

## Micobiota y *Metarhizium* asilados de larvas del gusano barrenador del ruezno (*Cydia caryana*)\*

### Mycobiota and *Metarhizium* isolated of borer worm larvae from the ruezno (*Cydia caryana*)

Diana Rosales Macias<sup>1</sup>, José Alfredo Samaniego-Gaxiola<sup>2§</sup>, Selenne Yuridia Márquez Guerrero<sup>3</sup>, Arturo Gaytán Mascorro<sup>2</sup>, Yasmín Chew Madinaveitia<sup>2</sup> y Zaida Crispín del Río<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico Superior de Mulege. Loma Los Frailes SN. Col. Centro, Santa Rosalía, BCS. (diana-rosales@live.com.mx). Tel. 01 (615) 1521673. <sup>2</sup>Campo Experimental La Laguna-INIFAP. Blvd. José Santos Valdez 1200 Pte., Col. Centro, Matamoros, Coahuila, México. CP. 27440. Tel. 01 (800) 0882222, ext. 82402. (gaytan.arturo@inifap.gob.mx; chew.yasmin@inifap.gob.mx). <sup>3</sup>Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas-Universidad Autónoma Chapingo. Carretera Gómez Palacio-Chihuahua-Bermejillo km 40, Durango, México. CP. 35230. Tel. 01 (872) 7760190. (selenne.marquez@hotmail.com). <sup>4</sup>Instituto Tecnológico de Torreón. Carretera Torreón-San Pedro km 7.5, Ejido Ana. CP. 27170. Tel. 01 (871) 3153771. (crispindelrio@yahoo.com.mx). <sup>§</sup>Autor para correspondencia: samaniego.jose@inifap.gob.mx.

## Resumen

La necesidad de contar con organismos nativos con potencial para el control biológico de plagas para el nogal pecanero, motivaron el registro de la micobiota y búsqueda de entomopatógenos en larvas del gusano barrenador del ruezno (GBR) *Cydia caryana*. Para ello, en el año 2013, en una huerta de nogal en La Laguna México, se recolectaron y procesaron 5 000 rueznos para extraer larvas de GBR, que fueron incubadas en cámara húmeda o suelo. De larvas obtenidas antes del 12 de septiembre y colocadas en suelo se recuperó 9% de *Fusarium* spp. + *Gliocladium* spp., en contraste, ambos hongos aparecieron 40% en larvas obtenidas después de esa fecha. En larvas obtenidas en diciembre y se colocaron en cámara húmeda, *Fusarium* + *Gliocladium* spp. aparecieron 80%. Únicamente fue evidentemente a *Metarhizium anisopliae* como entomopatógenos de 5% de larvas del GBR colocadas en suelo después del 12 de septiembre, éste hongo también fue entomopatógenos del ácaro rojo gigante *Trombidium* sp., pulgón negro del nogal *Melanocallis caryaefoliae*, Garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, y hormiga roja *Solenopsis* sp. Larvas de GBR

## Abstract

The necessity of having native organisms with potential for the biological control of pests for walnut pecan, motivated the registration of the mycobiota and search for entomopathogens in larvae of the worm borer of the rinds (GBR) *Cydia caryana*. To do so, in the year 2013, in a walnut orchard in The Laguna Mexico, 5 000 rindss were collected and processed to extract GBR larvae, which were incubated in a humid chamber or soil. Of larvae obtained before September 12 and placed in soil recovered 9% of *Fusarium* spp. + *Gliocladium* spp., In contrast, both fungi appeared 40% in larvae obtained after that date. In larvae obtained in December and placed in a humid chamber, *Fusarium* + *Gliocladium* spp. appeared 80%. It was only evidently *Metarhizium anisopliae* as entomopathogens of 5% of GBR larvae placed in soil after September 12, this fungus was also entomopathogenic of the giant red mite *Trombidium* sp., Black aphid of the walnut *Melanocallis caryaefoliae*, Tick *Rhipicephalus sanguineus*, and ant red *Solenopsis* sp. The GBR larvae can be used as a trap to recover *Metarhizium* and probably other entomopathogenic fungi on the soil of pecan walnut orchards.

\* Recibido: junio de 2017  
Aceptado: septiembre de 2017

pueden usarse como trampa para recobrar *Metarhizium* y probablemente otros hongos entomopatógenos en suelo de huertas de nogal pecanero.

**Palabras clave:** GBR, hongos entomopatógenos, nogal.

## Introducción

México, es considerado un país mega diverso, incluyendo una fuente de enemigos naturales para plagas y enfermedades de plantas, que forman parte de programas de control biológico en el mundo, de echo nuestro país, aporta al mundo más organismos para el control biológico de plagas que los que recibe; sin embargo, solo cuatro géneros de hongos y uno de bacterias se utilizan ampliamente como control biológico de plagas. Aunado a lo anterior, existe la necesidad de protegerse de la aparición de nuevas plagas en México y otros países, por ello, es importante contar con organismos nativos con potencial para el control biológico de plagas (Williams *et al.*, 2013).

Asimismo, la necesidad de mantener una agricultura sostenible, ha originado la investigación, desarrollo y adopción de métodos de control biológico, particularmente en nuestro país, ha ocurrido de manera acentuada en los últimos 20 años. Entre los hongos con un mayor potencial para el control biológico de insectos se encuentran las especies de *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces*, quien se caracterizan por ser cosmopolita y que algunas de sus especies atacan una gama amplia de órdenes de insectos (García y Mier, 2010).

Por otra parte, existen plagas de importancia para el nogal pecanero *Carya illinoensis* (Wangenh.) K.Koch, como los barrenadores de la nuez (GBR) y el ruezno (GBN) *Acrobasis nuxvorella* (Neunzig) y *Cydia caryana* (Fitch), respectivamente (Nava y Ramírez, 2002), aunque poco se sabe de los hongos como enemigos naturales de ambas plagas. En contraste, en suelos agrícolas cultivados con caña de azúcar *Saccharum officinarum* L., frijol *Phaseolus vulgaris* L. y maíz *Zea mays* L., se han aislado hongos entomopatógenos (Barajas *et al.*, 2009; Bautista *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2011).

Comúnmente, se aíslan hongos entomopatógenos de suelos agrícolas o forestales utilizando como trampa larvas de la pililla de los apiarios *Galleria mellonella* L. (Hernández *et*

**Keywords:** entomopathogenic fungi, GBR, walnut.

## Introduction

Mexico, is considered a mega diverse country, including a source of natural enemies for pests and plant diseases, which are part of biological control programs in the world, in fact our country, brings to the world more organisms for the biological control of pests than those he receives; however, only four genera of fungi and one of bacteria are widely used as biological control of pests. In addition to the above, there is a need to protect against new pests in Mexico and other countries, so it is important to have native organisms with potential for biological pest control (Williams *et al.*, 2013).

In addition, the need to maintain a sustainable agriculture has led to the research, development and adoption of biological control methods, particularly in our country, has occurred in a marked way in the last 20 years. Among the fungi with the greatest potential for biological control of insects are the *Beauveria*, *Metarhizium* and *Paecilomyces* species, which are cosmopolitan and some of their species attack a wide range of insect orders (García and Mier, 2010).

On the other hand, pests of importance to the walnut nut *Carya illinoensis* (Wangenh.) K.Koch, such as nut borers (GBR) and rinds (GBN) *Acrobasis nuxvorella* (Neunzig) and *Cydia caryana* (Fitch) respectively (Nava and Ramírez, 2002), although little is known of the fungi as natural enemies of both pests. In contrast, in agricultural soils cultivated with sugarcane *Saccharum officinarum* L., bean *Phaseolus vulgaris* L. and maize *Zea mays* L., entomopathogenic fungi have been isolated (Barajas *et al.*, 2009; Bautista *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2011).

Commonly, entomopathogenic fungi are isolated from agricultural or forest soils using larvae from the pilary of apiaria *Galleria mellonella* L. (Hernández *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2005; Sookar *et al.*, 2008). The GBR larvae usually damage the rinds (outer bark that covers the shell of the walnut) from where they feed and move to pupa and finally adult, in the process, some nuts fall to the ground where the larvae could be infected by entomopathogenic fungi. Therefore, the objectives of the work were: i) to record the mycobiota and to find entomopathogenic fungi in GBR larvae inside the rinds and in larvae used as a trap in

*al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2005; Sookar *et al.*, 2008). Las larvas del GBR suelen dañar al ruezno (corteza exterior que recubre la cáscara de la nuez) de donde se alimentan y mudan a pupa y finalmente adulto, en el proceso, algunas nueces caen al suelo en donde las larvas podrían infectarse por hongos entomopatógenos. Por tanto, los objetivos del trabajo fueron: i) registrar la micobiota y encontrar hongos entomopatógenos en larvas del GBR dentro del ruezno y en larvas utilizadas como trampa en suelo cultivado con nogal; y ii) evaluar la patogenicidad de los entomopatógenos sobre larvas de GBR, el pulgón negro del nogal *Melanocallis caryaefoliae* Davis y otros insectos.

## Materiales y métodos

El trabajo de campo se realizó durante el verano de 2013, en la huerta “Hormiguero”, ubicada en la Carretera Torreón - San Pedro km 16, municipio de Matamoros, Coahuila, cuyas coordenadas a la entrada de la huerta son +25° 41' 23.98", -103° 20' 5.59". El estudio de laboratorio, se llevó a cabo en el laboratorio de fitopatología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en Matamoros, Coahuila.

Rueznos y GBR. Tres fechas de recolección de rueznos se realizaron, en las dos primeras se recolectaron nueces para obtener sus rueznos con signos de entrada por el GBR, en la tercera fecha se recolectaron 100 kg de ruezno recién separado de la nuez por medio de maquinaria industrial (separadora del ruezno de la nuez). Todos los rueznos obtenidos se almacenaron en un cuarto frío a temperatura 5-8 °C hasta extraerles sus larvas y pupas de GBR (ruezno procesado). Las fechas de recolección y procesamiento de rueznos para extraer larvas y pupas del GBR y tiempo de almacenamiento antes de procesarlos se indican en el Cuadro 1.

Colonización de larvas y pupas. En la huerta hormiguero, debajo de la copa de los nogales se recolectaron de la superficie del suelo muestras de 20 g, las que se colocaron en cajas Petri de plástico estéril. Al suelo de cada caja se le añadió agua destilada estéril al 80% de saturación. Enseguida, cinco larvas y pupas (vivas o muertas) obtenidas en las fechas 30-08-2013 y 06-09-2013 se colocaron por cada caja y se incubaron por siete días a 28 °C. Larvas vivas obtenidas en las fechas 12-09-2013, 10-10-2013, 17-10-2013, 01-11-2013 y 11-11-2013 también se colocaron en cajas Petri con suelo e incubaron siete días a 28 °C. Las

walnut cultivated soil; and ii) to evaluate the pathogenicity of entomopathogens on GBR larvae, the black aphid of the walnut *Melanocallis caryaefoliae* Davis and other insects.

## Materials and methods

Field work was carried out during the summer of 2013, in the “Hormiguero” orchard, located on the Road Torreón-San Pedro km 16, municipality of Matamoros, Coahuila, whose coordinates at the entrance of the orchard are +25° 41' 23.98", -103° 20' 5.59". The laboratory study was carried out in the Phytopathology Laboratory of the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock Research (INIFAP) in Matamoros, Coahuila.

Rueznos and GBR. Three dates of harvesting of rinds were made, in the first two were collected nuts to obtain their rinds with signs of entry by the GBR, in the third date were collected 100 kg of rinds newly separated from the nut by means of industrial machinery (separator of walnut ring). All the rinds obtained were stored in a cold room at temperature 5-8 °C until extracted their larvae and pupae of GBR (rinds processed). The dates of collection and processing of rinds to extract larvae and pupae from the GBR and storage time before processing are indicated in Table 1.

Colonization of larvae and pupae. In the anthill garden, samples of 20 g were collected from the surface of the soil under sterile plastic petri dishes. To the floor of each box was added sterile distilled water at 80% saturation. Then, five larvae and pupae (live or dead) obtained on 30-08-2013 and 06-09-2013 were placed per box and incubated for seven days at 28 °C. Live larvae obtained on dates 09-09-2013, 10-10-2013, 17-10-2013, 01-11-2013 and 11-11-2013 were also placed in Petri dishes with soil and incubated for seven days at 28 °C. The larvae that were obtained on 11-12-2013 were placed in groups of five in each humid chamber (Petri dish with wet sterile blotting paper) for ten days at 28 °C and incubated seven days at 28 °C.

Isolation and purification of fungi that invaded larvae and pupae. After incubating the larvae and pupae under aseptic conditions with a sterile hypodermic needle, the fungi were harvested, then the fungi were transferred to two culture media: water agar (AA) and potato dextrose agar (PDA). The two culture media were added 50 mg L<sup>-1</sup> of the antibiotic amoxicillin after sterilization. The AA and the PDA were

larvas que fueron obtenidas el 12-11-2013, se colocaron en grupos de cinco en cada cámara húmeda (caja Petri con papel secante estéril húmedo) por diez días a 28 °C e incubaron siete días a 28 °C.

prepared by adding per liter of distilled water 17 g of agar for both media and only for the PDA, 20 g of food grade fructose (Gold Bell®) and the liquid from 200 g of potato cooked in one liter of distilled water.

**Cuadro 1. Recolección, almacenamiento y procesamiento de rueznos de nogal pecanero, para obtener larvas y pupas del gusano barrenador del ruezno, durante 2013 en la huerta “Hormiguero” en Matamoros, Coahuila, México.**

**Table 1. Collection, storage and processing of pecan nut rinds, to obtain larvae and pupae of the worm borer of rinds, during 2013 in the “Hormiguero” orchard in Matamoros, Coahuila, Mexico.**

| Fecha de recolección | †Almacenamiento de rueznos en días | ‡Procesamiento de rueznos | Número de rueznos procesados | §Larvas |         | §Pupas |         |
|----------------------|------------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------|---------|--------|---------|
|                      |                                    |                           |                              | Vivas   | Muertas | Vivas  | Muertas |
| 26-08-2013           | 4                                  | 30-08-2013                | 114                          | 13      | 1       | 10     | 5       |
| 05-09-2013           | 1                                  | 06-09-2013                | 140                          | 30      | 11      | 6      | 2       |
| 05-09-2013           | 7                                  | 12-09-2013                | 254                          | 21      | 29      | 3      | 1       |
| 27-09-2013           | 13                                 | 10-10-2013                | 260                          | 7       | 8       | 0      | 0       |
| 27-09-2013           | 20                                 | 17-10-2013                | 675                          | 8       | 10      | 0      | 0       |
| 27-09-2013           | 35                                 | 01-11-2013                | 860                          | 9       | 5       | 0      | 0       |
| 27-09-2013           | 45                                 | 11-11-2013                | 987                          | 9       | 6       | 0      | 0       |
| 27-09-2013           | 46                                 | 12-11-2013                | 1 780                        | 7       | 10      | 0      | 0       |

†= Los rueznos se almacenaron de 5-8 °C antes de procesarlos. ‡= El procesamiento consistió en extraer las larvas y pupas del barrenador del ruezno. §= Larvas y pupas expresadas como porcentaje con relación al número de rueznos procesados.

Aislamiento y purificación de hongos que invadieron larvas y pupas. Después de incubar las larvas y pupas, bajo condiciones asépticas, con una aguja hipodérmica estéril se tomaron los hongos que las invadieron, luego los hongos se transfirieron a dos medios de cultivo: agar agua (AA) y papa dextrosa agar (PDA). Los dos medios de cultivo se les adicionaron 50 mg L<sup>-1</sup> del antibiótico amoxicilina después de esterilizarlos. El AA y el PDA se prepararon adicionando por litro de agua destilada 17 g de agar para ambos medios y solo para el PDA, 20 g de fructosa grado alimenticio (Gold Bell®) y el líquido procedente de 200 g de papa cocida en un litro de agua destilada.

Cuando los hongos pudieron crecer en colonias únicas y visiblemente no contaminados con bacterias, se transfirieron a tubos con medio inclinado (PDA + 2 g L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>) e incubaron hasta observar que colonizaron la superficie del medio a 28 °C. Los tubos con los hongos se almacenaron entre 5 a 10 °C, para su posterior resiembra en PDA e identificación a nivel de género (Domsch *et al.*, 1980) excepto *Metarhizium* que se identificó hasta especies (Tulloch, 1976).

When the fungi were able to grow in single colonies and visibly uncontaminated with bacteria, they were transferred to tubes with sloping medium (PDA + 2 g L<sup>-1</sup> of CaCO<sub>3</sub>) and incubated until they observed that they colonized the surface of the medium at 28 °C. The tubes with the fungi were stored at 5 to 10 °C, for subsequent resurfacing in PDA and identification at the genus level (Domsch *et al.*, 1980) except for *Metarhizium* that was identified to species (Tulloch, 1976).

Pathogenicity test of *Metarhizium anisopliae*. The GBR larvae used in this test were obtained directly from the rind of nuts attached to the shoots. Directly from the ground larvae were obtained, covered by spores *M. anisopliae*, these larvae were taken with dissecting forceps and placed in direct contact with freshly obtained larvae. They were then incubated in a humid chamber for ten days at 28 °C or in a petri dish that had the dry sterile secant paper (dry chamber). In both wet and dry chambers five larvae were placed and five boxes (replicates) were made. As a control treatment, uninoculated larvae were placed in both types of chambers. The entire test was repeated seven times, which

Prueba de patogenicidad de *Metarhizium anisopliae*. Las larvas del GBR utilizadas en esta prueba, se obtuvieron directamente de rueznos de nueces adheridas a los brotes. Directamente del suelo se obtuvieron larvas recubiertas por esporas *M. anisopliae*, estas larvas se tomaron con pinzas de disección y se pusieron en contacto directo con larvas recién obtenidas. Luego se incubaron en cámara húmeda por diez días a 28 °C o en caja petri que tenía el papel secante estéril seco (cámara seca). En ambas, cámaras húmeda y seca se colocaron cinco larvas y se hicieron cinco cajas (repeticiones). Como tratamiento testigo, se colocaron larvas sin inocular en ambos tipos de cámaras. Toda la prueba se repitió siete veces, que se tomaron como tratamientos. Al tercer día de incubación se contabilizaron larvas vivas, muertas y esporulación del hongo sobre las larvas, esto último se repitió al décimo día.

Una segunda manera de inocular cada larva del GBR fue utilizando esporas de *M. anisopliae* con 100 uL de una solución de  $10^8 \text{ mL}^{-1}$ , en este caso se usaron las mismas larvas por caja, cajas y repeticiones de la prueba anterior. La solución de esporas se obtuvo al raspar la superficie del medio de cultivo Sabouraud donde el hongo creció 30 d a 28 °C, las esporas se colocaron en agua destilada estéril con 0.01% de Tween 80, y con una cámara Neubauer se ajustó una concentración de  $10^8 \text{ mL}^{-1}$ . Para inocular de manera individual al ácaro rojo gigante *Trombidium* sp., el pulgón negro del nogal *Melanocallis caryaefoliae* Davis, la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, y la hormiga roja *Solenopsis* sp., se cortaron cilindros de 0.8 cm con esporas de la colonia de *M. anisopliae* que creció 30 d a 28 °C en medio Sabouraud y se pusieron en contacto con cada espécimen. Se utilizó una cámara húmeda con cinco insectos por caja y cinco cajas (repeticiones), la prueba se repitió tres veces.

Análisis de datos. Los análisis se realizaron utilizando el programa SAS (2010). Los datos larvas de GBR muertas o colonizadas por *M. anisopliae* se compararon utilizando la prueba de chi cuadrada ( $\chi^2$ ). Los análisis se realizaron por separado para i) el tercer o décimo día; y ii) la inoculación por contacto o por esporas.

## Resultados y discusión

Rueznos y GBR. Las larvas del GBR se recuperaron en mayor porcentaje (13-30%) a partir de las nueces con síntomas (barrenadas), en comparación a los rueznos

were taken as treatments. On the third day of incubation live larvae, dead and sporulation of the fungus were recorded on the larvae, the latter repeated on the tenth day.

A second way of inoculating each GBR larva was using *M. anisopliae* spores with 100 uL of a solution of  $10^8 \text{ mL}^{-1}$ , in which case the same larvae were used per box, boxes and replicates of the previous test. The spore solution was obtained by scraping the surface of the Sabouraud culture medium where the fungus grew 30 d at 28 °C, the spores were placed in sterile distilled water with 0.01% Tween 80, and with the aid of a Neubauer camera a concentration of  $10^8 \text{ mL}^{-1}$ . In order to individually inoculate the giant red mite *Trombidium* sp., The black aphid *Melanocallis caryaefoliae* Davis, the tick *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, and the red ant *Solenopsis* sp., cylinders of 0.8 cm were cut with spores of the colony of *M. anisopliae* that grew 30 to 28 °C in Sabouraud medium and were put in direct contact with each specimen. For this, a humid chamber was used with five insects per box and five boxes (replicates), the test was repeated three times.

Analysis of data. The analyze were performed using the SAS (2010) program. Data from GBR larvae killed or colonized by *M. anisopliae* were compared using the chi-square test ( $\chi^2$ ). The analyze were performed separately for i) the third or tenth day; and (ii) contact or spore inoculation.

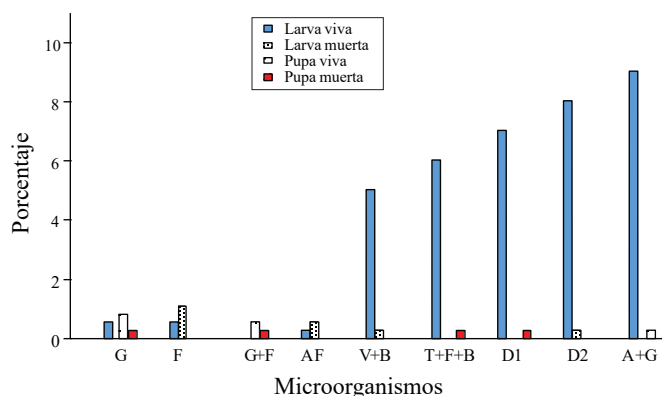
## Results and discussion

Rueznos and GBR. The GBR larvae recovered in a greater percentage (13-30%) from walnuts with symptoms (barren), compared to the rinds collected from the clean mechanics of the nut (7-9%), also, only were able to recover pupae of barren walnuts Table 1.

Colonization of larvae and pupae. The first attempt to isolate entomopathogenic fungi was made by inoculating living and dead larvae and pupae in the soil, in which case mixtures of fungi or fungi-bacteria appeared. On the bodies of the live larvae appeared the highest percentages of fungi and bacteria (5-9%), predominantly mixtures of *Fusarium* spp. with other fungi and bacteria, as well as the genus *Gliocladium* and the family Dermateaceae that did not sporulate or identify, Figure 1. In contrast, larvae placed in a humid chamber predominated the appearance of the *Fusarium* + *Gliocladium* 88% mixture, Figure 2. Larvae of

recolectados de la limpia mecánica de la nuez (7-9%), asimismo, solo se pudieron recobrar pupas de nueces barrenadas Cuadro 1.

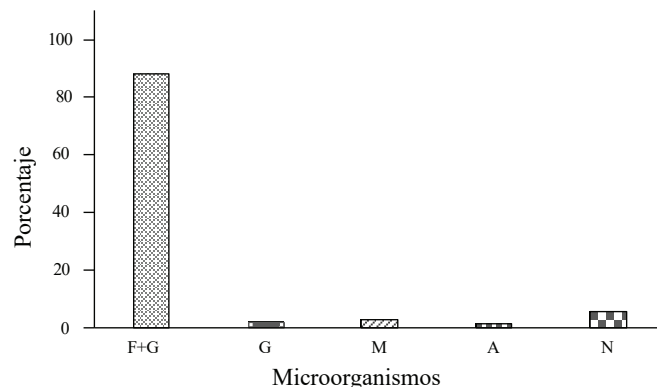
Colonización de larvas y pupas. El primer intento por aislar hongos entomopatógenos se realizó inoculando en suelo larvas y pupas vivas y muertas, en este caso aparecieron mezclas de hongos u hongos-bacterias. Sobre los cuerpos de las larvas vivas aparecieron los mayores porcentajes de hongos y bacterias (5-9%), ahí predominaron mezclas de *Fusarium* spp. con otros hongos y bacterias, así como los géneros *Gliocladium* y de la familia Dermateaceae que no esporularon ni se identificaron, Figura 1. En contraste, las larvas colocadas en cámara húmeda predominaron la aparición de la mezcla de *Fusarium* + *Gliocladium* 88%, Figura 2. Larvas del GBR se inocularon en suelo húmedo, donde aparecieron los géneros de hongos *Fusarium*, *Metarhizium*, *Gliocladium* y *Aspergillus* en un 40, 5, 4 y 4%, respectivamente Figura 3.



**Figura 1. Microorganismos encontrados de larvas vivas (57%) y muertas (17%), pupas vivas (20%) y muertas (9%) de *Cydia Caryana*, después de colocarse en suelo e incubarse siete días a 28 °C. Las fechas de obtención de larvas y pupas fueron 30-08-2013 y 06-09-2013. A= *Aspergillus* spp. G= *Gliocladium* sp. D= Dermateaceae; T= *Trichoderma* sp.; F= *Fusarium* spp. B= Bacterias; V= *Verticillium* sp. AF= *Aspergillus flavus*.**

**Figure 1. Microorganisms found of live larvae (57%) and dead (17%), live (20%) and dead (9%) pupae of *Cydia Caryana*, after being placed in soil and incubated for seven days at 28 °C. The dates of obtaining larvae and pupae were 30-08-2013 and 06-09-2013. A= *Aspergillus* spp. G= *Gliocladium* sp. D= Dermateaceae; T= *Trichoderma* sp.; F= *Fusarium* spp. B= Bacterias; V= *Verticillium* sp. AF= *Aspergillus flavus*.**

the (GBR) were inoculated on moist soil, where *Fusarium*, *Metarhizium*, *Gliocladium* and *Aspergillus* were present in 40, 5, 4 and 4%, respectively Figure 3.



**Figura 2. Microorganismos encontrados (%) en 125 larvas vivas del barrenador del ruezno *Cydia Caryana*, después de colocarse en cámara húmeda e incubarse diez días a 28 °C. La fecha de obtención de larvas fue 12-11-2013. A= actinomicetos; G= *Gliocladium* sp. F= *Fusarium* spp. M= Mucoraceos; N= nada.**

**Figure 2. Microorganisms found (%) in 125 live larvae of the genus *Cydia Caryana*, after placing in a humid chamber and incubating for ten days at 28 °C. The date of obtaining of larva was 12-11-2013. A= actinomycetes; G= *Gliocladium* sp. F= *Fusarium* spp. M= Mucoraceos; N= nothing.**

Pathogenicity test of *M. anisopliae*. GBR larvae survived 100 and 92% after 3 and 10 d of incubation, respectively; in contrast, died from 65 to 100% when inoculated by contact or spores of *M. anisopliae* and incubated in a humid chamber; in contrast, larvae inoculated with both methods and incubated 3 d survived 100% and incubated 10 d survived 87 and 73% when inoculated by contact or spores, respectively (Table 2).

The treatments (control), wet or dry chamber were significant for the inoculation form, so for inoculated larvae in contact or spores at 3 d at ( $\chi^2 = 230$ , gl=14,  $p \leq 0.001$ ) y ( $\chi^2 = 149$ , gl= 14,  $p < 0.001$ ), respectively; Similarly, inoculation treatments for inoculated larvae on contact or spores at 10 d with  $\chi^2 = 290$ , gl= 14,  $p \leq 0.001$  y  $\chi^2 = 198$ , gl= 14,  $p < 0.001$ , respectively, were significant. *M. anisopliae* sporulated on GBR larvae of 63 and 100% after inoculation with the fungus and incubated in humid chamber 3 and 10 d, respectively; but the fungus did not spore on the dry chamber larvae Table 3.

Prueba de patogenicidad de *M. anisopliae*. Las larvas del GBR sobrevivieron 100 y 92% después de 3 y 10 d de incubación, respectivamente; en contraste, murieron de 65 a 100% al inocularse por contacto o esporas de *M. anisopliae* e incubarse en cámara húmeda; en cambio, larvas inoculadas con ambos métodos e incubadas 3 d sobrevivieron 100% y las incubadas 10 d lograron sobrevivir de 87 y 73% al inocularse por contacto o esporas, respectivamente (Cuadro 2).

Los tratamientos (testigo), cámara húmeda o seca fueron significativos para la forma de inoculación, así para larvas inoculadas en contacto o esporas a 3 d la ( $\chi^2=230$ , gl=14,  $p\leq 0.001$ ) y ( $\chi^2=149$ , gl= 14,  $p< 0.001$ ), respectivamente; asimismo, fueron significativos los tratamientos de inoculación para larvas inoculadas en contacto o esporas al 10 d con  $\chi^2=290$ , gl= 14,  $p\leq 0.001$  y  $\chi^2=198$ , gl= 14,  $p< 0.001$ , respectivamente. *M. anisopliae* esporuló sobre las larvas del GBR de 63 y 100% después de inocularse con el hongo e incubarse en cámara húmeda 3 y 10 d, respectivamente; pero el hongo no esporuló sobre las larvas en cámara seca (Cuadro 3).

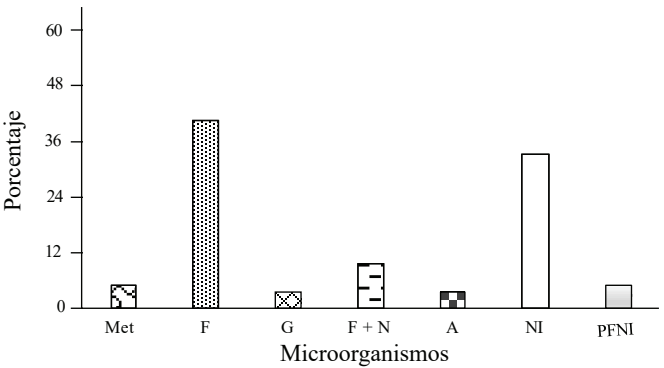
A las 24 h después de inocular la larva del GBR con *M. anisopliae* el hongo genera micelio sobre el insecto, a las 36 h forma un micelio algodonoso y al tercer día se forma un micelio aéreo en forma de domo con las primeras esporas, finalmente, entre después del cuarto día el micelio en forma de domo genera las esporas Figura 4.

**Cuadro 2.** Supervivencia de larvas del gusano barrenador del ruzno *Cydia Caryana* después de tres días de haberse inoculado o no con *Metarhizium anisopliae*.

**Table 2.** Survival of larvae of the worm borer of the rinds *Cydia Caryana* after three days of having been inoculated or not with *Metarhizium anisopliae*.

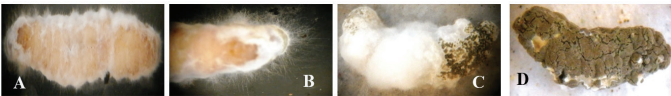
| Parámetros                                | Larvas a los 3 días |       |         |       | Larvas a los 10 días |        |         |       |
|-------------------------------------------|---------------------|-------|---------|-------|----------------------|--------|---------|-------|
|                                           | Vivas               |       | Muertas |       | Vivas                |        | Muertas |       |
|                                           | Media               | Rango | Media   | Rango | Media                | Rango  | Media   | Rango |
| Testigo <sup>ε</sup>                      | 100                 | 0     | 0       | 0     | 92                   | 80-100 | 8       | 0-20  |
| Inoculación de contacto <sup>§</sup>      |                     |       |         |       |                      |        |         |       |
| Inoculación en cámara seca <sup>¶</sup>   | 100                 | 0     | 0       | 0     | 87                   | 76-92  | 22      | 8-24  |
| Inoculación en cámara húmeda <sup>†</sup> | 29                  | 13-53 | 71      | 47-80 | 0                    | 0      | 100     | 0     |
| Inoculación con esporas <sup>‡</sup>      |                     |       |         |       |                      |        |         |       |
| Inoculación en cámara seca                | 100                 | 0     | 0       | 0     | 73                   | 30-87  | 27      | 13-40 |
| Inoculación en cámara húmeda              | 35                  | 28-62 | 65      | 41-77 | 0                    | 0      | 100     | 0     |

<sup>ε</sup>= larvas sin inocular, promedio de tres repeticiones, con cinco larvas por repetición; <sup>§</sup>= las larvas se inocularon al ponerlas en contacto directo con larvas micosadas; <sup>¶</sup>= las larvas se colocaron en cajas petri con papel secante estéril seco; valores promedio de siete tratamientos, cada uno con tres repeticiones y cada repetición con cinco larvas. <sup>†</sup>= las larvas se colocaron en cajas petri con papel secante estéril húmedo (saturado), valores promedio siete tratamientos, cada uno con tres repeticiones y cada repetición con cinco larvas; <sup>‡</sup>= se inocularon las larvas con 100 uL de una solución de esporas de 10<sup>8</sup> mL<sup>-1</sup>.



**Figura 3.** Microorganismos encontrados (%) en 292 larvas del barrenador del ruzno *Cydia Caryana*, después de colocarse en suelo húmedo e incubarse siete días a 28 °C. Las fechas de obtención de larvas fueron 12-09- 2013, 10-10-2013, 17-10-2013, 01-11-2013 y 11-11-2013. Met= *Metarhizium anisopliae*; A= actinomicetos; G= *Gliocladium* sp. F= *Fusarium* spp. N= nemátodos. NI= no invadidas; PFNI= pupas formadas no invadidas.

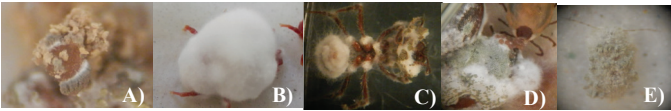
**Figure 3.** Microorganisms found (%) in 292 larvae of the borer of *Cydia Caryana*, after being placed in moist soil and incubated for seven days at 28 °C. The dates of obtaining larvae were 12-09-2013, 10-10-2013, 17-10-2013, 01-11-2013 and 11-11-2013. Met= *Metarhizium anisopliae*; A= actinomycetes; G= *Gliocladium* sp. F= *Fusarium* spp. N= nematodes NI= not invaded; PFNI= formed pupae not invaded.



**Figura 4. Proceso de micosado de *M. anisopliae* sobre la larva del GBR.** A= invasión a las 24 h; B= invasión a las 36 h; C= producción de esporas a los tres días en la superficie del micelio algodónoso; y D= abundante esporulación después del cuarto día.

**Figure 4. Mitosis of *M. anisopliae* on GBR larvae.** A= invasion at 24 h; B= invasion at 36 h; C= production of spores at three days on the surface of cotton wool mycelium; and D= abundant sporulation after the fourth day.

El al ácaro rojo gigante, el pulgón negro del nogal, la garrapata hembra como sus huevos y la hormiga roja permitieron la esporulación de *M. anisopliae*, en todos los casos el hongo esporuló en 100%. El micelio en forma de domo se formó también en el ácaro gigante y una capa de micelio poco profusa sobre los huevos de la garrapata y hormiga (Figura 5).



**Figura 5. Insectos que atacó *M. anisopliae*.** A y D= garrapata huevo y adulto, respectivamente; B= ácaro gigante; C= hormiga roja y E= pulgón negro del nogal.

**Figure 5. Insects that attacked *M. anisopliae*.** A and D= tick egg and adult, respectively; B= giant mite; C= red ant; and E= black aphid of walnut.

Los nematodos, *Fusarium* spp. y *Gliocladium* sp. por si solos o asociados pudiesen ser entomopatógenos del GBR, aunque no fue posible asilar los nematodos, tampoco se corroboró que los hongos fuesen entomopatógenos; sin embargo, se muestra en la Figura 6 como fueron invadidas las larvas por los microorganismos aludidos.

Discusión

Como máximo se recuperó 30% de larvas de rueznos obtenidos de la nuez, ese bajo porcentaje pudiese deberse al efecto del insecticida aplicado contra el GBR y la emergencia de algunos adultos que abandonan el ruezno barrenado; el porcentaje de larvas de 9% de los rueznos separado de

**Cuadro 3. Esporulación de *Metarhizium* sp. sobre larvas del gusano barrenador del ruezno, las larvas fueron inoculadas por contacto directo con el hongo e incubadas a 28 °C hasta 10 días.**

**Table 3. Sporulation of *Metarhizium* sp. on larvae of the ruezno borer, the larvae were inoculated by direct contact with the fungus and incubated at 28 °C for up to 10 days.**

| Esporulación de <i>Metarhizium</i> sp. | Después de 3 días de incubación |       | Después de 10 días de incubación |       |
|----------------------------------------|---------------------------------|-------|----------------------------------|-------|
|                                        | Media                           | Rango | Media                            | Rango |
| Cámara húmeda                          | 63                              | 50-73 | 100                              | 0     |
| Cámara seca                            | 0                               | 0     | 0                                | 0     |

†= las larvas inoculadas se colocaron en cajas petri con papel secante estéril húmedo (cámara húmeda) o papel secante seco (cámara seca); valores promedio siete tratamientos, cada uno con tres repeticiones y cada repetición con cinco larvas.

At 24 h after inoculation of the GBR larva with *M. anisopliae* the fungus generates mycelium on the insect, at 36 h it forms a cottony mycelium and on the third day an aerial mycelium is formed in the form of a dome with the first spores, finally, after the fourth day the mycelium in dome form generates the spores Figure 4.

The giant red mite, the black aphid of the walnut, the female tick as its eggs and the red ant allowed the sporulation of *M. anisopliae*, in all cases the fungus sporulated in 100%. The dome-shaped mycelium was also formed in the giant mite and a layer of mycelium not very profuse on the eggs of the tick and ant (Figure 5).

The nematodes, *Fusarium* spp. and *Gliocladium* sp. by themselves or associates could be entomopathogens of the GBR, although it was not possible to asyllum nematodes, nor was it confirmed that the fungi were entomopathogenic; however, it is shown in Figure 6 how the larvae were invaded by the mentioned microorganisms.



**Figura 6. Larvas de GBR invadidas por *Gliocladium* sp., *Fusarium* sp. y nematodos, izquierda, centro y derecha, respectivamente.**

**Figure 6. The GBR larvae invaded by *Gliocladium* sp., *Fusarium* sp. and nematodes, left, center and right, respectively.**

la nuez por medio de maquinaria, podría explicarse a los efectos mecánicos y de descomposición de los ruegos. Para fines prácticos, se facilitó la obtención de ruegos de ésta segunda manera. El tiempo (13-46) y temperatura (5-8 °C) de almacenamiento muy probablemente impidieron la formación y obtención de pupas (Cuadro 1).

Cuando las larvas se obtuvieron de ruegos desprendidos de la nuez o ruegos separado por maquinaria no fueron colonizadas por microorganismos en 60 y 37%, respectivamente (Figura 1 y 3), lo que podría deberse a que las larvas adquieren algunos microorganismos durante su almacenamiento o adquieren susceptibilidad para ser invadidas por los hongos del suelo. El menor porcentaje (6%) de larvas no colonizadas se obtuvo en cámara húmeda (Figura 2) en donde presencia de *Fusarium* spp. predominó (88%); es decir, el hongo parece asociarse a la larva del durante su almacenamiento; no obstante, no fue posible asilar a *Metarhizium anisopliae*, lo que únicamente se logró hacerlo del suelo de larvas obtenidas de ruegos separado por maquinaria.

Algunas larvas fueron parasitadas y muertas por nematodos y asociación de estos con *Fusarium* spp.; sin embargo, no pudimos aislar los nematodos, aunque sí los *Fusarium*. En el año 2014, en la huerta Hormiguero, larvas del GBR fueron muy escasas, razón por la que no fue posible probar los asilados de *Fusarium* y otros hongos como entomopatógenos del GBR. Sin embargo, en el cepario del Laboratorio de Fitopatología se resguardan los aislados de *M. anisopliae* y los hongos mencionados.

Las larvas solo fueron micosadas en cámara húmeda (Cuadro 3) aunque algunas larvas inoculadas con el hongo murieron después de 10 días de incubación (Cuadro 2), *M. anisopliae* es capaz de matar insectos a través de toxinas y enzimas, pero no siempre esporula sobre el insecto muerto (Téllez *et al.*, 2009), consideramos improbable que el hongo mate a las larvas del GBR en condiciones secas (cámara seca). La humedad relativa (HR) es determinante para la esporulación de *M. anisopliae* sobre los insectos que ataca, trabajos previos indican que el hongo esporula cuando la HR oscila entre un 50-100% (Magalhães *et al.*, 2000), la temperatura también es un factor importante para la virulencia y adaptación de éste hongo, particularmente, cepas obtenidas tolerantes al calor (crecimiento > 25 °C) son virulentas y se adaptan regiones cálidas (García *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2005; Toriello *et al.*, 2008). El aislado de *M. anisopliae* obtenido tuvo su máximo crecimiento a 28

## Discussion

A maximum of 30% of larvae of rinds obtained from the walnut was recovered, that low percentage could be due to the effect of the insecticide applied against the GBR and the emergence of some adults who leave the rinds no drill; the percentage of larvae of 9% of the rinds separated from the nut by means of machinery, could be explained to the mechanical effects and of decomposition of the rinds. For practical purposes, it was facilitated to obtain judgments from this second way. Time (13-46) and storage temperature (5-8 °C) most likely prevented the formation and production of pupae (Table 1).

When the larvae were obtained from rinds detached from the walnut or rinds separated by machinery they were not colonized by microorganisms in 60 and 37%, respectively (Figure 1 and 3), which could be due to the larvae acquiring some microorganisms during their storage or acquire susceptibility to be invaded by soil fungi. The lowest percentage (6%) of non-colonized larvae was obtained in a humid chamber (Figure 2) where *Fusarium* spp. predominated (88%); that is, the fungus seems to be associated with the larvae during storage; however, it was not possible to isolate *Metarhizium anisopliae*, which was only possible to do so from the soil of larvae obtained from rinds separated by machinery.

Some larvae were parasitized and killed by nematodes and associated with *Fusarium* spp., However, we could not isolate nematodes, although *Fusarium*. In 2014, in the Hormiguero garden, GBR larvae were very scarce, which is why it was not possible to test *Fusarium* isolates and other fungi as GBR entomopathogens. However, the isolates of *M. anisopliae* and the fungi mentioned are safeguarded in the plant laboratory of Phytopathology.

The larvae were only harvested in a humid chamber (Table 3) although some fungi inoculated with the fungus died after 10 days of incubation (Table 2). *M. anisopliae* is capable of killing insects through toxins and enzymes, but it does not always sporulate on the dead insect (Téllez *et al.*, 2009), we consider it improbable that the fungus killed the GBR larvae in dry conditions (dry chamber). The relative humidity (HR) is determinant for the sporulation of *M. anisopliae* on the insects it attacks, previous work indicates that the fungus sporulates when the RH oscillates between 50-100% (Magalhães *et al.*, 2000), the temperature also is

°C aunado a la virulencia mostrada en una gama aplica de insectos, le confiere características de uso potencial para el control biológico de plagas en el suelo.

Con anterioridad, se han consignado que distintos aislados de *M. anisopliae* atacan y matan hasta en 95% garrapatas *Rhipicephalus microplus* Canestrini (Ruvalcaba *et al.*, 2011), el aislado evaluado en éste trabajo tuvo un comportamiento similar. Asimismo, la especie de hormiga *Atta cephalotes* L. y el pulgón negro del nogal *M. caryaefoliae* fueron micosados por *M. anisopliae* (Lemus *et al.*, 2008; Shapiro *et al.*, 2008), ambos trabajos indican la capacidad del hongo para atacar especies o géneros similares a los consignados en nuestro trabajo. Adicionalmente, se sabe que las especies de *Metarhizium* se han especializado en atacar o una gama muy restringida o muy amplia de insectos (Hu *et al.*, 2014), en nuestro trabajo, para *M. anisopliae*, todo indica que ataca una gama aplica de insectos.

De manera práctica, las especies de *Metarhizium*, usualmente se ha utilizado para el control de plagas al incorporar sus esporas en el suelo, tales son los casos, del control de plagas del maíz y caña de azúcar *Saccharum officinarum* L., entre otros (Lezama *et al.*, 2005; Matabanchoy *et al.*, 2012), el uso del aislado obtenido en éste trabajo se podría usar al añadir sus esporas en el suelo para infectar larvas del GBR dentro de los ruzos que se encuentren en el suelo.

Finalmente, se sabe que distintas especies de *Metarhizium* poseen a la vez tres maneras de sobrevivir, una como saprobios en suelo, otra asociada a raíces y una tercer como entomopatógenos (Fisher *et al.*, 2011; Barelli, 2013) lo que aumenta las perspectivas del uso de estos hongos para el control de plagas en el suelo, incluyendo *C. caryana*.

## Conclusiones

Las larvas del GBR se pueden utilizar como trampa para aislar *Metarhizium* y probablemente otros entomopatógenos del suelo.

El aislado de *M. anisopliae* obtenido en este trabajo, ataca y mata distintos insectos, por que se considera no especializado.

Otros hongos recobrados y nematodos (no recobrados) mostraron capacidad de micosar las larvas del GBR, aunque no se confirmó tal efecto.

an important factor for the virulence and adaptation of this fungus, particularly, strains obtained heat tolerant (growth > 25 °C) are virulent and warm regions are adapted (García *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2005; Toriello *et al.*, 2008). The *M. anisopliae* isolate obtained had maximum growth at 28 °C coupled with the virulence shown in an applied range of insects, it confers potential use characteristics for the biological control of pests in the soil.

Previously, different isolates of *M. anisopliae* have been reported to attack and kill up to 95% *Rhipicephalus microplus* Canestrini ticks (Ruvalcaba *et al.*, 2011), the isolate evaluated in this work had a similar behavior. In addition, the species of ant *Atta cephalotes* L. and the black aphid of *M. caryaefoliae* were micasados by *M. anisopliae* (Lemus *et al.*, 2008; Shapiro *et al.*, 2008), both works indicate the capacity of the fungus to attack species or genera similar to those recorded in our work. Additionally, it is known that *Metarhizium* species have specialized in attacking or a very restricted or very broad range of insects (Hu *et al.*, 2014), in our work, for *M. anisopliae*, all indicate that it attacks an applied range of insects.

Practically, *Metarhizium* species have usually been used for pest control by incorporating their spores into the soil, such as pest control of maize and sugarcane *Saccharum officinarum* L., among others (Lezama *et al.*, 2005; Matabanchoy *et al.*, 2012). The use of the isolate obtained in this work could be used by adding spores in the soil to infect RBM larvae within the rinds that are found in the soil.

Finally, it is known that different species of *Metarhizium* possess at the same time three ways of surviving, one as saprobes in soil, another associated with roots and a third as entomopathogens (Fisher *et al.*, 2011; Barelli, 2013), which increases the perspectives of the use of these fungi to control pests in the soil, including *C. caryana*.

## Conclusions

The GBR larvae can be used as a trap to isolate *Metarhizium* and probably other soil entomopathogens.

The isolate of *M. anisopliae* obtained in this work, attacks and kills different insects, reason why it is considered non-specialized.

## Literatura citada

- Barelli, L. 2013. Starvation induces expression of the plant-adhesin gene, Mad2, of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium robertsii*. Thesis Master of Science. Faculty of Graduate Studies, Brock University St. Catharines, Ontario, Canada. 108 p.
- Bautista, G. A.; Barrera, J. F.; Payró, de la C. E.; Salgado, G. S.; Gómez, R. J. and Gomez, L. J. F. 2012. Genetic characterization of *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin isolates from sugarcane fields and their pathogenicity against *Aeneolamia postica* (Walker) (Hemiptera: Cercopidae). Universidad y Ciencia. 28(3):217-229.
- Barajas, O. C. G.; Morales, R. M. D.; del Pozo, N. E. M.; Rodríguez, A. M. L. y Núñez, L. J. J. 2009. Condiciones para el desarrollo de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de Chapulín frijolero. Tecnociencia Chihuahua. 3(1):33-39.
- Domsch, K. H.; Gams, W. and Anderson, T. H. 1980. Compendium of soil fungi. Volume 1. Academic Press (London) Ltd. 860 p.
- Fisher, J. J.; Rehner, S. A. and Bruck, D. J. 2011. Diversity of rhizosphere associated entomopathogenic fungi of perennial herbs, shrubs and coniferous trees. J. Invertebrate Pathol. 106(2):289-295.
- García, G. C.; Cháirez, H. I. y Medrano, R. H. 2010. Efecto de la temperatura en la viabilidad de esporas y toxicidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae). Folia Entomol. Mex. 49(1):1-7.
- García, L. S. y Mier, T. 2010. Visión general de la producción y aplicación de bioplaguicidas en México. Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente. 10:37-63.
- Hernández, V. V. M.; Cervantes, E. Z.; Villalobos, F. J.; García, L. L. y Peña, C. G. 2011. Aislamiento de hongos entomopatógenos en suelo y sobre gallinas ciegas (Coleoptera: Melolonthidae) en agroecosistemas de maíz. Acta Zoo. Mex. 27(3):591-599.
- Hu, X.; Xiao, G.; Zheng, P.; Shang, Y.; Su, Y.; Zhang, X.; Liu X.; Zhan, S.; Leger, S. J. and Wang, C. 2014. Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen speciation and host adaptation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 111(47):16796-16801.
- Lezama, R.; Molina, J.; López, M.; Pescador, A.; Galindo, E.; Ángel, C. A. y Michel, A. C. 2005. Efecto del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* sobre el control del gusano cogollero del maíz en campo. Avances en Investigación Agropecuaria. 9(1):1-5.
- Lemus, Y.; Rodríguez, G.; Cuervo, R.; Vanegas, J. A. D. y Zuluaga, C. L. 2008. Determinación de la factibilidad del hongo *Metarhizium anisopliae* para ser usado como control biológico de la hormiga arriera (*Atta cephalotes*). Revista Guillermo de Ockham. 6(1):91-98.
- Magalhães, B. P.; Goettel, M. S. and Frazão, H. D. S. 2000. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Beauveria bassiana* on *Rhammatocerus schistocercoides* under humid and dry conditions. Braz. J. Microbiol. 31(3):161-163.
- Other recovered fungi and nematodes (unrecovered) showed the ability to macerate GBR larvae, although this effect was not confirmed.

End of the English version



- Matabanchoy, S. J. A.; Bustillo, P. A. E.; Castro, V. U.; Mesa, C. N. C. y Moreno, G. C. A. 2012. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* to control *Aeneolamia varia* (Hemiptera: Cercopidae), in a sugar cane. Rev. Colomb. Entomol. 38(2):177-181.
- Nava, C. U. y Ramírez, D. M. 2002. Manejo integrado de plagas del nogal. In: Arreola, Á. J. y Reyes, J. I. (Eds.). Tecnología de producción del nogal Pecanero. Campo Experimental La Laguna. INIFAP. Matamoros, Coahuila, México. 220 p.
- Rodríguez, S.; Peveling, R.; Nagel, P. and Keller, S. 2005. The natural distribution of the entomopathogenic soil fungus *Metarhizium anisopliae* in different regions and habitat types in Switzerland. Insect Pathogens Insect Parasit Nematodes Melolontha. 28(2):185-188.
- Ruvalcaba, M. F.; Padilla, A. M. B.; Vázquez, C. C. y Velázquez, V. M. H. 2011. Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la inhibición de oviposición, eclosión y potencial reproductivo en una cepa triple resistente de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). Entomotropica. 25(3):109-115.
- SAS, Institute. 2010. Statistical Analysis Systems for Windows. Cary N.C.
- Shapiro, I. D. I.; Cottrell, T. E.; Jackson, M. A. and Wood, B. W. 2008. Virulence of hypocreales fungi to pecan aphids (Hemiptera: Aphididae) in the laboratory. J. Invertebrate Pathol. 99(3):312-317.
- Sookar, P.; Bhagwant, S. and Awuor, O. E. 2008. Isolation of entomopathogenic fungi from the soil and their pathogenicity to two fruit fly species (Diptera: Tephritidae). J. Appl. Entomol. 132(9-10):778-788.
- Téllez, J. A.; Cruz, R. M. G.; Mercado, F. Y.; Asaff, T. A. y Arana, C. A. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. Rev. Mex. Micol. 30:73-80.
- Toriello, C.; Montoya, S. E.; Zavala, R. M.; Navarro, B. H.; Basilio, H. D.; Hernández, V. V. y Mier, T. 2008. Virulencia y termotolerancia de cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta (Hemiptera: Cercopidae). Rev. Mex. Micol. 28(SPE):57-66.
- Tulloch, M. 1976. The genus *Metarhizium*. Transactions of the British Mycological Society. 66(3):407-411.
- Williams, T.; Arredondo, B. H. C. and Rodríguez, del B. L. A. 2013. Biological pest control in Mexico. Ann. Rev. Entomol. 58:119-140.