






Efectividad de una cepa nativa de *Metarhizium pingshaense* sobre larvas de *Triodonyx lalanza* Saylor (Coleoptera: Melolonthidae), bajo condiciones semicontroladas.

Effectiveness of the native strain *Metarhizium pingshaense* on larvae of *Triodonyx lalanza* Saylor (Coleoptera: Melolonthidae), under semi-controlled conditions.

Cortez-Isiordia, K. A.¹ , Arvizu-Gómez, J. L.² , Isiordia-Aquino, N.^{3*} , Medina-Torres, R.³, Cambero-Campos, O. J.³ , and Lugo-García, G. A.⁴ 

¹ Universidad Autónoma de Nayarit. Doctorado en Ciencias Biológico Agropecuarias. Carretera Tepic - Puerto Vallarta, Km. 9, 63780. Xalisco, Nayarit, México. ² Secretaría de Investigación y Posgrado. Universidad Autónoma de Nayarit. Ciudad de la Cultura, 63000 Tepic, Nayarit, México. ³ Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit. Carretera Tepic - Puerto Vallarta, Km. 9, 63780 Xalisco, Nayarit, México. ⁴ Colegio de Ciencias Agropecuarias, Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte, Universidad Autónoma de Sinaloa, Calle 16 y Av. Japaraqui, 81110 Juan José Ríos, Ahome, Sinaloa, México.

Please cite this article as/Como citar este artículo: Cortez-Isiordia, K. A., Arvizu-Gómez, J. L., Isiordia-Aquino, N., Medina-Torres, R., Cambero-Campos, O. J., Lugo-García, G. A. (2022). Effectiveness of a native strain of *Metarhizium pingshaense* on larvae of *Triodonyx lalanza* Saylor (Coleoptera: Melolonthidae), under semi-controlled conditions. *Revista Bio Ciencias*, 9 e1297 <https://doi.org/10.15741/revbio.09.e1297>



ABSTRACT

The “white grubs” (Coleoptera: Melolonthidae) are the most important soil pests of various crops in Mexico, including sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Entomopathogenic fungi are offered as an important biological alternative for the management of this pest, which can reduce the application of chemical insecticides. It is important to increase studies on the biological efficacy of entomopathogenic fungal strains against white grubs, under semi-controlled conditions, which will allow in the future improvement on their correct application in the field, to obtain an efficient pest control. The objective of this study was to evaluate the biological efficacy of a native strain (MGCPH4) of *Metarhizium pingshaense* (Chen and Guo) in contrast to the commercial strain Fungizium® of *Metarhizium anisopliae*

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: December 07 th 2021.

Accepted/Aceptado: November 14 th 2022.

Available on line/Publicado: December 07 th 2022.

RESUMEN

Las “gallinas ciegas” (Coleoptera: Melolonthidae) son las plagas de suelo más importantes de varios cultivos en México, incluida la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Los hongos entomopatógenos se ofrecen como una importante alternativa biológica para el manejo de esta plaga, la cual pueda lograr reducir la aplicación de insecticidas químicos. Es importante incrementar los estudios sobre la efectividad biológica de las cepas de hongos entomopatógenos contra gallinas ciegas, bajo condiciones semicontroladas, los cuales permitirán mejorar su correcta aplicación en campo, para obtener un control eficiente de dicha plaga. El objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad biológica de una cepa nativa (MGCPH4) de *Metarhizium pingshaense* Chen y Guo, en contraste con una cepa comercial Fungizium®, de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) y con un insecticida químico granulado Allectus®-GR, contra larvas de *Triodonyx lalanza* Saylor en macetas con caña de azúcar, bajo condiciones semicontroladas. Las dos cepas de *Metarhizium* se aplicaron a una dosis de

*Corresponding Author:

Néstor Isiordia Aquino.³Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit. Carretera Tepic - Puerto Vallarta, Km. 9, 63780 Xalisco, Nayarit, México. Phone: (311) 141 8235. E-mail: nisiordia@uan.edu.mx

(Metschnikoff), and with a granulated chemical insecticide (Allectus®-GR) against *Triodonyx lalanza* Saylor larvae in pots with sugarcane, under semi-controlled conditions. The two strains of *Metarhizium* were applied at a dose of 1×10^5 conidia·cm², while the chemical insecticide was applied at a dose of 30 kg·ha⁻¹. After the application of the treatments, the percentage of dead larvae was evaluated for 60 days. The chemical insecticide Allectus®-GR caused the highest larval mortality (33 %), with statistically significant differences compared to the rest of the treatments, followed by the native strain MGCPH4 of *M. pingshaense*, which presented 22 % larval mortality.

KEY WORDS

Biological control, white grub, entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae*, virulence.

Introduction

Belonging to the Poaceae family, sugarcane *Saccharum officinarum* L. is one of the main crops in Mexico, which generates an important source of jobs and dividends. Of the 849 873 ha established, 53 841 556 t are produced, with a national annual average yield level at 69.48 t·ha⁻¹. Of the 16 cane-producing states, Nayarit ranks 8th nationally in terms of planted area and production (SIAP, 2020). In Mexico, the “white grubs” of the genus *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae) are important soil pests of a wide variety of crops, such as corn (Hernández-Velázquez *et al.*, 2010) and sugarcane (Cortez-Isiordia *et al.*, 2017). This insect, by feeding on the cane roots, interrupts the normal absorption of water and nutrients of the plant, directly affecting its quality and yield, in addition to reducing the anchorage of the sugarcane strain, causing detachment progressively and a decrease in its longevity period (Calvo *et al.*, 2016). The white grubs complex encompasses a great diversity of pest species with rhizophagous habits, which are mainly concentrated in the genera *Phyllophaga*, *Cyclocephala* and *Paranomala* (Morón *et al.*, 1997). This complex is frequently found on land expanded by monoculture, where aggressive tillage methods and stubble burning during harvest limits the availability of organic matter as a food source, forcing the insect to consume crop roots (Castro-Ramírez *et al.*, 2004). An example of this phenomenon is represented by *Triodonyx lalanza* Saylor

1×10^5 conidios·cm², mientras que el insecticida químico se aplicó a una dosis de 30 kg·ha⁻¹. Después de la aplicación de los tratamientos, se evaluó el porcentaje de larvas muertas, por 60 días. El insecticida químico Allectus®-GR causó la mayor mortalidad de larvas (33 %), con diferencias estadísticamente significativas ante el resto de los tratamientos, seguido la cepa nativa MGCPH4 de *M. pingshaense* el cual presentó 22 % de mortalidad de larvas.

PALABRAS CLAVE

Control biológico, gallina ciega, hongos entomopatógenos, *Metarhizium anisopliae*, virulencia.

Introducción

Perteneciente a la familia Poaceae, la caña de azúcar *Saccharum officinarum* L. es uno de los principales cultivos en México, el cual genera una importante fuente de empleos y divisas. De las 849 873 ha establecidas, se producen 53 841 556 t, con un rendimiento promedio anual a nivel nacional de 69.48 t·ha⁻¹. De los 16 estados productores de caña, Nayarit ocupa el 8° lugar a nivel nacional en cuanto a superficie sembrada y producción (SIAP, 2020). En México, las “gallinas ciegas” del género *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae), son importantes plagas de suelo de una gran variedad de cultivos como el maíz (Hernández-Velázquez *et al.*, 2010), y caña de azúcar (Cortez-Isiordia *et al.*, 2017). Este insecto, al alimentarse de las raíces de caña interrumpe la absorción normal de agua y nutrientes por parte de la planta, lo que afecta directamente en su calidad y rendimiento, además de reducir el anclaje de la cepa de caña de azúcar originando poco a poco su desprendimiento y disminución en su periodo de longevidad (Calvo *et al.*, 2016). El complejo gallina ciega que engloba a una gran diversidad de especies plaga con hábitos rizófagos, se concentran principalmente en los géneros *Phyllophaga*, *Cyclocephala* y *Paranomala* (Morón *et al.*, 1997). Este complejo se encuentra con frecuencia en terrenos expandidos por monocultivo, que con agresivos métodos de labranza y la quema de rastrojos durante la cosecha, limitan la disponibilidad de materia orgánica como fuente de alimento, obligando a la gallina ciega a consumir las raíces de los cultivos (Castro-Ramírez *et al.*, 2004). Un ejemplo de este fenómeno lo representa *T. lalanza*, especie distribuida en el noroccidente y noroeste de México, en los estados de Jalisco, Nayarit, Sinaloa,

a specie distributed in the northwestern and northeast areas of Mexico, in the states of Jalisco, Nayarit, Sinaloa, Sonora and part of Durango (Warner & Morón, 1992). It is worth mentioning that this taxon has not been related to significant damage to agricultural crops; however, in Nayarit for the harvests of 1993 and 1994, severe infestations of this species were recorded in more than 1 000 ha of sugarcane in the supply area of Ingenio Puga S.A. de C.V. in the municipality of Tepic, where it caused between 70 and 80 % of damage to the crops. These damages generated losses that were close to 14 900 t, even when large amounts of granular insecticides such as Terbufos, Chlorpyrifos and Diazinon were applied for control (Morón *et al.*, 2010). In a more recent study by Cortez-Isiordia *et al.* (2017), it was reported that *T. lalanza* is still the predominant species in the sugarcane zone of central Nayarit. The foregoing shows the importance that these white grubs represent, as it becomes a potentially important pest for the other states where it is distributed. The use of chemical active ingredients as a main tool to combat white grubs in Mexico has been ineffective, and they also harm the beneficial fauna of the soil, leading to an ecological imbalance between the natural enemies of the soil, and an ecological imbalance between the natural enemies of this pest, without discarding the pollution it generates to the environment (Rodríguez-del Bosque & Morón, 2010). Therefore, it is necessary to resort to other management alternatives with less environmental impact; our internal ecologically safe strategy, has a great potential for the control of white grubs with entomopathogenic fungi (Deuteromycota: Ophiocordycipitaceae). This is based on the report of the isolation of numerous strains that naturally infect this insect (Hernández-Velázquez *et al.*, 2010), and the obtaining of significant mortality rates of white grubs (50 to 96 %), in the evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. strains, under laboratory conditions (Rodríguez-del Bosque *et al.*, 2005; Guzmán-Franco *et al.*, 2012; Carrillo-Benítez *et al.*, 2013; Solís-Pérez *et al.*, 2016). Secondly, few evaluations have been done on the effectiveness of these microbial agents against white grubs, under semi-controlled and field conditions; although it is true that some strains have shown promising levels of mortality in laboratory tests, under these conditions, there is absolute control of factors such as temperature, relative humidity, radiation, etc. that can disguise the real effect of a strain when comparing their efficacy in the field. Even more so, due to the complications represented by the control of underground pests, and in the particular case of white

Sonora y parte de Durango (Warner & Morón, 1992). Cabe mencionar que, a este taxón no se le había relacionado con daños importantes en cultivos agrícolas; sin embargo, en Nayarit para la zafra 1993 y 1994, se registraron severas infestaciones de esta especie, en más de 1 000 ha de caña de azúcar de la zona de abastecimiento del Ingenio Puga S.A. de C.V. en el municipio de Tepic, donde ocasionó entre un 70 y 80 % de afectaciones al cultivo. Estos daños generaron pérdidas que se aproximaron a las 14 900 t, aun cuando se aplicaron grandes cantidades de insecticidas granulados como Terbufos, Clorpirifos y Diazinón para su control (Morón *et al.*, 2010), incluso en un estudio más reciente realizado por Cortez-Isiordia *et al.* (2017) reportaron que *T. lalanza* aún es la especie predominante en la zona cañera del centro de Nayarit. Lo anterior muestra la importancia que representa esta gallina ciega, al convertirse en una plaga potencialmente importante para los demás estados donde se distribuye. El uso de activos químicos como principal herramienta de combate contra la gallina ciega en México, ha sido poco efectivo, además perjudican a la fauna benéfica del suelo, lo que conlleva a un desequilibrio ecológico entre los enemigos naturales de dicha plaga, sin descartar además la contaminación que genera al medio ambiente (Rodríguez-del Bosque & Morón, 2010). Por lo tanto, es necesario recurrir a otras alternativas de manejo con menor impacto ambiental; una estrategia alterna ecológicamente segura, con gran potencial para el control de la gallina ciega son los hongos entomopatógenos (Deuteromycota: Ophiocordycipitaceae). Esto con base al reporte del aislamiento de numerosas cepas que infectan de forma natural a este insecto (Hernández-Velázquez *et al.*, 2010), y a la obtención de importantes índices de mortalidad de gallinas ciegas (50 hasta 96 %), en la evaluación de cepas de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin y *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., bajo condiciones de laboratorio (Rodríguez-del Bosque *et al.*, 2005; Guzmán-Franco *et al.*, 2012; Carrillo-Benítez *et al.*, 2013; Solís-Pérez *et al.*, 2016). Por otro lado, se han realizado pocas evaluaciones sobre la efectividad de estos agentes microbianos sobre gallinas ciegas, bajo condiciones semicontroladas y de campo; si bien es cierto que, algunas cepas han mostrado niveles promisorios de mortalidad en pruebas de laboratorio, bajo estas condiciones existe un control absoluto de factores como temperatura, humedad relativa, radiación, entre otros, que pueden llegar a disfrazar el efecto real de una cepa cuando se compara su eficacia en campo. Más aun, por las complicaciones que representa el control de plagas subterráneas, ya que, en el caso particular de la gallina ciega, muestra una gran movilidad en el suelo cuando

grubs, where these show great mobility in the soil when it perceives the effect of active insecticides (Morón *et al.*, 2010). Therefore, it is necessary to increase studies on the real effectiveness of entomopathogenic fungi under less controlled conditions, which are similar to environmental conditions under which microorganisms will carry out their insecticidal activity after application, such as formulations as a part of an integrated pest management program. This will improve the correct effective field application formulations and the obtainment of efficient pest control. The objective of this study was to evaluate the biological efficacy of a native strain (MGCPH4) of *M. pingshaense* in contrast to the commercial strain Fungizium® of *M. anisopliae*, and with a granulated chemical insecticide (Allectus®-GR) against *T. lalanza* Saylor larvae in pots with sugarcane, under semi-controlled conditions.

Material and Methods

Establishing the experimental plot

The study was realized in pots with sugarcane established outdoors. Stems of approximately 15 cm and containing healthy buds of the variety (MEX-80-1410) were planted. These were previously subjected to a disinfection process in a suspension of sodium hypochlorite (NaClO) at 1 % for 10 min and sterile distilled water. The stems were planted individually in black polyethylene bags, 24 cm long by 26 cm in diameter, containing 10 kg of sandy loam soil previously sterilized in an autoclave at 121°C and 1.2 bar of pressure, for 2 hours and 10 days in advance. The bags were perforated to favor the drainage and the humidity of the pots, and they were maintained with the addition of water every third day, holding a pH of 7.0 and a hardness of 100 ppm of total dissolved solids (TDS) of calcium carbonates (CaCO₃). For the measurement of pH, a Ketotek® potentiometer was used and for the measurement of TDS, a Runjie® conductivity meter was used.

Obtaining *Triodonyx lalanza* larvae

Third-instar larvae of *T. lalanza* were obtained from an infested sugarcane plot. The collection of larvae was carried out from the samples of 0.25 m² in the root zone of the cane; the specimens obtained

percibe el efecto de los activos de insecticidas (Morón *et al.*, 2010). Por lo anterior, resulta necesario incrementar los estudios sobre la efectividad real de los hongos entomopatógenos bajo condiciones menos controladas, que se asemejen a las condiciones ambientales bajo las cuales los microorganismos llevarán a cabo su actividad insecticida tras su aplicación, como formulaciones como parte de un programa de manejo integrado de plagas. Esto permitirá mejorar la correcta aplicación en campo de formulaciones efectivas y obtener un control eficiente de plagas. El objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad biológica de una cepa nativa (MGCPH4) de *M. pingshaense*, en contraste con una cepa comercial de *M. anisopliae* (Fungizium®), y con un insecticida químico granulado Allectus®-GR, contra larvas de *T. lalanza* en macetas de caña de azúcar, bajo condiciones semicontroladas.

Material y Métodos

Establecimiento de la parcela experimental

El estudio se realizó en macetas de caña de azúcar establecidas en la intemperie. Se sembraron tallos de aproximadamente 15 cm de la variedad (MEX-80-1410), que contenían yemas sanas, los cuales fueron previamente sometidos a un proceso de desinfección en una suspensión de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % por 10 min y agua destilada estéril. Los tallos se sembraron de manera individual en bolsas de polietileno de color negro, de 24 cm de largo por 26 cm de diámetro, que contenían 10 kg de suelo franco arenoso, previamente esterilizado en autoclave a 121°C y 1.2 bar de presión, por 2 h con 10 días de anterioridad. Las bolsas se perforaron para favorecer el drenaje y la humedad de las macetas se mantuvo con la adición de agua cada tercer día, con un pH de 7.0 y una dureza de 100 ppm de sólidos totales disueltos (TDS) de carbonatos de calcio (CaCO₃). Para la medición del pH se utilizó un potenciómetro Ketotek® y para la medición de TDS, se utilizó un conductímetro Runjie®.

Obtención de larvas de *Triodonyx lalanza*

Las larvas de tercer instar de *T. lalanza* se obtuvieron a partir de una parcela de caña de azúcar infestada. La recolecta de larvas se realizó a partir de muestreos de 0.25 m² justo en la zona radicular de la caña, los

were placed individually in transparent polyethylene bags 8 cm wide by 25 cm long, with approximately 20 g of soil from the collection site to avoid dehydration during transfer to the laboratory. During processing, the larvae were deposited individually in transparent plastic cups with a capacity of 200 mL, containing approximately 150 g of soil previously sterilized in an autoclave 10 days before. The determination of the species of white grubs was carried out based on the description of Morón *et al.* (1999). For the feeding of the larvae, 10 g of carrot in small slices were added, properly sterilized in a suspension of NaClO at 1 % and sterile distilled water to eliminate the excess of this solution. The soil was moistened with approximately 25 mL of distilled water for each cup, with the help of a plastic manual sprinkler for domestic use with a capacity of 1 000 mL. Subsequently, the larvae underwent a “quarantine” process at a temperature of $28 \pm 2^\circ\text{C}$ for 60 days, with observations made every seven days, to discard dead larvae or those infected by entomopathogenic agents, replace the carrot slices and maintain soil moisture. The larvae that were healthy after this incubation period were used for the study.

Treatments evaluated and quality determination

Four treatments consisted of two biological insecticides (the MGCPH4 isolate, and the commercial insecticide Fungizium®) a granulated chemical insecticide and a control treatment with plants infested with white grubs, without application of insecticide. The MGCPH4 isolate corresponds to a native strain molecularly identified by sequencing the EF-1 α gene as *M. pingshaense* (Chen and Guo) (GenBank access code OK626215.1) obtained from a *Phyllophaga* sp. in sugarcane. This strain showed greater virulence on third-instar larvae of *T. lalanza*, in a previous pathogenicity bioassay, under laboratory conditions (data submitted). The commercial biological insecticide Fungizium® corresponds to a strain of *M. anisopliae* of an unknown host, with an emulsifiable concentrated formulation, at a concentration of 1×10^{11} conidia·L⁻¹ of the commercial product. The chemical insecticide corresponded to Allectus®-GR, a granular formulation of neonicotinoid pyrethroid (i.a. bifenthrin + imidacloprid) from the FMS Agrochemical

especímenes obtenidos se depositaron individualmente en bolsas de polietileno transparentes de 8 cm de ancho por 25 cm de largo, con aproximadamente 20 g de suelo del sitio de recolecta, para evitar su deshidratación durante el traslado al laboratorio. En su procesamiento, las larvas se depositaron de manera individual en vasos plásticos transparentes de 200 mL de capacidad, que contenían aproximadamente 150 g de suelo, previamente esterilizado en autoclave, con 10 días de anterioridad. La determinación de la especie de gallina ciega se llevó a cabo con base en la descripción de Morón *et al.* (1999). Para la alimentación de las larvas se adicionaron 10 g de zanahoria en pequeñas rodajas, debidamente esterilizadas en una suspensión de NaClO al 1 % y agua destilada estéril para eliminar el exceso de esta solución. El suelo se humedeció con aproximadamente 25 mL de agua destilada por cada vaso, con ayuda de un aspersor manual plástico de uso doméstico, de 1 000 mL de capacidad. Posteriormente las larvas se sometieron a un proceso de “cuarentena” a una temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, por 60 días, con observación cada siete días, para descartar las larvas muertas o infectadas por agentes entomopatógenos, sustituir las rodajas de zanahoria y mantener la humedad del suelo. Las larvas que resultaron sanas después de este periodo de incubación se utilizaron para el estudio.

Tratamientos evaluados y determinación de calidad

Se evaluaron cuatro tratamientos consistentes en dos insecticidas biológicos (el aislamiento MGCPH4, y el insecticida comercial Fungizium®) un insecticida químico granulado y un tratamiento control con plantas infestadas con gallinas ciegas, sin aplicación de insecticida. El aislamiento MGCPH4 corresponde a una cepa nativa identificada molecularmente mediante secuenciación del gen EF-1 α como *Metarhizium pingshaense* Chen y Guo, (código de acceso GenBank OK626215.1) obtenida a partir de una larva de *Phyllophaga* sp. en caña de azúcar. Esta cepa mostró una mayor virulencia sobre larvas de tercer instar de *T. lalanza*, en un bioensayo previo de patogenicidad, bajo condiciones de laboratorio (datos sometidos). El insecticida biológico comercial Fungizium® corresponde a una cepa de *M. anisopliae* de hospedero desconocido, de formulación concentrada emulsionable, a una concentración de 1×10^{11} conidios·L⁻¹ de producto comercial. El insecticida químico correspondió a Allectus®-GR, un piretroide neonicotinoide de formulación granulada, (i.a. bifentrina + i.a.

of Mexico. The *M. pingshaense* strain was reproduced in rice as a substrate, based on the methodology proposed by Monzón (2001). A quality test was performed on each *Metarhizium* strain, consisting of the concentration and viability of conidia, with the technique proposed by Vélez *et al.* (1997).

Infestation of white grubs and application of treatments

Ninety days after planting the cane, the infestation was carried out, adding 10 healthy third-instar larvae of *T. lalanza* per pot. Larvae that showed little vigor and did not burrow into the soil were replaced by more vigorous and active ones. Seven days after the infestation, the insecticides were applied. The two strains of *Metarhizium* were applied at a dose of 1×10^5 conidia·cm², while the chemical insecticide was applied at a dose of 30 kg·ha⁻¹. The amount applied per treatment was calculated based on its concentration i.a./kg, as in the case of the native strain of *M. pingshaense* and the granulated chemical insecticide, and i.a./L, in the case of the liquid insecticide Fungizium®, and based on to the planting density and population of sugarcane on average (Table 1). The weight of the portions to be applied for the native strain and the granulated chemical insecticide was carried out on an analytical balance and placed in 8x15 cm polyethylene bags for transfer and application in the experimental plot. Both the native strain and the granulated chemical insecticide were applied near the root zone of the cane, while the liquid insecticide was applied by "drench" route with a manual sprayer, where 60 mL of fungus suspension was added per pot. To maintain soil moisture, approximately 2 L of water per pot was added every third day, with a pH of 7.0 and 100 ppm of TDS.

Experimental design and evaluation of larval mortality

A completely randomized experimental design was considered with 10 larvae per pot or experimental unit, with 10 repetitions for a total of 100 larvae per treatment. The control treatment without the application of insecticides was infested with the same number of larvae per pot, with 10 repetitions for a total of 100 larvae included.

imidacloprid) de la FMC Agroquímica de México. La cepa de *M. pingshaense* se reprodujo en arroz como sustrato, con base en la metodología propuesta por Monzón (2001). A cada cepa de *Metarhizium* se les realizó una prueba de calidad, consistente en la concentración y viabilidad de conidios, con la técnica propuesta por Vélez *et al.* (1997).

Infestación de gallinas ciegas y aplicación de los tratamientos

A los 90 días después de la siembra de la caña, se realizó la infestación, adicionando 10 larvas sanas de tercer instar de *T. lalanza* por maceta. Las larvas que mostraron poco vigor y no se enterraron en el suelo se sustituyeron por otras más vigorosas y activas. A los siete días de la infestación se realizó la aplicación de los insecticidas. Las dos cepas de *Metarhizium* se aplicaron a una dosis de 1×10^5 conidios·cm², en tanto el insecticida químico se aplicó a una dosis de 30 kg·ha⁻¹. La cantidad aplicada por tratamiento se calculó con base a su concentración i.a./kg, para el caso de la cepa nativa de *M. pingshaense* y el insecticida químico granulado, e i.a./L, para el caso del insecticida líquido Fungizium®, y con base a la densidad de siembra y población de caña de azúcar en promedio (Tabla 1). El peso de las porciones a aplicar para la cepa nativa y el insecticida químico granulado se realizó en una balanza analítica y se colocaron en bolsas de polietileno de 8x15 cm, para su traslado y aplicación en la parcela experimental. Tanto la cepa nativa como el insecticida químico granulado se aplicaron cerca de la zona radicular de la caña, mientras que el insecticida líquido se aplicó por vía "drench" con un atomizador manual, donde se adicionó 60 mL de suspensión del hongo por maceta. Para mantener la humedad del suelo se adicionó aproximadamente 2 L de agua por maceta, cada tercer día, con un pH de 7.0 y 100 ppm de TDS.

Diseño experimental y evaluación de mortalidad de larvas

Se consideró un diseño experimental completamente al azar con 10 larvas por maceta o unidad experimental, con 10 repeticiones para un total de 100 larvas por tratamiento. El tratamiento control sin la aplicación de insecticidas, se infestó con el mismo número de larvas por maceta, con 10 repeticiones para un total de 100 larvas incluidas.

The percentage of mortality was evaluated every 10 days after the application of the insecticides, for 60 days, which was determined by the following formula proposed by Barrera *et al.* (2013).

$$\% M = \frac{NDFILE}{NLLBS} \times 100$$

Where,

% M= Percentage of mortality of larvae per treatment.

NDFILE= Number of dead or fungus-infected larvae at the end of the study.

NLLBS= Number of larvae living at the beginning of the study.

El porcentaje de mortalidad se evaluó cada 10 días después de la aplicación de los insecticidas, durante 60 días, el cual se determinó mediante la siguiente fórmula propuesta por Barrera *et al.* (2013):

$$\% M = \frac{NDFILE}{NLLBS} \times 100$$

Donde,

% M= Porcentaje de mortalidad de larvas por tratamiento.

NDFILE = Número de larvas muertas o infectadas por hongo al final del estudio.

NLLBS = Número de larvas vivas al inicio del estudio.

Table 1. Treatments used in the evaluation of mortality of third instar larvae of *Triodonyx lalanza* in sugarcane pots.
Tabla 1. Tratamientos utilizados en la evaluación de mortalidad de larvas de tercer instar de *Triodonyx lalanza* en macetas de caña de azúcar.

Tratamiento	Ingrediente activo	Formulación	Dosis/ha	Concentración (i.a./kg de sólido inerte)	Cantidad aplicada*
Cepa MGCPH4	<i>M. pingshaense</i>	Gránulos de arroz	82 kg (1x10 ¹³ conidios)	1.22x10 ¹¹ c.kg de arroz	2.05 g/maceta
Allectus®-GR	Bifentrina + imidacloprid	Granulado	30 kg de producto	Bifentrina (3g/kg producto) imidacloprid (4g/kg producto)	0.75 g/maceta
Fungizium®	<i>M. anisopliae</i>	Concentrado emulsionable	1x10 ¹³ conidios	1.06x10 ¹¹ c.L de producto	2.5 mL/maceta
Testigo			Sin aplicación		Sin aplicación

c.kg (conidia.kg), c.L (conidia.L). *For the maximum recommended dose per hectare. The calculation was based on an average of 40 000 plants/ha of sugarcane. The amount of fungus applied by each strain was determined based on its yield of conidia.g rice and conidia.mL.

c.kg (conidios.kg), c.L (conidios.L). *Con relación a la dosis máxima recomendada por hectárea. El cálculo se realizó con base en un promedio de 40 000 plantas/ha de caña de azúcar. La cantidad de hongo aplicado por cada cepa se determinó con base a su rendimiento de conidios.g de arroz y conidios.mL.

During the larval mortality evaluation process, the soil was carefully removed from the pots to be deposited in plastic trays to inspect the amount of dead and/or mycosed larvae. The mortality criterion consisted in the application of the physical stimulus on the ventral surface of the thorax, those larvae with no movement were considered dead (Sotelo-Galindo *et al.*, 2008), while those that presented a rigid appearance with pale white coloration (Valencia-Cortés *et al.*, 2011), were considered infected by the pathogenic agent. To confirm the death of the larvae by the fungus, they were individually confined in plastic cups of 200 mL capacity with approximately 150 g of moistened soil, and properly sterilized seven days before. Subsequently, they are incubated in a room in total darkness to promote the sporulation of the fungus on the insect's corpse.

A test of normality and homogeneity of variances was carried out for the mortality data obtained with the Kolmogorov-Smirnov and Bartlett tests, respectively. In addition, a correction of mortality efficiency was made, with respect to the larvae killed in the treatment of seedlings without insecticide using the Schneider-Orelli formula (Püntener, 1981):

$$\% MC = \frac{\% MEU - \% MECU}{100 - \% MECU} \times 100$$

Where,

% MC = Percentage of corrected mortality of larvae per treatment.

% MEU = Percentage of mortality in the experimental unit.

% MECU = Percentage of mortality in the experimental control unit.

Statistical analysis was performed for the percentage variable of dead larvae in the program SAS (2002), where a variance analysis (ANOVA) and a comparison of means were performed using the Tukey test (HSD) (α 0.05), both for normal and corrected mortality data.

Durante el proceso de evaluación de la mortalidad de larvas, cuidadosamente el suelo fue extraído de las macetas para depositarse en bandejas plásticas e inspeccionar la cantidad de larvas muertas y/o micosadas. El criterio de mortalidad consistió en la aplicación del estímulo físico en la superficie ventral del tórax, aquellas larvas con ausencia de movimiento se consideraron muertas (Sotelo-Galindo *et al.*, 2008), mientras que las que presentaron un aspecto rígido con coloración blanca pálida (Valencia-Cortés *et al.*, 2011), se consideraron infectadas por el agente patógeno. Para confirmar la muerte de las larvas por el hongo, estas se confinaron individualmente en vasos plásticos de 200 mL de capacidad con aproximadamente 150 g de suelo humedecido, debidamente esterilizado siete días antes. Posteriormente se sometieron a incubación en un cuarto con total oscuridad, para propiciar la esporulación del hongo sobre el cadáver del insecto.

Se realizó una prueba de normalidad y homogeneidad de varianzas para los datos de mortalidad obtenidos con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett, respectivamente, además se realizó una corrección de eficiencia de mortalidad, con respecto a las larvas muertas en el tratamiento de plantas sin insecticida mediante la fórmula de Schneider-Orelli (Püntener, 1981):

$$\% MC = \frac{\% MEU - \% MECU}{100 - \% MECU} \times 100$$

Donde,

% MC= Porcentaje de mortalidad corregida de larvas por tratamiento.

% MEU = Porcentaje de mortalidad en unidad experimental.

% MECU = Porcentaje de mortalidad en unidad experimental control.

Se realizó un análisis estadístico para la variable porcentaje de larvas muertas en el programa SAS (2002), donde se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias mediante la prueba de Tukey (HSD) (α 0.05), tanto para los datos de mortalidad normales y corregidos.

Results

The quality test carried out for both biological treatments showed that the MGCPH4 strain presented a concentration of 1.22×10^8 conidia·g⁻¹, and a germination percentage of 100 % at 48 h after sowing in SDA medium (Sabouraud Dextrose Agar). For its part, the Fungizium® strain showed a concentration of 1.06×10^8 conidia·mL⁻¹, and a germination percentage of 98 %.

Regarding the bioassay in pots, all the treatments evaluated caused larval mortality between 15 and 33 %, at 60 days of evaluation. The first mortality rates among the three insecticides were obtained 20 days after inoculation, with 3 and 5 %, and the highest rate of effectiveness occurred at 30 and 40 days, for which the percentage of mortality for each insecticide evaluated behaved as follows; Allectus®-GR showed the highest percentages, 12 and 11 %, followed by the native strain MGCPH4 with 9 and 7 %, and finally the commercial strain Fungizium® with 6 and 3 %, at 30 and 40 days of evaluation, respectively. After 40 days, mortality levels gradually decreased until reaching 0 % at 60 days after application. In the control treatment, a 4 % of mortality was registered 10 days after the start of the experiment, with a maximum accumulated mortality of 11 % at 30 days of evaluation, remaining unchanged until 60 days of evaluation; highlighting that the larvae mortality for this treatment was due to natural and management causes, totally unrelated to fungal and/or chemical infection. In any case, the level of mortality obtained in this treatment is within the permissible limits of mortality for the treatments considered as control (not greater than 20 %) (Sazo *et al.*, 2006; O'Callaghan *et al.*, 2012).

The normality test for the data of the percentage of dead larvae indicated that they followed a normal distribution ($p = 0.056$, Kolmogorov-Smirnov), as well as a homogeneity of variances between treatments ($p = 0.00958$, Bartlett). Regarding the corrected mortality data, the statistical analysis showed a normal distribution ($p = 0.117$, Kolmogorov-Smirnov), as well as a homogeneity of variances between treatments ($p = 0.2429$, Bartlett). The analysis of comparison of means of the normal mortality data, for the variable percentage of dead larvae, showed significant differences ($F(3,36) = 8.55$, $p = 0.0002$), highlighting the

Resultados

La prueba de calidad realizada para ambos tratamientos biológicos mostró que la cepa MGCPH4 presentó una concentración de 1.22×10^8 conidios·g⁻¹, y un porcentaje de germinación del 100 % a las 48 h después de la siembra en medio ADS (Agar Dextrosa Sabouraud). Por su parte la cepa Fungizium® mostró una concentración de 1.06×10^8 conidios·mL⁻¹, y un porcentaje de germinación del 98 %.

En cuanto al bioensayo en macetas, todos los tratamientos evaluados causaron mortalidad de larvas entre 15 y 33 %, a los 60 días de evaluación. Los primeros índices de mortalidad entre los tres insecticidas se obtuvieron a los 20 días después de la inoculación, con el 3 y 5 %, y el índice más alto de efectividad se presentó a los 30 y 40 días, para lo cual el porcentaje de mortalidad para cada insecticida evaluado se comportó de la siguiente manera; Allectus®-GR mostró los mayores porcentajes, 12 y 11 %, seguido la cepa nativa MGCPH4 con un 9 y 7 %, y por último la cepa comercial Fungizium® con un 6 y 3 %, a los 30 y 40 días de evaluación, respectivamente. Después de los 40 días, los niveles de mortalidad disminuyeron gradualmente hasta obtener el 0 %, a los 60 días después de la aplicación. En el tratamiento control registró una mortalidad de 4 %, a los 10 días de inicio del experimento, con una mortalidad máxima acumulada del 11 % a los 30 días de evaluación, permaneciendo sin cambio hasta los 60 días de evaluación, cabe destacar que la mortalidad de larvas para este tratamiento se debió a causas naturales y de manejo, totalmente ajenas a la infección por hongos y/o químicos. En todo caso, el nivel de mortalidad obtenido en este tratamiento se encuentra dentro de los límites permisibles de mortalidad para los tratamientos considerados como control (no mayor al 20 %) (Sazo *et al.*, 2006; O'Callaghan *et al.*, 2012).

La prueba de normalidad para los datos del porcentaje de larvas muertas indicó que siguieron una distribución normal ($p = 0.056$, Kolmogorov-Smirnov), al igual que una homogeneidad de varianzas entre tratamientos ($p = 0.00958$, Bartlett). En cuanto a los datos de mortalidad corregida, el análisis estadístico mostró una distribución normal ($p = 0.117$, Kolmogorov-Smirnov), al igual que una homogeneidad de varianzas entre tratamientos ($p = 0.2429$, Bartlett). El análisis de comparación de medias de los datos de mortalidad normal, para la variable porcentaje de larvas muertas mostró diferencias significativas ($F(3,36) = 8.55$, $p = 0.0002$), donde destacó el tratamiento

Allectus®-GR treatment with the highest mortality rate (33 %), compared to the rest of the treatments, followed by the native strain MGCPH4 with 22 % mortality. Regarding the analysis of means comparison of data for corrected mortality, it showed significant differences ($F(3,36) = 3.59, p = 0.0228$) highlighting the Allectus®-GR treatment with the highest corrected mortality rate (23.14), followed by the native strain MGCPH4 with 13.07 % (Table 2).

Allectus®-GR con el mayor índice de mortalidad (33 %), con respecto al resto de los tratamientos, a excepción de la cepa nativa MGCPH4 (22 %) siendo estadísticamente iguales. En cuanto al análisis de comparación de medias de datos para la mortalidad corregida mostró diferencias significativas ($F(3,36) = 3.59, p = 0.0228$) destacando el tratamiento Allectus®-GR con el mayor índice de mortalidad corregida (23.14 %), sin diferencia significativa con la cepa MGCPH4 (13.07 %) (Tabla 2).

Table 2. Percentage of mortality of third instar larvae of *Triodonyx lalanza* by treatments in sugarcane pots.

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad de larvas de tercer instar de *Triodonyx lalanza* por tratamientos en macetas de caña de azúcar.

Tratamiento	Porcentaje de larvas muertas/días después de la inoculación						% Total	Media (±SD)	% Mc	Media (±SD)
	10	20	30	40	50	60				
MGCPH4	0	3	9	7	3	0	22	2.20 (±1.13) ^{ab}	13.07	1.30 (±1.16) ^{ab}
Fungizium®	0	4	6	3	2	0	15	1.50 (±1.50) ^b	7.01	0.70 (±0.67) ^b
Allectus®-GR	0	5	12	11	5	0	33	3.30 (±1.05) ^a	23.14	2.31 (±1.33) ^a
Testigo	4	5	2	0	0	0	11	1.10 (±1.28) ^b	11	1.10 (±1.28) ^{ab}

% Mc = percentage of corrected mortality. Means with the same literal are not significantly different according to the Tukey (HSD) test ($\alpha 0.05$). SD= Standar deviation.

% Mc= porcentaje de mortalidad corregida. Medias con la misma literal no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey (HSD) ($\alpha 0.05$). SD= Desviación estandar.

Discussion

The mortality percentages of larvae obtained, in relation to the virulence of the biological insecticides used in this study, were similar to those reported by Nájera-Rincón (2010) who, when evaluating the effectiveness of *B. bassiana* strains applied to rice in maize experimental plots, obtained between 16 and 18 % mortality of third instar larvae of *Phyllophaga vetula* Horn, at 40 days of evaluation. On their part, Castro-Ramírez & Ramírez-Salinas (2010), when evaluating the effectiveness of two strains of *B. bassiana* applied to rice in corn pots, they obtained 28 % mortality of third-instar larvae of three species of *Phyllophaga*: *Phyllophaga*

Discusión

Los porcentajes de mortalidad de larvas obtenidos, con relación a la virulencia de los insecticidas biológicos utilizados en este estudio fueron similares a los reportados por Nájera-Rincón (2010) quien al evaluar la efectividad de cepas de *B. bassiana* aplicadas en arroz, en parcelas experimentales de maíz obtuvo entre un 16 y 18 % de mortalidad de larvas de tercer instar de *Phyllophaga vetula* Horn, a los 40 días de evaluación. Por su parte, Castro-Ramírez y Ramírez-Salinas (2010) al evaluar la efectividad de dos cepas de *B. bassiana* aplicadas en arroz en macetas de maíz obtuvieron un 28 % de mortalidad de larvas de tercer instar, de tres especies de *Phyllophaga*: *Phyllophaga ravidata* (Blanchard),

ravida (Blanchard), *Phyllophaga obsoleta* (Blanchard) and *Phyllophaga tumulosa* (Bates), at 40 days of evaluation. However, Ruiz-Vega et al. (2012), when evaluating a strain of *M. anisopliae* applied to rice in corn pots, obtained a 62.5 % mortality of third instar larvae of *P. vetula*, 53 days after inoculation, and up to 87.5 % mortality, through the combined action of the *Metarhizium* strain, with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar at 20 days of evaluation. On the other hand, Bayardo-Platas (2004) when evaluating the virulence of the commercial strains Fitosan-M® (*M. anisopliae*) and Sehu-Biocop Bb® (*B. bassiana*), against third instar larvae of *Phyllophaga* in experimental plots of Christmas trees of the genus *Pseudotsuga*, it was observed that the fungus *M. anisopliae* showed a greater effect than the fungus *B. bassiana*, by maintaining an average density of 8.3 live larvae/soil sample, less than the control, in the *M. anisopliae* treatment, and an average density of 13.6 live larvae/soil sample, less than the control, in the treatment with *B. bassiana*, at 56 days of evaluation. Likewise, he pointed out that the highest rates of effectiveness were obtained within 21 and 42 days, in both treatments.

Meanwhile, when contrasting the mortality results obtained in this study by the chemical insecticide Allectus®-GR, Morón et al. (2010) mentions that, through bioassays carried out by Hernández-Rodríguez & Ramírez-Campos (data not published), which consisted of evaluating the effectiveness of five chemical insecticides; Terbufos, Chlorpyrifos, Carbofuran, Isazofos and Diazinon, for the control of third instar larvae of *T. lalanza*, under greenhouse, pot and field conditions, obtained somewhat contradictory results. In the test carried out in a greenhouse by applying high doses; 1 g of active compound of Terbufos, Carbofuran, Isazofos and Diazinon, for every 250 g of soil, obtained more than 70 % mortality of larvae, 12 days after application; however, in the test with Chlorpyrifos they obtained less than 60 %. Regarding the bioassay carried out in pots, through the application of large doses of insecticides, 4 to 15 g in buckets with 12 kg of soil, they observed that, after 13 days, Diazinon showed 0 % mortality, while tests with Carbofuran, Chlorpyrifos, Isazofos and Terbufos caused between 4 and 20 % mortality. However, in the evaluation carried out under field conditions, only Isazofos, applied at a dose of 25 kg·ha⁻¹, caused more than 50 % mortality, within 20 and

Phyllophaga obsoleta (Blanchard) y *Phyllophaga tumulosa* (Bates), a los 40 días de evaluación. No obstante, Ruiz-Vega et al. (2012) al evaluar una cepa de *M. anisopliae* aplicada en arroz en macetas de maíz obtuvieron un 62.5 % de mortalidad de larvas de tercer instar de *P. vetula*, a los 53 días después de la inoculación, y hasta un 87.5 % de mortalidad, mediante la acción combinada de la cepa *Metarhizium*, con el nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, a los 20 días de evaluación. Por su parte, Bayardo-Platas (2004) al evaluar la virulencia de las cepas comerciales Fitosan-M® (*M. anisopliae*) y Sehu-Biocop Bb® (*B. bassiana*), contra larvas de tercer instar de *Phyllophaga* en parcelas experimentales de árboles de navidad del género *Pseudotsuga* observó que el hongo *M. anisopliae* mostró un mayor efecto que el hongo *B. bassiana*, al mantener una densidad promedio de 8.3 larvas vivas/muestra de suelo, menor con respecto al testigo, en el tratamiento con *M. anisopliae*, y una densidad promedio de 13.6 larvas vivas/muestra de suelo, menor con respecto al testigo, en el tratamiento con *B. bassiana*, a los 56 días de evaluación. Así mismo, señaló que los mayores índices de efectividad se obtuvieron dentro de los 21 y 42 días, en ambos tratamientos.

Por otro lado, al contrastar los resultados de mortalidad obtenidos en este estudio por parte del insecticida químico Allectus®-GR, Morón et al. (2010) menciona que, mediante bioensayos realizados por Hernández-Rodríguez y Ramírez-Campos (datos no publicados), que consistieron en la evaluación de la efectividad de cinco insecticidas químicos; Terbufos, Clorpirifos, Carbofuran, Isazofos y Diazinon, para el control de larvas de tercer instar de *T. lalanza*, bajo condiciones de invernadero, de macetas y de campo obtuvieron resultados un tanto contradictorios. En la prueba realizada en invernadero mediante la aplicación de altas dosis; 1 g de compuesto activo de Terbufos, Carbofuran, Isazofos y Diazinon, por cada 250 g de suelo obtuvieron más del 70 % de mortalidad de larvas, a los 12 días después de la aplicación, sin embargo, en la prueba con Clorpirifos obtuvieron menos del 60 %. En cuanto al bioensayo realizado bajo condiciones de maceta, mediante la aplicación de grandes dosis de insecticidas, 4 a 15 g en cubetas con 12 kg de suelo observaron que, a los 13 días, el Diazinon mostró un 0 % de mortalidad, mientras que las pruebas con Carbofuran, Clorpirifos, Isazofos y Terbufos ocasionaron entre un 4 y un 20 % de mortalidad. No obstante, en la evaluación realizada bajo condiciones de campo, solamente Isazofos aplicado a una dosis de 25 kg·ha⁻¹ ocasionó más de un 50 % de mortalidad, dentro de los 20

30 days after application. On the other hand, Bayardo-Platas (2004), through the evaluation of three commercial insecticides: Brigadier® 20G (Bifenthrin), Furadan® 350L (Carbofuran) and Lucater® 5G (Terbufos), observed that all treatments were effective for the control of white grubs, maintaining lower average densities of larvae, in contrast to the control during the evaluation. These densities corresponded to 6.48, 5.01 and 7.43 live larvae/soil samples, for the Bifenthrin, Carbofuran and Terbufos compounds, respectively, at 56 days of evaluation, achieving their highest effectiveness rates at 21 and 35 days after their application. However, Ruíz-Vega *et al.* (2012) by evaluating the commercial chemical treatment Granudin® 4 % (Diazinon) applied at a dose of 25 kg·ha⁻¹, obtained 100 % mortality of larvae, 20 days after application. Based on the above, it can be said that the difference between the low mortality obtained in this study and the high mortality rates reported by Morón *et al.* (2010) and Ruíz-Vega *et al.* (2012), could be due to various factors, such as the dose and amount of insecticide applied in each of the tests, the difference in the immune response of each white grub in relation to its weight and size, as well as the capacity of each larval species to evade the effect of the active ingredients. For example, the doses of active chemicals used in the bioassays reported by Morón *et al.* (2010), consisting of 4 to 5 g per pot, with 12 kg of soil, and up to 40 g/10 kg of soil, were much higher than the amount of chemical insecticide applied in this study (0.75 g per pot, with 10 kg of soil), equivalent to the dose of 30 kg·ha⁻¹; on the other hand, the high mortality reported by Ruíz-Vega *et al.* (2012), rather than possibly being due to the greater degree of virulence on the part of its strain, or to the greater effectiveness on behalf of the chemical insecticide, the factor that may possibly be related is the degree of susceptibility and the capacity that each species of white grubs possesses to avoid the effect of the active ingredients, depending on its size and fresh weight. For example, in this case, the fully developed third-instar larvae of *T. lalanza* presents a large size (8 mm width of the cephalic capsule) and a fresh weight of up to 3.5 g, values that exceed up to four or five times more, the size of the main plague larvae of the *Phyllophaga* complex reported in Mexico (Morón *et al.*, 2010), in which *P. vetula* is found, a species evaluated by Ruíz-Vega *et al.* (2012). Therefore, the large size of *T. lalanza* gives it the development of a much thicker and chitinized cuticle, which acts as an immune barrier to infection by the fungus, and less susceptibility to the insecticide (Lu &

y 30 días después de la aplicación. Por su parte Bayardo-Platas (2004) mediante la evaluación de tres insecticidas comerciales Brigadier® 20G (Bifentrina), Furadan® 350L (Carbofuran) y Lucater® 5G (Terbufos) observó que todos los tratamientos fueron efectivos para el control de garrinas ciegas, manteniendo densidades promedio de larvas menores, con respecto al testigo durante la evaluación. Estas densidades correspondieron a 6.48, 5.01 y 7.43 de larvas vivas/muestra de suelo, para los compuestos Bifentrina, Carbofuran y Terbufos, respectivamente, a los 56 días de evaluación, logrando sus mayores índices de efectividad a los 21 y 35 después de la aplicación. No obstante, Ruíz-Vega *et al.* (2012) mediante la evaluación del tratamiento químico comercial Granudin® 4 % (Diazinon) aplicado a una dosis de 25 kg·ha⁻¹, obtuvieron un 100 % de mortalidad de larvas, a los 20 días después de la aplicación. Con base en lo anterior, se puede decir que la diferencia entre la baja mortalidad obtenida en este estudio con los altos índices de mortalidad reportados por Morón *et al.* (2010) y Ruíz-Vega *et al.* (2012), pudo deberse a varios factores como la dosis y cantidad de insecticida aplicado en cada una de las pruebas, la diferencia en la respuesta inmune de cada gallina ciega en relación con su peso y tamaño, así como la capacidad de cada especie larval para evadir el efecto de los activos. Por ejemplo, las dosis de activos químicos empleadas en los bioensayos reportados por Morón *et al.* (2010); (4 a 5 g/maceta con 12 kg de suelo, y hasta 40 g/10 kg de suelo fueron bastante superiores a la cantidad aplicada de insecticida químico en este estudio, (0.75 g/maceta con 10 kg de suelo), equivalente a la dosis de 30 kg·ha⁻¹. Por otro lado, la alta mortalidad reportada por Ruíz-Vega *et al.* (2012), más que deberse posiblemente al mayor grado de virulencia por parte de su cepa, o a la mayor efectividad por parte del insecticida químico, el factor que posiblemente puede estar relacionado es el grado de susceptibilidad y la capacidad que posee cada especie de gallina ciega para evadir el efecto de los activos, en función a su tamaño y peso fresco. Por ejemplo, para este caso, la larva de tercer instar de *T. lalanza* completamente desarrollada presenta un gran tamaño (8 mm de anchura de cápsula cefálica) y un peso fresco de hasta 3.5 g, valores que superan hasta cuatro o cinco veces más, el tamaño de las principales larvas plaga del complejo *Phyllophaga* reportadas en México (Morón *et al.*, 2010), en la que se encuentra *P. vetula*, especie evaluada por Ruíz-Vega *et al.* (2012). Por ende, el gran tamaño que registra *T. lalanza* le confiere el desarrollo de una cutícula mucho más gruesa y quitinizada, que actúa como una barrera inmune a la infección por parte del hongo, y a una menor susceptibilidad por parte del insecticida (Lu & St. Leger, 2016). Al respecto,

St Leger, 2016). In this regard, Morón *et al.* (2010) point out that, when the larvae of *T. lalanza* are affected by insecticides, they exhibit a great physiological reaction to discard part of the toxicant orally or rectally, and a great behavioral response to move away from the soil impregnated with poisons, since during the tests carried out by Hernández-Rodríguez and Ramírez-Campos (data not published), it was observed that, as part of the evasive reactions of the larvae of *T. lalanza* upon assimilating the dose of active chemicals, they became immobilized to vomit or defecate with great intensity the poison, to later resume its activity. Another of the evasive actions they observed was that the larvae, upon perceiving the poison, tried to go out of the soil, or else, they buried themselves deep in the pots. It is worth mentioning that this last behavior could be confirmed in this study since, during the mortality evaluation process, 40 days after the application of the three insecticides it was observed that many of the larvae were positioned at the bottom of the pot, in the lower part of the rhizosphere of sugarcane, while during the evaluation in the control treatment, this behavior did not occur. Considering the above, with respect to the immune capacity of each larval species based on their size and weight, the similarity and closeness of the mortality levels obtained by the biological strains in this study with the mortality exerted by the *Beauveria* strains, in the tests developed by Nájera-Rincón (2010), and Castro-Ramírez & Ramírez-Salinas (2010) result interesting. Since the size and weight of the third instar larval species of *Phyllophaga* that were used in these two tests is three times less than that of the third instar larvae of *T. lalanza*, why did these authors not obtain higher mortality indices? this may be due to a lower degree of virulence exerted by the *Beauveria* strains, compared to the *Metarhizium* strains, a phenomenon that has been demonstrated in several virulence bioassays against white grubs (Flores *et al.*, 2002; Bayardo-Platas, 2004; Sotelo-Galindo *et al.*, 2008; Solís-Pérez *et al.*, 2016).

When contrasting the mortality rates of each of the treatments evaluated in this study, the highest percentage of mortality obtained by Allectus®-GR in comparison to the native strain of *M. pingshaense* and the commercial strain Fungizium®, are related to the advantage of its three mechanisms of action (by contact, ingestion and by systemic activity via xylem), in contrast to strains of entomopathogenic fungi, which can act

Morón *et al.* (2010) señalan que, cuando las larvas de *T. lalanza* son afectadas por insecticidas, exhiben una gran reacción fisiológica para desechar parte del tóxico por vía oral o rectal, y una gran respuesta conductual para alejarse del suelo impregnado con veneno, ya que durante las pruebas realizadas por parte de Hernández-Rodríguez y Ramírez-Campos (datos no publicados), se observó que, como parte de las reacciones evasivas de las larvas de *T. lalanza*, al asimilar la dosis de los activos químicos, se inmovilizaban para vomitar o defecar con gran intensidad el tóxico, para posteriormente reanudar su actividad. Otra de las acciones evasivas que observaron fue que, las larvas al percibir el veneno trataban de salir al exterior, o bien se enterraban profundamente en las macetas. Cabe mencionar que, este último comportamiento pudo confirmarse en este estudio ya que, durante el proceso de evaluación de mortalidad, a los 40 días después de la aplicación de los tres insecticidas, se observó que gran parte de las larvas se encontraban posicionadas justo en el fondo de la maceta, en la parte inferior de la rizósfera de la caña de azúcar, mientras que, durante la evaluación en el tratamiento control, no se presentó este comportamiento. Al tomar en cuenta lo anterior, con respecto a la capacidad inmune de cada especie larval en función a su tamaño y peso, resulta interesante entonces la similitud y cercanía de los niveles de mortalidad obtenidos por parte de las cepas biológicas en este estudio, con la mortalidad ejercida por parte de las cepas de *Beauveria*, en las pruebas desarrolladas por Nájera-Rincón (2010), y Castro-Ramírez y Ramírez-Salinas (2010). Al considerar que, el tamaño y peso de las especies larvales de tercer instar de *Phyllophaga* que se utilizaron en estas dos pruebas es tres veces menor al que presentan las larvas de tercer instar de *T. lalanza*, ¿por qué estos autores no obtuvieron más índices más altos de mortalidad? Esto quizás puede deberse al menor grado de virulencia que ejercen las cepas de *Beauveria*, en comparación con las cepas de *Metarhizium*, fenómeno que ha sido demostrado en varios bioensayos de virulencia contra gallinas ciegas (Flores *et al.*, 2002; Bayardo-Platas, 2004; Sotelo-Galindo *et al.*, 2008; Solís-Pérez *et al.*, 2016).

Al contrastar los índices de mortalidad de cada uno de los insecticidas evaluados en este estudio, se puede decir que, el mayor porcentaje de mortalidad efectuado por parte del insecticida químico Allectus®-GR, en comparación con la cepa nativa de *M. pingshaense* y la cepa comercial Fungizium®, se relacionada con ventaja de sus tres diferentes mecanismos de acción (por contacto, ingestión y por actividad sistémica vía xilema), en contraste con las cepas de hongos entomopatógenos actúan solamente por contacto. Otro factor que pudo haber influido en el mayor efecto de Allectus®-GR

only by contact. Another factor that may have influenced a greater effect of Allectus®-GR is its high degree of solubility, in agreement with Loera-Gallardo *et al.* (2010), that consider that among the main factors that affect the toxicity index of chemical insecticides is their degree of solubility, a property that influences directly in its distribution and mobility in the soil, and therefore in its level of effectiveness. On the other hand, the higher percentage of mortality caused by the native strain MGCPH4, compared to the commercial strain Fungizium®, may be due to the different degrees of virulence of each fungus, in relation to its pathogen-host specificity; that is, the MGCPH4 strain, when isolated from a *Phyllophaga* larva as original host, had a greater capacity to exert greater control over white grubs, compared to the Fungizium® strain, whose original host is unknown. In relation to this fact, Falconi *et al.* (2011) maintain that strains of entomopathogenic fungi tend to show a higher degree of virulence in individuals that corresponds to their original host, compared to strains isolated from other taxonomic groups. This same phenomenon was obtained by Flores *et al.* (2002) who, when evaluating the effectiveness of fungal strains against white grubs, observed that the isolates obtained from *Phyllophaga* larvae showed higher mortality rates in contrast with the strains that were isolated from hosts of the order Lepidoptera and Hemiptera. Based on the above, it can be said that, in some cases, not all commercial strains of entomopathogenic fungi exert a broad-spectrum control effect, so it must be considered that to use a commercial strain that guarantees efficient control over a pest, the species to be controlled must match with the taxonomic group of the original host of the commercial strain. In other words, and based on what was argued by Khan *et al.* (2012), a specific biological strain is needed to control each group of pest insects.

Conclusion

The Allectus®-GR chemical treatment statistically caused the highest mortality percentage of third instar larvae of *T. lalanza*, with 33 % and a corrected mortality of (23.14 %), followed by the native strain MGCPH4 of *M. pingshaense*, which recorded a percentage of larval mortality of 22 %, and a corrected mortality of 13.07 %. The results obtained in this study provide fundamental

es su alto grado de solubilidad en concordancia con Loera-Gallardo *et al.* (2010), quienes consideran que dentro de los principales factores que afectan el índice de toxicidad de los insecticidas químicos se encuentra el grado de solubilidad, propiedad que influye directamente en su distribución y movilidad en el suelo, y por ende en su nivel de efectividad. Por otro lado, el mayor porcentaje de mortalidad efectuado por parte de la cepa nativa MGCPH4, en comparación con la cepa comercial Fungizium®, puede deberse a los diferentes grados de virulencia de cada hongo, en relación a su especificidad patógeno-hospedero: es decir, la cepa MGCPH4 al ser aislada de una larva de *Phyllophaga* como hospedante original tuvo una mayor capacidad para ejercer un mayor control sobre gallinas ciegas, en comparación con la cepa Fungizium®, la cual se desconoce su hospedero original. En relación con este hecho, Falconi *et al.* (2011) señalan que las cepas de hongos entomopatógenos tienden a mostrar un mayor grado de virulencia, sobre individuos que corresponden con su hospedante original, en comparación con las cepas aisladas de otros grupos taxonómicos. Este mismo fenómeno fue obtenido por Flores *et al.* (2002) quienes al evaluar la efectividad de cepas de hongos contra gallinas ciegas observaron que, los aislamientos obtenidos a partir de larvas de *Phyllophaga* mostraron mayores índices de mortalidad, en comparación con las cepas que fueron aisladas de huéspedes del orden Lepidoptera y Hemiptera. Con base a lo señalado anteriormente, se puede decir que, en algunos casos, no todas las cepas comerciales de hongos entomopatógenos ejercen un efecto de control de amplio espectro, por lo que se debe de tomar en cuenta que, para utilizar una cepa comercial que garantice un control eficiente sobre una plaga, se debe de considerar que, la especie que se desea controlar coincida con el grupo taxonómico del hospedante original de la cepa comercial. Dicho de otra manera, y con base a lo argumentado por Khan *et al.* (2012), se necesita una cepa biológica específica para el control de cada grupo de insectos plaga.

Conclusiones

El tratamiento químico Allectus®-GR causó estadísticamente el mayor porcentaje de mortalidad de larvas de tercer instar de *T. lalanza*, con un 33 % y una mortalidad corregida de (23.14 %), seguido la cepa nativa MGCPH4 de *M. pingshaense* el cual registró un porcentaje de mortalidad de larvas de 22 %, y una mortalidad corregida de 13.07 %. Los resultados obtenidos en este estudio proveen información fundamental sobre la importante

information on the important biocontrol capacity of larvae exerted by the native strain of *M. pingshaense* in contrast to a chemical insecticide; also, the development of this test under semi-controlled conditions allows us to know the real effectiveness of said strain, against the great displacement capacity that the third instar larvae of *T. lalanza* naturally exhibit, to evade the active compound of the fungus. However, this fact shows the ability of the *M. pingshaense* strain to repel white grubs from the root zone of the sugarcane plant.

capacidad de biocontrol de larvas que ejerce la cepa nativa *M. pingshaense* en contraste con un insecticida químico; así mismo, el desarrollo de esta prueba bajo condiciones semicontroladas permite conocer la efectividad real de dicha cepa, contra la gran capacidad de desplazamiento que exhiben naturalmente las larvas de tercer instar de *T. lalanza*, para evadir el compuesto activo del hongo. Sin embargo, este hecho muestra la capacidad que posee la cepa *M. pingshaense* para repeler a las gallinas ciegas de la zona radicular de la planta de caña de azúcar.

Referencias

- Barrera, J., Carrascal, J., Numa, S., Rodríguez, D., & Cantor, F. (2013). Compatibilidad de *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae) con productos comerciales en condiciones de laboratorio. *Acta Biológica Colombiana*, 18(2), 265-270. <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v18n2/v18n2a4.pdf>
- Bayardo-Platas, G. C. (2004). Efectividad de insecticidas químicos y biológicos para el control del complejo "gallina ciega" en árboles de navidad [Tesis de Licenciatura, Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA)]. Zapopan, Jalisco, México. http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3139/Bayardo_Platas_Gloria_Carolina.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Calvo, J., Vargas, J., & Araya, M. (2016). Control químico de *Phyllophaga* en caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). 10° Congreso ATALAC 2016. 29 de agosto al 2 de septiembre, Boca del Río, Veracruz, México. <https://www.atamexico.com.mx/wp-content/uploads/2017/11/5-PLAGAS-2016.pdf>
- Carrillo-Benítez, M. G., Guzmán-Franco, A. W., Alatorre-Rosas, R., & Enríquez-Vara, J. N. (2013). Diversity and genetic population structure of fungal pathogens infecting white grub larvae in agricultural soils. *Microbial Ecology*, 65, 437-449. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0124-9>
- Castro-Ramírez, A. E., & Ramírez-Salinas, C. (2010). Control biológico de tres especies de *Phyllophaga* mediante el uso de *Beauveria bassiana* bajo condiciones de invernadero. In Rodríguez-del Bosque L. A., & Morón, M. A. Ecología y control de plagas edafícolas. (pp. 283-291). Publicación especial del Instituto de Ecología, A. C. México.
- Castro-Ramírez, A. E., & Ramírez-Salinas, C., Pacheco-Flores, C. (2004). Guía ilustrada sobre "gallina ciega" en la región Altos de Chiapas. El Colegio de la Frontera Sur y Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.
- Cortez-Isiordia, K. A., Isiordia-Aquino, N., Morón, M. A., Flores-Canales, R. J., Cambero-Campos, O. J., & Díaz-Heredia, M. (2017). Especies de "gallina ciega" (Coleoptera: Melolonthidae) asociadas a caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en el centro de Nayarit, México. *Entomología Mexicana*, 4, 732-737. https://socmexent.org/entomologia/revista/2017/SM/EM0892017_732-737.pdf
- Falconi, F., Flores, A., & Castellanos, P. (2011). Letalidad de hongos entomopatógenos sobre *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Revista Peruana de Biología*, 17(2), 225-229. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v17n2/a13v17n2.pdf>
- Flores, A. G., De la Rosa, W., Rojas, J. C., & Castro-Ramírez, A. E. (2002). Evaluation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (mitosporic) against species of the "white grub complex" in the south of Mexico. *Southwestern Entomologist*, 27(1), 73-83. https://a3ea40a5-331f-47b1-bc90-eeeaf4f80e71.filesusr.com/ugd/0646ec_ba6a81368d06452e87b0fff4265a7eeb.pdf
- Guzmán-Franco, A. W., Hernández-López, J., Enríquez-Vara, J. N., Alatorre-Rosas, R., Tamayo-Mejía, F., & Ortega-Arenas, L. D. (2012). Susceptibility of *Phyllophaga polyphylla* and *Anomala cincta* larvae to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates and interaction with soil properties. *Biocontrol*, 57, 553-563. <https://doi.org/10.1007/s10526-011-9421-3>
- Hernández-Velázquez, V. M., Núñez-Valdez, M. E., Ruiz-Vega, J., Nájera-Rincón, M. B., & Villalobos, F. J. (2010). Uso de entomopatógenos. In Rodríguez-del Bosque L. A., & Morón, M. A. Plagas del suelo. (pp. 169-186). Instituto Nacional

- de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma Chapingo y Mundi Prensa México, S. A. de C. V.
- Khan, S., Guo, L., Maimaiti, Y., Mijit, M., & Qiu, D. (2012). Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent. *Molecular Plant Breeding*, 3(7), 63-79. <https://doi.org/10.5376/mpb.2012.03.0007>
- Loera-Gallardo, J., Pérez-Domínguez, J. F., & Rodríguez-del Bosque, L. A. (2010). Control químico. In Rodríguez-del Bosque, L. A. and Morón, M. A. Plagas del suelo. (pp. 197-214). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma Chapingo y Mundi Prensa México, S. A. de C. V.
- Lu, H. L., & St. Leger, R. J. (2016). Insect immunity to entomopathogenic fungi. *Advances in genetic*, 94, 251-285. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.002>
- Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Avance en el fomento de productos fitosanitarios no sintéticos. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 63, 95-103. <http://www.bio-nica.info/Biblioteca/Monzon2001HongoEntomopatojenos.pdf>
- Morón, M. A., Hernández-Rodríguez, S., & Ramírez-Campos, A. (1999). Description of immature stages of *Phyllophaga* (*Triodonyx*) *lalanza* Saylor (Coleoptera: Melolonthidae: Melolonthinae). *Pan Pacific Entomologist*, 75(3), 153-158.
- Morón, M. A., Hernández-Rodríguez, S., & Ramírez-Campos, A. (2010). "Gallina ciega" en Nayarit. Estudios de caso. In Rodríguez-del Bosque, L. A. & Morón, M. A. Plagas del suelo. (pp. 285-298). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma Chapingo y Mundi Prensa, México.
- Morón, M. A., Ratcliffe, B. C., & Deloya, C. (1997). Atlas de los escarabajos de México (Coleoptera: Lamellicornia) volumen 1, familia Melolonthidae. CONABIO-Sociedad Mexicana de Entomología, A. C. México.
- Nájera-Rincón, M. B. (2010). Plagas del suelo en Michoacán. In Rodríguez-del Bosque, L. A., & Morón, M. A. Plagas del suelo (pp. 263-284). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma Chapingo y Mundi Prensa México, S. A. de C. V.
- O'Callaghan, M., Glare, T. R., & Lacey, L. A. (2012). Bioassay of bacterial entomopathogens against insect larvae. Chapter IV. In Lacey, L. A. Manual of techniques in invertebrate pathology (2nd Ed.), 101-127. Academic Press. San Diego CA, USA. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2.00004-x>
- Püntener, W. (1981). Manual for field trials in plant protection. Second Edition. Agricultural Division, Ciba-Geigy Limited. <http://www.ehabsoft.com/ldpline/onlinecontrol.htm#SunShepard>
- Rodríguez-del Bosque, L. A., & Morón, M. A. (2010). Plagas del suelo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma Chapingo y Mundi Prensa México, S. A. de C. V.
- Rodríguez-del Bosque, L. A., Silvestre, F., Hernández-Velázquez, V. M., Quiroz, H., & Throne, J. E. (2005). Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Phyllophaga crinita* and *Anomala flavipennis* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Entomological Science*, (40), 67-73. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-40.1.67>
- Ruiz-Vega, J., Aquino-Bolaños, T., Silva-Rivera, M. E., & Girón, S. P. (2012). Control integrado de la gallina ciega *Phyllophaga vetula* Horn (Coleoptera: Melolonthidae) con agentes entomopatógenos en Oaxaca, México. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(3), 609-616. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4689919>
- Statistical Analysis Systems (2002) SAS Version 9.1. SAS Institute Inc., Cary.
- Sazo, L., Araya, J. E., & Rodríguez, P. (2006). Evaluación de la susceptibilidad de *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) al azinfosmetil en nocardes de Chile. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*, 39, 451-453. http://sea-entomologia.org/Publicaciones/PDF/BOLN39/451_453BSEA39EntoAplicadaXIV.pdf
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Cierre por año agrícola en caña de azúcar. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Solís-Pérez, O., Castillo-Gutiérrez, A., Peña-Chora, G., Alvear-García, A., Serrano-Morales, M. M., Suárez-Rodríguez, R., & Hernández-Velázquez, V. M. (2016). Pathogenicity, virulence and the interaction of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Phyllophaga vetula* (Coleoptera: Melolonthidae). *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 10(4), 2607-2612. <https://doig.org/10.22207/JPAM.10.4.16>
- Sotelo-Galindo, F., Domínguez-Márquez, V. M., Martínez-Alonso, U., & Guerrero-Gómez, T. (2008). Evaluación de cepas

- nativas de hongos entomopatógenos en *Phyllophaga ravidia* (Coleoptera: Melolonthidae) en Guerrero, México. *Entomología Mexicana*, 7, 505-508. <https://www.socmexent.org/entomologia/revista/2008/CB/505-508.pdf>
- Valencia-Cortés, C., Pérez, S. M., Mesa, E., & Gómez de Olivera, H. (2011). Patogenicidad de hongos entomopatógenos del género *Metarhizium* sobre larvas de *Strategus aloeus* L. (Coleoptera: Scarabaeidae), en condiciones de laboratorio. *Palmas*, 32(4), 30-40.
- Vélez, A. P. E., Posada, F. F. J., Marín, M. P., González, G. M. T., Osorio, V. E. & Bautista, P. A. E. (1997). Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Boletín Técnico No. 17. Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFE) Chinchiná, Caldas, Colombia.
- Warner, W. B. & Morón, M. A. (1992). A revision of the *Phyllophaga* subgenus *Triodonyx* Saylor (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 65(3), 321-340. <http://www.jstor.org/stable/25085374>