannon, S.M. *et al.*, 1993. Evaluación en el laboratorio de aislamientos costarricenses y exóticos de *Metarhizium* spp. y *Beauveria*

spp. contra larvas de *Phyllophaga* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae). pp. 203-215 *In*: Morón, M.A. (comp.), **Diversidad y manejo de plagas subterráneas. Memorias de la IV Mesa Redonda sobre Plagas Subterráneas, 14 y 15 de octubre de 1993**, Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Veracruz, México. Xalapa, México. Publicación Especial de la Sociedad Mexicana de Entomología y Instituto de Ecología.

Vargas, E. y Abarca, G., 1991. Patogenicidad de *Bacillus cereus* y *Erwinia* spp. sobre jobotos del género *Phyllophaga* spp. (Col.:Scarabaeidae). *Agronomia Costarricense* 15: 157-162.

Wolfram, A., Jurgen, H. *et al.*, 1990. Production of mycelial granules of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* for biological control of soil pests. *Proceedings and Abstracts of the Fifth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control*. Adelaide, Australia. pp.2-5.

Zimmermann, G., 1992. Use of the fungus, *Beauveria brongniartii*, for control of European cockchafers, *Melolontha* spp., in Europe. pp. 199-208 *In*: Jackson, T.A. y Glare, T.R. (eds), **Use of pathogens in scarab pest management**. Andover, Gran Bretaña. Intercept. 298pp.