



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD

MANEJO INTEGRAL DE ECOSISTEMAS

**INTERACCIONES MULTITRÓFICAS ENTRE LARVAS RIZÓFAGAS (*Phyllophaga  
vetula*), HONGOS ENTOMOPATÓGENOS (*Beauveria bassiana*) Y HONGOS  
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**GUADALUPE ZITLALPOPOCA HERNÁNDEZ**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOHN LARSEN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. EK DEL VAL DE GORTARI

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

DR. ALEJANDRO ALARCÓN

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE, 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD  
MANEJO INTEGRAL DE ECOSISTEMAS

**INTERACCIONES MULTITRÓFICAS ENTRE LARVAS RIZÓFAGAS (*Phyllophaga  
vetula*), HONGOS ENTOMOPATÓGENOS (*Beauveria bassiana*) Y HONGOS  
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**GUADALUPE ZITLALPOPOCA HERNÁNDEZ**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOHN LARSEN  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM  
COMITÉ TUTOR: DRA. EK DEL VAL DE GORTARI  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM  
DR. ALEJANDRO ALARCÓN  
COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE, 2015**

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presenta-

Por medio de la presente, me permito informar a usted, que en reunión ordinaria del Subcomité por Campo de Conocimiento de (Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas) del Posgrado en Ciencias Biológicas, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de Maestra en Ciencias Biológicas de la alumna **Guadalupe Zitalpopoca Hernández** con número de cuenta **408092887** con la tesis titulada: **"Interacciones multitróficas entre larvas rizófagas (*Phyllophaga vetula*), hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana*) y hongos micorrizicos arbusculares"** bajo la dirección del Dr. John Larsen.- Tutor principal:

Presidente:	Dr. Erick de la Barrera Montpellier
Vocal:	Dr. Francisco Javier Álvarez Sánchez
Secretario:	Dra. Ek del Val de Gortari
Suplente:	Dra. Ellen Andresen
Suplente:	Dra. Alicia Callejas Chervo

Sin otro particular, quedo de usted.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de agosto de 2015

*M. del Coro Arizmendi*  
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
Coordinadora del Programa



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por su apoyo académico y administrativo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado mediante la beca número 363133.

Al CONACYT por el financiamiento a la propuesta de investigación Básica (SEP-CONACYT-2012-179319) del proyecto “Importancia de los microbios benéficos de la rizósfera en la producción sustentable del maíz”.

A los apoyos a los estudios de Posgrado PAEP 2014 y 2015.

Al CONACYT por el apoyo de las Becas Mixtas 2015 MZO2016 movilidad en el extranjero (290936).

A mi comité tutorial: Dr. John Larsen, Dra. Ek del Val de Gortari y Dr. Alejandro Alarcón.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi *alma mater*.

Al Dr. John Larsen por su asesoría, enseñanzas y apoyo incondicional brindado durante mis estudios de Maestría. Por compartir su entusiasmo, conocimientos y visión práctica de la ciencia.

Al M. en C. Miguel Nájera Rincón, por su asesoría y correcciones de la tesis, su apoyo en las colectas de campo e identificación de material biológico. Por compartir sus conocimientos y experiencia.

A miembros de mi comité tutorial Dr. John Larsen, Dra. Ek del Val de Gortari y Dr. Alejandro Alarcón por sus valiosas aportaciones y recomendaciones.

Al Dr. Trevor Jackson, Dr. Travis Glare y M. en C. Federico Rivas Franco por su apoyo y asesoría brindados durante la estancia de investigación en AgResearch y en la Universidad de Lincoln.

A Maribel Nava Mendoza por su asesoría técnica en la determinación de nitrógeno y fósforo en muestras vegetales.

A Nidia Pérez Nasser por haber prestado espacio en el invernadero.

A los miembros de mi jurado Dr. Erick de la Barrera Montpellier, Dr. Francisco Javier Álvarez Sánchez, Dra. Ek del Val de Gortari, Dra. Ellen Andresen y Dra. Alicia Callejas Chavero por la revisión de la tesis y valiosas aportaciones.

A los compañeros del laboratorio de Agroecología (Marce, Ricardo, David, Paulette, Juan Luis, Fani, Netza, Ceci, Brenda, Paloma, Lucero, Semiramis, Clara, Andrea, José Manuel, etc.), especialmente a Mónica Alvarado Herrejón, Dante López Carmona y Omar Real Santillán, de quienes recibí un gran apoyo en la realización de los experimentos.

Al personal administrativo del IIES y del Posgrado: Janik Equihua, Alberto Valencia, Heberto Ferreira, Atzimba López, Lilia Jiménez, Armando Rodríguez y Ma. Del Coro Arizmendi.

## **DEDICATORIA**

*A Dios por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte, compañía y motivación.*

*Con cariño, respeto y admiración a mis padres, hermanos, maestros, amigos y familiares por su apoyo, enseñanzas, consejo, motivación, ejemplo y valores.*

*Este trabajo ha sido posible gracias a ellos.*



# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
2. ANTECEDENTES.....	6
2.1 Estudios sobre interacciones.....	6
2.1.1 Herbivoría de las raíces .....	6
2.1.2 Herbívoros radiculares e interacciones bióticas .....	7
2.1.3 Interacción planta-microorganismos .....	8
2.1.4 Interacciones multitróficas.....	9
3. HIPÓTESIS.....	11
4. OBJETIVOS .....	11
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
5.1 Especies de estudio .....	12
5.1.1 Maíz y <i>Phyllophaga</i> spp. ....	12
5.1.2 Hongos entomopatógenos: <i>Beauveria bassiana</i> .....	13
5.1.3 Hongos micorrízicos arbusculares .....	16
5.2 Diseño experimental .....	18
5.3 Colecta de <i>Phyllophaga vetula</i> .....	18
5.4 Inoculación de microorganismos .....	19
5.5 Siembra y fertilización .....	19
5.6 Cosecha .....	20
5.7 Determinación de biomasa y mortalidad de <i>P. vetula</i> .....	20
5.8 Densidad de <i>Beauveria bassiana</i> en el suelo .....	20
5.9 Colonización de HMA en raíces.....	21
5.10 Determinación de nitrógeno y fósforo total en el tejido vegetal .....	21
5.11 Análisis estadístico .....	22
6. RESULTADOS .....	23
6.1 Experimento 1: Interacción <i>Phyllophaga vetula</i> y plantas de maíz .....	23
6.2 Experimento 2: Interacciones maíz- <i>P. vetula</i> -hongos ( <i>B. bassiana</i> o <i>R. irregularis</i> ).....	26
6.3 Experimento 3: Persistencia de <i>B. bassiana</i> en presencia de HMA nativos .....	28
6.4 Experimento 4: Interacciones <i>P. vetula</i> , HMA nativos, <i>B. bassiana</i> y maíz .....	32
6.5 Experimento 5: Interacciones <i>P. vetula</i> , <i>R. irregularis</i> , <i>B. bassiana</i> y maíz.....	37

7.	DISCUSIÓN.....	41
7.1	Herbivoría de <i>P. vetula</i> .....	41
7.2	<i>P. vetula</i> e interacciones bióticas.....	41
7.3	Interacción maíz-microorganismos.....	42
7.4	Interacciones entre microorganismos .....	44
7.5	Interacciones multitróficas.....	45
7.6	Interacciones y factores abióticos.....	47
8.	CONCLUSIONES .....	48
9.	REFERENCIAS.....	49

## RESUMEN

*Phyllophaga spp.* es una de las plagas del suelo más importantes del maíz. En los últimos años se han empleado una gran variedad de agroquímicos para el control de esta plaga, sin embargo, el uso de este tipo de compuestos ha desencadenado problemas de contaminación de suelo y efectos adversos en la salud. Por lo que una de las alternativas de manejo es el control biológico.

El estudio sobre las interacciones de las plantas, sus plagas y microorganismos benéficos de la rizósfera, contribuye al diseño y aplicación de estrategias de control biológico, sin embargo, aún son escasos los estudios con un enfoque multitrófico.

En el presente trabajo se estudiaron las interacciones entre el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y hongos micorrízicos arbusculares (*Rhizophagus irregularis* o nativos) en presencia *Phyllophaga vetula*, una de las plagas más importantes del maíz a nivel de la raíz.

Se realizaron cinco experimentos con macetas en invernadero bajo un diseño factorial al azar. Los tres primeros experimentos fueron exploratorios, en el cuarto y el quinto experimento, se evaluaron las interacciones con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) nativos o con *R. irregularis*, respectivamente. En forma general los factores fueron: *B. bassiana* (sin y con), HMA (sin y con), *P. vetula* (sin y con) y las variables de respuesta fueron: peso seco parte aérea, peso seco parte radical, porcentaje de colonización de HMA, densidad en suelo de *B. bassiana*, mortalidad y biomasa de *P. vetula*, concentración de nitrógeno y fósforo en tejido vegetal de la parte aérea y radical.

Se realizó un análisis de varianza de dos y tres vías con el programa estadístico StatGraphics. Centurion XV.II. Las diferencias entre los tratamientos fueron analizados por la prueba LSD de múltiples rangos. La homogeneidad de varianza fue verificado mediante la prueba de Bartlett. Los datos de colonización de HMA fueron transformados a la función arcoseno. La correlación entre el aumento de biomasa de la larva y la colonización de HMA fue realizada con el programa estadístico Sigma Plot 11.0.

Los resultados mostraron: 1) La herbivoría de *P. vetula* redujo el crecimiento y nutrición vegetal de plantas de maíz, además de disminuir la colonización de HMA; 2) Los HMA nativos tuvieron un papel importante en el mejoramiento de la biomasa y nutrición vegetal. A pesar de que la presencia de HMA, nativos e inoculado, estuvo relacionada con la menor densidad de *B. bassiana*, juntos interaccionaron y disminuyeron los efectos negativos de la herbivoría de las larvas sobre el desempeño del maíz; 3) La presencia de *B. bassiana* se relacionó con una mayor biomasa de la larva y provocó menos del 5 % de mortalidad. También se relacionó con un mayor porcentaje de colonización de los HMA; 4) La interacción entre los HMA y entomopatógenos tuvo una actividad amortiguadora contra la acción de herbivoría de *P. vetula*.

En conclusión, la combinación de los hongos micorrízicos, nativos y el inóculo, y el entomopatógeno *B. bassiana* interactuaron sinérgicamente para contrarrestar los efectos de herbivoría de las raíces en términos de biomasa y nutrición del maíz en presencia de *P. vetula*.

## ABSTRACT

*Phyllophaga* spp. is one of the most important maize soil pests. In recent years a variety of chemicals have been employed to control *Phyllophaga* spp., however, the use of such pesticides has caused soil pollution problems and adverse health effects. In this context, biological control offers a more sustainable pest management measure.

Research on the interactions between plants, their pests and beneficial microorganisms in the rhizosphere contributes to the design and implementation of biological control strategies; however, few studies have employed a multi-trophic approach.

In this work we studied the role of interactions between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) (*Rhizophagus irregularis* and native communities) against *Phyllophaga vetula*, one of the most important root pests of maize.

We conducted five greenhouse pot experiments with factorial randomized design. The first three experiments were exploratory. In the main experiments, we evaluated the interactions between *P. vetula*, *B. bassiana* and AMF (exp 4 with native AMF and exp 5 with *R. irregularis*).

Main factors studied included: *B. bassiana* (with and without), AMF (with and without), *Phyllophaga vetula* (with and without) and the response variables were shoot and root dry weight, AMF colonization, population density of *B. bassiana* in soil, mortality and weight of *P. vetula* and plant tissue nitrogen and phosphorus content in shoot and root.

Analysis of variance of two and three ways was conducted with the statistics software StatGraphics Centurion XV.II. Differences between treatments were analyzed by LSD multiple range test. The homogeneity of variance was verified by Bartlett test. The AMF colonization data were arcsin transformed. The correlation between biomass increase of *P. vetula* larvae and colonization of AMF was performed with the statistical software Sigma Plot 11.0.

The results showed that: 1) *P. vetula* herbivory reduced plant growth and nutrition, in addition to reducing the colonization of AMF; 2) AMF had an important role in improving plant performance and nutrition. Although the presence of AMF was related to lower density of *B. bassiana*, together these fungi interacted and decreased the negative effects of larval herbivory on the performance of maize; 3) *B. bassiana* improved performance of larva and caused less than 5% mortality. It was also associated with a higher percentage of AMF colonization; 4) the interaction between AMF and entomopathogenic fungi had a regulatory activity on herbivory by *P. vetula*.

In conclusion, combination of AMF (native and *R. irregularis*) and the entomopathogenic fungus *B. bassiana* synergistically counteracted the effects from root herbivory in terms of plant biomass and nutrition by *P. vetula* in maize.

# 1. INTRODUCCIÓN

El maíz es uno de los granos más importantes para la alimentación a nivel mundial (FAOSTAT, 2009). En México, es el principal cultivo al que se dedica el 80 % de los productores agrícolas y al que se destina la mayor superficie sembrada (36 % del total del área agrícola; SIAP-SAGARPA, 2009). Esta gramínea es de alto rendimiento, se usa para la alimentación humana y animal, así como en la transformación industrial y en la elaboración de productos medicinales y farmacéuticos (Paliwal *et al.*, 2001).

Las causas que generan pérdidas en la productividad del maíz son diversas, y los insectos fitófagos son considerados uno de los factores de estrés biótico más importantes. Se ha estimado que el 42 % de pérdidas en la producción de cultivos se debe al daño ocasionado por insectos plaga (Dehne y Oerke, 2004).

En las zonas tropicales y subtropicales, son de particular relevancia las especies del género *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae), una de las plagas más importantes del maíz a nivel de la raíz (Paliwal *et al.*, 2001). Los daños atribuibles a esta plaga en los cultivos de maíz han oscilado entre 0.4 y 1.3 toneladas por ha al año, lo cual representa entre el 15 y 50 % de la producción (Rodríguez-del Bosque, 1988).

La agricultura industrializada ha acudido al uso de agroquímicos para el manejo de plagas, sin embargo, su uso ha desencadenado problemas de contaminación de suelos y efectos adversos en la salud humana (Keith, 2001; Gómez-Arroyo *et al.*, 2011). Además, ha influido en el desarrollo de poblaciones de insectos resistentes a los plaguicidas (Oerke, 2006), lo que a su vez genera la reaparición de plagas y el aumento de las dosis utilizadas (Stoytcheva, 2011).

En este contexto, el control biológico representa una estrategia de manejo que permite mitigar el uso de agroquímicos y mantener la abundancia poblacional de los insectos por debajo de los niveles de daño económico. El control biológico emplea a los enemigos naturales, también conocidos como agentes de control biológico (depredadores, parásitos, parasitoides, patógenos y competidores) para reducir el impacto de los insectos fitófagos (Hajek, 2004).

En México, el manejo de gallina ciega y otros insectos del suelo, incluye prácticas culturales y físicas como la rotación y asociación de cultivos, manejo de suelo,

efecto de la fecha de siembra, adición de materia orgánica, restitución de biodiversidad, etc. En cuanto al control biológico, aún representa un reto la búsqueda de enemigos naturales capaces de multiplicarse y dispersarse para controlar las poblaciones de gallina ciega y que logren establecerse como parte de los ambientes locales (Rodríguez-del Bosque y Morón, 2010).

Aunque existen en el mercado productos hechos con agentes microbianos, principalmente los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisoplae* (Torres *et al.*, 2007), existe la necesidad de que la eficacia y confiabilidad de estos productos se sustente en el profundo conocimiento de las interacciones entre la planta, la plaga y el ambiente.

En este contexto, es importante que el control biológico adquiera un enfoque ecológico y para ello es relevante el estudio de las interacciones de las plagas con sus enemigos naturales y con otros organismos asociados, en que los organismos benéficos se vean como parte de una comunidad (Vega y Kaya, 2012). Esto permite conocer el impacto de la introducción de los agentes de control biológico (Ownley, 2010), además de aumentar la productividad y reducir los efectos no deseados sobre el ambiente (Campos-Herrera *et al.*, 2013).

Por ello, en el presente trabajo se evaluaron las interacciones entre el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, los hongos micorrízicos arbusculares (nativos y *R. irregularis*) y su efecto sobre el crecimiento del maíz en presencia de *Phyllophaga vetula*.

Los hongos entomopatógenos (HEP) han sido ampliamente utilizados como agentes de control biológico, ya que causan epizootias en los insectos, son antagonistas de fitopatógenos, inducen sistemas de defensa de las plantas y forman asociaciones benéficas en la rizósfera (Zimmermann, 2007). *Beauveria bassiana* (Clavicipitaceae, Hypocreales) es un HEP ampliamente usado en el desarrollo de bioinsecticidas contra plagas de artrópodos en ambientes agrícolas (De Faria y Wright, 2007). Diversos estudios han aislado cepas de *B. bassiana* a partir de larvas de *Phyllophaga* spp. y en ensayos de laboratorio han encontrado que estos aislados son capaces de infectar larvas sanas (Hernández-Velázquez *et al.*, 2011; Carrillo-Benitez *et al.*, 2013; Guzmán-Franco *et al.*, 2012).

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son importantes en el mantenimiento de la salud vegetal, dado que mejoran la transferencia de nutrientes del suelo a la planta, incrementan la resistencia a enfermedades, la tolerancia a la sequía y las defensas de la planta (Smith y Read, 2008). Sobre los herbívoros, los HMA tienen un efecto indirecto, ya que al inducir cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos en las plantas, modifican la calidad nutritiva de la planta y por tanto, el desempeño de los herbívoros (Bennett *et al.*, 2006; Vannette y Hunter, 2009; Currie *et al.*, 2011), pero la magnitud y dirección del efecto depende de la especie de HMA, así como del modo y tipo de alimentación del herbívoro (Koricheva *et al.*, 2009).

Entender los efectos de las interacciones entre estos microorganismos benéficos y *Phyllophaga* sp. sobre el maíz contribuirá al diseño y aplicación de estrategias integrales de control biológico.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Estudios sobre interacciones

#### 2.1.1 Herbivoría de las raíces

A pesar de la importancia de las raíces en el transporte de agua y nutrientes hacia la planta (Robinson *et al.*, 2003) y de la gran diversidad de organismos que se alimentan total o parcialmente de las raíces (Whittaker, 2003), la mayoría de investigaciones sobre herbivoría se han enfocado al estudio de las interacciones de los herbívoros con la parte aérea (Hunter, 2001; Blossey y Hunt-Joshi, 2003).

A niveles bajos o moderados, la herbivoría en las raíces puede inducir la defensa vegetal contra futuros ataques de herbívoros (Erb *et al.*, 2009; Van Dam, 2009) o microorganismos patógenos (Stout *et al.*, 2006). En cambio, niveles altos de herbivoría pueden ocasionar reducción en los rendimientos, floración, producción de semillas y biomasa vegetal y hasta ser mortales para las plantas (Blossey y Hunt-Joshi, 2003). En el suelo, la herbivoría modifica la actividad de la biota edáfica, procesos de descomposición y la producción de exudados de las raíces (Blossey y Hunt-Joshi, 2003).

Los herbívoros masticadores interrumpen las conexiones vasculares entre las raíces y la parte aérea de la planta, interrumpiendo el flujo de agua y nutrientes, lo que ocasiona cambios fisiológicos que repercuten en la absorción de nutrientes, almacenamiento de carbohidratos, síntesis de hormonas (Blossey y Hunt-Joshi, 2003) y producción de metabolitos secundarios (Kaplan *et al.*, 2008; Van Dam, 2009).

El nivel de daño que ocasionan los herbívoros depende de sus interacciones con factores bióticos y abióticos, así como de características propias de la planta, como son los niveles de tolerancia y resistencia de los genotipos. Por ejemplo, el maíz puede tolerar altos niveles de herbivoría cuando no hay condiciones de estrés hídrico o de nutrientes en el suelo (Blossey y Hunt-Joshi, 2003). En el mismo sentido, Erb y Lu (2013) proponen que bajo condiciones de estrés abiótico, el impacto negativo de la herbivoría se incrementa.



### 2.1.2 Herbívoros radiculares e interacciones bióticas

Los herbívoros de las raíces tienen una fuerte influencia en las poblaciones y comunidades de plantas, microorganismos y otros herbívoros (Johnson y Rasmann, 2015). Los HMA pueden afectar de manera positiva (Currie *et al.* 2006, 2011; Wamberg *et al.*, 2003; Kula *et al.*, 2005; Mueller *et al.*, 2005) o negativamente (Gange, 2001; Gange *et al.*, 2002; Wamberg *et al.*, 2003) a los herbívoros de las raíces, mientras que los herbívoros de las raíces pueden estimular (Currie *et al.*, 2006; Currie *et al.*, 2011) o no tener efecto (Gange, 2001) en la colonización de HMA. Esta variación podría explicarse por la edad de la planta (Wamberg *et al.* 2003), el grado de defoliación (Gange *et al.*, 2002), la especificidad del hongo (Barreto de Novais *et al.*, 2014) y el tiempo de la interacción de los HMA con los herbívoros (Currie *et al.*, 2006).

Un meta-análisis hecho por Koricheva *et al.* (2009) encontró que el grado y dirección del efecto que tienen los HMA sobre los herbívoros depende del modo de alimentación del insecto, del grado de herbivoría y de la identidad del hongo. No encontraron diferencias significativas en los efectos de las micorrizas sobre los herbívoros de las raíces y los de la parte foliar, lo que apoya la noción de que el efecto de las micorrizas es a nivel sistémico. También concluyen que para insectos masticadores, los HMA tienen un efecto negativo sobre insectos generalistas, y un efecto positivo sobre insectos especialistas. Los autores expresan que hacen falta estudios para conocer los mecanismos mediante los cuales interactúan los HMA y los insectos, pero que las defensas de las plantas inducidas por los HMA, podrían ser parte de la respuesta.

En otro meta-análisis más reciente, Hoeksema y colaboradores (2010), concluyeron que el efecto positivo de la inoculación de HMA se da principalmente en pastos C<sub>4</sub>, cuando la comunidad del suelo es compleja y cuando hay limitación de fósforo. Si la fertilización con nitrógeno y fósforo es suficiente, los beneficios de los HMA serán menores, ya que la planta reducirá la asignación de carbono a raíces y por tanto hacia los HMA (Hoeksema *et al.*, 2010).

Bennett *et al.* (2013) estudiaron las interacciones entre las larvas del gorgojo de la vid (*Otiorrhynchus sulcatus*) y el HMA *Glomus spp.*, en una hierba exótica *Plantago lanceolata*. Encontraron que mientras los HMA no tuvieron efecto sobre la biomasa de

la planta, las larvas redujeron el peso de las raíces en un 64 %. En tanto que la herbivoría redujo el grado de colonización de *Glomus* en un 61 %.

Los estudios de las interacciones de los herbívoros con hongos entomopatógenos (HEP) se enfocan en encontrar cepas específicas (Hidalgo, 2001; Ocampo-Hernández *et al.*, 2011; Guzmán-Franco *et al.*, 2012; Carrillo-Benítez *et al.*, 2013) y de gran virulencia (Ortiz-Urquiza, 2010; Wraight *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2012) para que estos microorganismos puedan ser usados como agentes de control biológico. Los géneros de mayor estudio son *Beauveria* y *Metarhizium*. En el trabajo de Carrillo-Benítez y colaboradores (2013) obtuvieron 17 aislados de *Beauveria spp.* y dos de *Metarhizium spp.* y todas fueron capaces de infectar larvas de *Phyllophaga polyphylla*, pero nunca causaron más del 50 % de mortalidad.

En otro trabajo de Guzmán-Franco *et al.* (2012) encontraron que la susceptibilidad de *Phyllophaga polyphylla* y *Anomala cincta* depende de la especificidad del aislado de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, así como de las características del suelo, como es su composición orgánica. Suponen que *P. polyphylla* desarrolló un tipo de inmunidad hacia los HEP y sugieren que este mecanismo debe ser estudiado.

### 2.1.3 Interacción planta-microorganismos

Las interacciones entre los microorganismos del suelo y las raíces de las plantas satisfacen requerimientos nutritivos básicos para la planta y para las comunidades microbianas asociadas a ellas. Estas interacciones influyen en procesos como la síntesis de compuestos orgánicos y de factores de crecimiento vegetales, captura de minerales y solubilización de nutrientes (Ronald, 2002).

Las interacciones entre los HMA y las plantas han sido ampliamente documentadas (Smith y Read, 2008). Establecen el intercambio activo de nutrientes (carbono-fósforo principalmente) y se favorecen aquellas relaciones donde la obtención de fósforo sea mayor con la menor inversión de carbono (Kiers *et al.*, 2011). Los efectos no siempre son positivos para la planta, puesto que influyen las interacciones con otros microorganismos del suelo (Gehring y Bennett, 2009; Singh *et al.*, 2014). Aunque en algunos trabajos se ha señalado que los HMA pueden llegar a ser parásitos de las

plantas, Smith y Smith (2011) señalan que el daño en las plantas ante la presencia de HMA depende del genotipo de la planta, condiciones ambientales e interacciones en sus comunidades, ya que el intercambio P-C entre el hongo y la planta es un proceso constante.

No está claro si existen relaciones mutualistas entre HEP y las plantas, sin embargo, se supone que debe existir algún tipo de interacción, ya que se ha encontrado que una gran diversidad de organismos saprobios usan los exudados de las plantas y es posible que los HEP en su fase saprófita utilicen el carbono disponible en el suelo en ausencia del hospedero (Jonhson y Rasmann, 2015). Vega (2009) señala que los HEP forman asociaciones benéficas en la rizósfera y como endófitos contribuyen a la protección de la planta contra plagas y enfermedades (Ownley *et al.*, 2008; Vega, 2008). Por su parte, las plantas pueden influir en la persistencia e infectividad de los HEP (Zimmermann, 2007).

#### 2.1.4 Interacciones multitróficas

Diversos autores señalan la importancia de estudiar las interacciones en la complejidad de sus comunidades y redes de interacciones (Gange, 2007; Gehring y Bennett, 2009). Sin embargo, este tipo de estudios aún es escaso, en particular considerando las interacciones por debajo de la superficie del suelo. Por ejemplo, Bennett *et al.* (2006) realizaron una revisión de las interacciones entre HMA, plantas y maleza. Encontraron que los efectos de los hongos micorrízicos pueden beneficiar tanto a las plantas como a las malezas, pero el efecto positivo o negativo depende de las interacciones multitróficas.

Otros acercamientos al este enfoque multitrófico incluyen el trabajo de Krauss *et al.* (2004) en el que concluyeron que los HEP (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces fumosoroseus*) y los micoparásitos (*Clonostachys* spp., *Trichoderma harzianum* y *Lecanicillium lecanii*) son compatibles como medida de control biológico para el picudo del plátano (*Cosmopolites sordidus*), para el barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*) y para el gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae*), siempre y cuando se tenga en cuenta las concentraciones de los inóculos.

Senthilraja *et al.* (2010) realizaron un estudio bajo condiciones de invernadero y de campo, en donde inocularon 20 aislados de *B. bassiana* y dos cepas de *Pseudomonas fluorescens*. Individualmente y en combinación para suprimir el efecto del minador de hojas *Aproaerema modicella*. Encontraron que juntos disminuyen el efecto negativo de la larva, además, obtuvieron mayor geminación y producción de las plantas *Arachis hypogaea* (cacahuate) en comparación con los tratamientos con pesticidas químicos.

Mantzoukas y colaboradores (2013) estudiaron las interacciones entre hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium robertsii*) y la bacteria *Bacillus thuringiensis* y sus efectos sobre la mortalidad de las larvas de *Sesamia nonagriodes*. Después de 16 días del experimento, observaron que el efecto de ambos grupos de hongos fue sinérgico.

Igualmente, Shrivastava *et al.* (2015) trabajaron con plantas de tomate inoculadas con el HMA *Rhizophagus intrarradices* y el entomopatógeno *Beauveria bassiana* y encontraron que individualmente o en combinación mejoraron los niveles de compuestos asociados a la defensa vegetal contra el herbívoro foliar *Spodoptera exigua*.

### 3. HIPÓTESIS

La interacción entre el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y hongos micorrízicos arbusculares potenciará el control biológico del insecto fitófago *Phyllophaga vetula* y mejorará la salud vegetal del maíz.

### 4. OBJETIVOS

#### *General*

Determinar el papel que tiene la interacción entre *Beauveria bassiana* y HMA (*Rhizophagus irregularis* y nativos) en el control biológico de larvas del tercer estadio de *Phyllophaga vetula* en maíz bajo condiciones de invernadero.

#### *Particulares*

1. Determinar el efecto de la herbivoría de *P. vetula* sobre el crecimiento de plantas de maíz en presencia y ausencia de los microorganismos rizosféricos nativos, así como evaluar el desarrollo en biomasa de *P. vetula* bajo estas condiciones.
2. Evaluar el efecto rizófago de *P. vetula* sobre el crecimiento y desarrollo del maíz, en presencia y ausencia de *B. bassiana*.
3. Determinar la influencia sobre la salud y desarrollo del maíz que ejercen los HMA en presencia y ausencia de *P. vetula*.
4. Evaluar si existen interacciones entre *B. bassiana* y microorganismos rizosféricos en plántulas de maíz bajo condiciones de invernadero.
5. Evaluar si existe interacción entre HMA (nativos e inoculados) y *B. bassiana* y sus efectos sobre la planta.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Especies de estudio

#### 5.1.1 Maíz y *Phyllophaga* spp.

El maíz, *Zea mays* L., pertenece a la familia Poaceae (gramíneas). Es una planta monoica, anual, con metabolismo C<sub>4</sub> y alta tasa fotosintética. Esta planta se originó y evolucionó en la zona neotropical, aunque actualmente es cultivada en distintos ambientes a nivel global (Paliwal *et al.*, 2001).

Por su importancia económica, entre las plagas subterráneas y del sistema radicular destacan los gusanos de alambre (*Melanotus* spp., *Agriotes* spp., *Dalopius* spp., *Eleodes* spp.), gusanos cortadores (*Agrotis* spp., *Peridroma saucia*, *Chorizagrotis auxiliaris*, *Feltia subgothica*), gusanos de las raíces (*Diabrotica* spp.) y los gusanos blancos (*Phyllophaga* spp. y *Cyclocephala* spp.; Paliwal *et al.* 2001).

El género *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae) presenta una amplia abundancia, diversidad, y distribución (Rodríguez del Bosque y Morón, 2010). La estructura y composición de sus comunidades cambian en función de la localidad debido a las características edáficas, climáticas y de manejo del sitio (Morón, 2010).

Las larvas de este género tienen hábitos subterráneos y se alimentan de las raíces, pueden consumir de 45 a 80 veces su peso en raíces o en materia orgánica para completar su desarrollo (Morón, 2001). Su actividad provoca marchitamiento, clorosis y hasta la muerte de las plantas (Hidalgo, 2001). Su manejo presenta dificultades, ya que al ser de hábitos edáficos no se pueden observar fácilmente hasta que ya es evidente el daño (Rodríguez del Bosque y Morón, 2010).

La mayor parte de las especies de *Phyllophaga* de importancia agrícola en México tienen un ciclo de vida anual. Los adultos emergen entre mayo y junio, al inicio de la temporada de lluvias; el apareamiento y depósito de los huevos sucede a inicios de verano y después de 2-4 semanas eclosionan. Durante un periodo de 30 y 40 días las larvas están en el primer y segundo estadio, respectivamente. El tercer estadio, durante el cual las larvas son más voraces, con una duración entre 104 a 142 días, abarca desde mediados de verano hasta mediados de la primavera siguiente. Finalmente, el estado de

pupa tiene una duración de 15-30 días. Los imagos permanecen en su celda pupal hasta que existen las condiciones adecuadas de humedad del suelo para emerger (Morón, 1986).

Los adultos de *Phyllophaga* son depredados por mamíferos, aves, reptiles y anfibios. En su estado larvario pueden ser parasitados por himenópteros, o infectados por nemátodos, protozoarios y hongos entomopatógenos (Nájera-Rincón, 2005).



Figura 1. Ciclo de vida de *Phyllophaga vetula*, la duración de cada estadio y la temporada correspondiente a cada uno (Aragón *et al.*, 2005).

### 5.1.2 Hongos entomopatógenos: *Beauveria bassiana*

Los hongos entomopatógenos (HEP) son un grupo compuesto por más de 700 especies, la mayoría pertenecen a las divisiones Ascomycota y Zygomycota (Khachatourians y Sohail, 2008), algunos presentan un alto grado de especialización en el parasitismo y otros son facultativos (Herrera y Ullua, 2004). Causan epizootias en los insectos principalmente en estados inmaduros (ninfa o larva). También son saprófitos, su crecimiento requiere de compuestos orgánicos que absorben desde los sustratos sobre

los cuales viven. Pueden ser específicos o tener una amplia gama de hospederos (De Faria y Wraight, 2007).

Adicionalmente, los HEP pueden tener varios tipos de interacciones indirectas con las plantas, con resultados benéficos para estas. En particular, las HEP pueden ser antagonistas de fitopatógenos, formar asociaciones benéficas en la rizósfera, inducir el sistema de defensas y promover el crecimiento de las plantas hospederas (Brimner y Boland, 2003; Owley, 2008; Vega *et al.*, 2009) y pueden asociarse como endófitos (Vega *et al.*, 2009).

Su ciclo de vida inicia cuando una espора se adhiere a la cutícula del insecto; bajo condiciones óptimas de temperatura y humedad la espора germina y produce un tubo germinativo que penetra hasta el hemocele, en la hemolinfa el hongo comienza la colonización. Durante este periodo, el insecto pierde motilidad y apetito debido a la producción de sustancias tóxicas y a la afectación mecánica de sus tejidos mediante el crecimiento de las hifas (Tefera y Pringle, 2003); tras siete a diez días el insecto muere y comienza la fase saprófita. Cuando hay condiciones de alta humedad y temperaturas adecuadas, aún en ausencia del insecto, el micelio puede germinar y formar conidios, lo que le permite su propagación (Zimmermann, 2007).

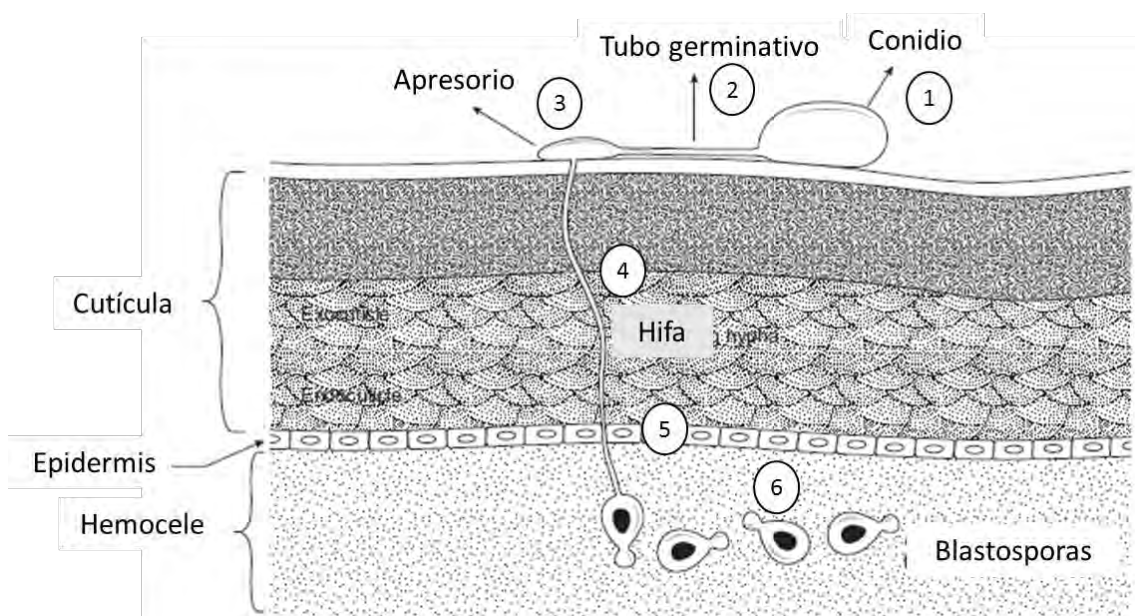


Figura 2. Proceso de infección de los hongos entomopatógenos sobre el insecto. 1) Adhesión del conidio sobre la cutícula del insecto, 2) Germinación, 3) Formación del apresorio, 4) Penetración de la hifa, 5) Invasión de la epidermis, 6) Proliferación de blastosporas dentro de la hemolinfa e invasión de las hifas en los tejidos del insecto, con la consecuente muerte del insecto. Tomado de Vega y Kaya (2012).



La persistencia de las esporas dentro del suelo depende de su viabilidad y de las interacciones con microorganismos del suelo. Su movilidad dentro del suelo se debe principalmente a los flujos del agua y artrópodos, pero también a las propiedades del suelo como la porosidad (Zimmermann, 2007).

Como agentes de control biológico los HEP deben ser específicos y ser capaces de reproducirse de forma continua. Sin embargo, su aplicación presenta algunas limitaciones, ya que son sensibles a las variaciones de las condiciones climáticas (Kessler *et al.*, 2003) y requieren condiciones de almacenamiento estrictas para que no pierdan patogenicidad (Nicholls, 2008). Actualmente hay un amplio mercado de micoinsecticidas hechos con HEP (De Faria y Wraight, 2007).

Los géneros más estudiados son *Beauveria* y *Metarhizium*. *Beauveria* puede ser parásito de alrededor de 707 especies de insectos y es seguro como agente de control biológico (Zimmermann, 2007). Específicamente, *Beauveria bassiana* (Clavicipitaceae, Hypocreales) es ampliamente usado debido a que infecta a una gran cantidad de especies del complejo gallina ciega (Hernández-Velázquez *et al.*, 2011). Debido a su amplia gama de hospederos, es importante la selección de aislados y consideración de factores espacio-temporales para reducir el riesgo de infección de otros organismos (Vestergaard *et al.*, 2003).

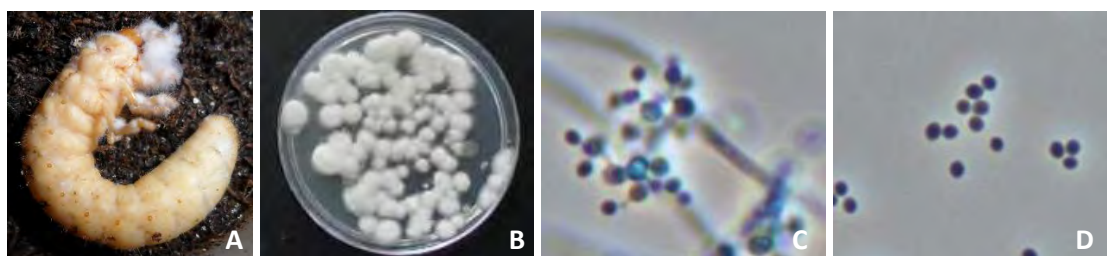


Figura 3. El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (A) sobre una larva infectada, (B) creciendo en medio de cultivo sólido PDA y (C y D) células conidiógenas.

### 5.1.3 Hongos micorrízicos arbusculares

Las asociaciones micorrízicas han existido desde hace al menos 460 millones de años, cuando surgió la flora terrestre (Redecker *et al.*, 2000) y están asociadas a alrededor del 90 % de las plantas vasculares (Smith y Read, 2008). Basado en la estructura y función, existen cuatro tipos principales de micorrizas: arbusculares, ectomicorrizas, orquidoides y ericoides. Las más comunes, por el número de especies que colonizan son las arbusculares, con alrededor de 200 especies (colonizan el 74 % de todas las plantas como hierbas, pastos, árboles y hepáticas) (van der Heijden *et al.*, 2015).

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) pertenecen a la división Glomeromycota y son endomicorrizas biotróficos que se caracterizan por la presencia de dos estructuras: vesículas y arbusculos. Las vesículas son expansiones de las hifas que crecen entre las células vegetales y son estructuras de almacenamiento de lípidos. Los arbusculos, son hifas finas ramificadas que rodean a la membrana celular y funcionan como sitio de intercambio metabólico entre la planta y la micorriza (Smith y Read, 2008).

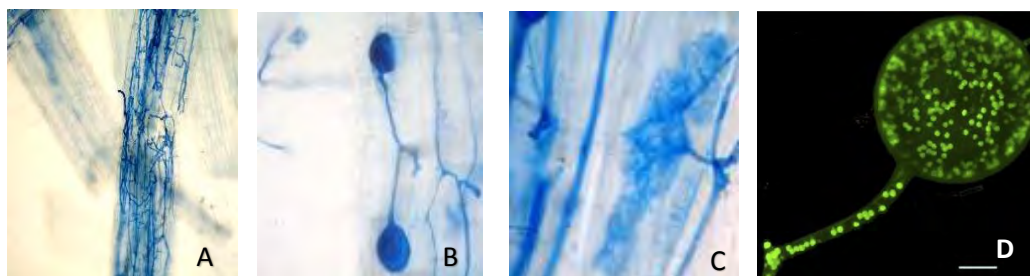


Figura 4. Estructuras de hongos micorrízicos arbusculares en raíces de maíz (A) Hifas (Aumento 200x) (B) Vesículas (Aumento 2000x), (C) Arbusculos dentro de las células corticales (Aumento 2000x) y (D) Espora asexual multinucleada (Escala de la línea 10  $\mu$ m). Tomado de López-Carmona (2013) y Tisserant *et al.* (2013).

Los HMA son importantes en procesos ecológicos y agrícolas, como en el ciclo de nutrientes, el rendimiento de cultivos, la formación de agregados en el suelo y la estructura de comunidad de las plantas (Smith y Read, 2008). En el desarrollo de las plantas, sus funciones incluyen la transferencia de nutrientes del suelo, principalmente fósforo (Smith y Read 2008), el incremento de resistencia a enfermedades (Whipps, 2004, Pozo *et al.*, 2002) y plagas (Guerrieri *et al.*, 2004), la tolerancia a la sequía (Ruíz-

Lozano *et al.*, 1995) y el aumento de la defensa vegetal mediante la inducción en la producción de metabolitos (Bennett *et al.*, 2006; Bennett *et al.*, 2009), además de mejorar la adecuación de las plantas debido a que les confieren protección contra antagonistas (Vannette *et al.*, 2012).

Los HMA son biótrofos obligados, su ciclo de vida incluye dos fases: pre-simbiótica y simbiótica. A partir de propágulos presentes en el suelo, esporas sexuales o raíces micorrizadas, crecen hifas que se unen a las raíces mediante apresorios y que penetran el córtex. Posteriormente, en la fase simbiótica, estructuras especializadas (hifas intra e intercelulares, arbuscúlos y vesículas) establecen el intercambio activo de nutrientes. Después de la colonización, el micelio del hongo se expande fuera de las raíces en búsqueda de nutrientes o para colonizar otras raíces y finalmente formar clamidosporas asexuales en el micelio externo, que germinan cuando existen condiciones adecuadas de humedad y temperatura (Requena *et al.*, 2007).

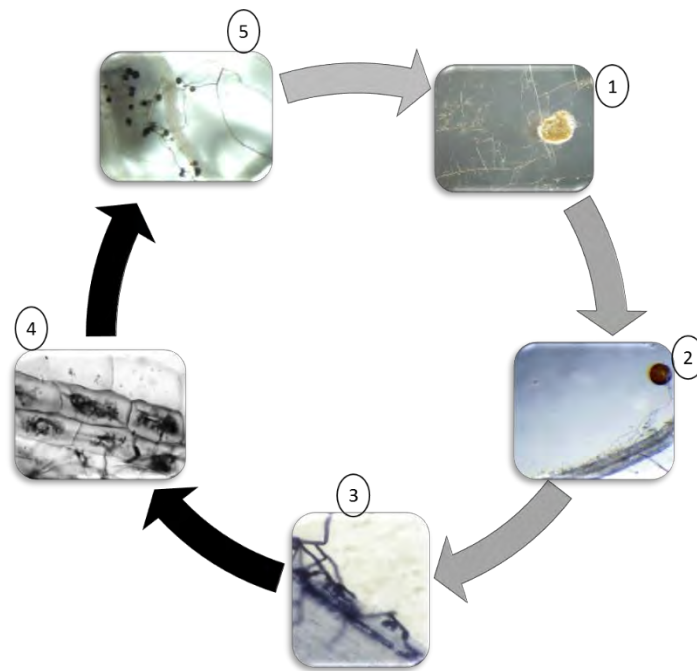


Figura 5. Ciclo de vida de hongos micorrízicos arbusculares. 1) Germinación de la espora (fase asimbiótica), 2) Reconocimiento del hospedero (fase pre-simbiótica), 3) Formación del apresorio en la epidermis de la raíz, 4) Arbuscúlos dentro de las células del córtex (fase simbiótica) y 5) Micelio extrarradical y formación de nuevas esporas. Tomado de Requena *et al.*, 2007.

## 5.2 Diseño experimental

Se realizaron cinco experimentos de tipo factorial, cuyos tratamientos estuvieron distribuidos en un diseño experimental completamente al azar, en macetas con capacidad de 1 L en un invernadero (cuadro 1). Los primeros tres experimentos fueron exploratorios y en los experimentos 4 y 5 se analizaron todas las interacciones entre los hongos (*B. bassiana* y HMA), *P. vetula* y maíz, con la particularidad de que en el cuarto experimento se añadieron HMA nativos y en el experimento 5 el inóculo *R. irregularis*.

Cuadro 1. Diseño experimental

Experimento	Factores: niveles	Número de tratamientos	Repeticiones por tratamiento	Total de Unidades experimentales
1	<i>P. vetula</i> : sin y con; Suelo: estéril y no estéril	4	8	32
2	<i>P. vetula</i> : sin y con; Inoculación de hongos: <i>B. bassiana</i> , <i>R. irregularis</i> y ninguno.	6	8	48
3	Suelo: estéril y no estéril; <i>B. bassiana</i> : sin y con; Rastrojo de maíz; sin y con.	8	4	96
4	<i>P. vetula</i> : sin y con; HMA nativos: sin y con; <i>B. bassiana</i> : sin y con	8	5	40
5	<i>P. vetula</i> : sin y con; <i>R. irregularis</i> : sin y con; <i>B. bassiana</i> : sin y con	8	8	64

## 5.3 Colecta de *Phyllophaga vetula*

Durante la temporada de lluvias se colectaron larvas del tercer estadio de *Phyllophaga* spp. en cultivos de maíz en el Ejido de Cantabria (Zacapu, Michoacán). Las larvas fueron almacenadas individualmente en contenedores con turba y alimentadas con zanahoria durante 40 días. Se seleccionaron aquellas larvas que no presentaban síntomas de enfermedad y se identificaron con base en las claves dicotómicas de Richter (1966), Morón (1983), Aragón y Morón (2004). Se eligió a los especímenes identificados como *P. vetula* (Horn) dado que es la especie más abundante y la plaga más importante en la Ciénega de Zacapu (Nájera-Rincón *et al.*, 2003).

## 5.4 Inoculación de microorganismos

La inoculación de los microorganismos se llevó a cabo antes de la siembra, en suelo esterilizado y seco, lo cual permitió mezclar homogéneamente los componentes.

*B. bassiana* se obtuvo a partir de un producto comercial (Bea-sin, Agrobionsa), con una presentación en polvo y se colocó en el sustrato con una concentración inicial de  $1 \times 10^7$  esporas por gramo de suelo seco, cantidad que se ha demostrado ser efectiva para infectar y matar insectos (Senthilraja *et al.*, 2015). Previo a la inoculación se realizaron pruebas de viabilidad y germinación, que resultaron ser mayores al 83 %.

La cepa BEG87 de *Rhizophagus irregularis*, se inoculó al 10% del peso seco del sustrato por maceta en los experimentos 2 y 5. Este inóculo fue proporcionado por el Laboratorio de Agroecología del Centro de Investigaciones en Ecosistemas-UNAM, el cual se obtuvo a partir de macetas con maíz como planta trampa, inoculadas con raíces colonizadas por la cepa en condiciones de esterilidad en un invernadero. Las plantas de maíz se dejaron crecer durante tres meses y posteriormente se cosecharon las raíces y se verificó el porcentaje de colonización con HMA.

En el caso de los HMA nativos, en los experimentos 1 y 3 no se esterilizó el suelo, de tal manera que permanecieran los HMA nativos, así como los microorganismos del suelo. En el cuarto experimento, todas las macetas tenían 10 % del sustrato con suelo no estéril, y sólo en los tratamientos sin HMA, el sustrato se diluyó en 200 mL de agua estéril y se filtró con una malla de 20 y 40  $\mu\text{m}$  de apertura de poro, con lo que se permitió la filtración de microorganismos nativos del suelo, pero se evitó la inoculación de esporas de HMA.

## 5.5 Siembra y fertilización

Se sembró la variedad de maíz híbrido DK-2042 en macetas de 1 L. El sustrato consistió en una mezcla de arena de río y suelo arcilloso en proporción 1:1. El suelo fue extraído del campo de maíz del Centro Regional Universitario Centro Occidente (CRUCO) de la Universidad Autónoma Chapingo (anexo 1).

Antes de la siembra se aplicaron los siguientes fertilizantes minerales al sustrato de manera básica (con excepción de fósforo para promover el crecimiento de los HMA): sulfato de potasio (25 g/L), cloruro de calcio dihidratado (25 g/L), micronutrientes

(sulfato de cobre, sulfato de zinc, sulfato de manganeso, sulfato de cobalto, sulfato de magnesio, molibdato de sodio). Dos semanas después de la siembra se empezó la aplicación semanal de 30 mg de N como  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  por maceta, con un total de 150 mg de N. Las macetas se mantuvieron con un riego diario al 80% de capacidad de campo dentro de un invernadero.

Sólo en el experimento 3 se adicionó rastrojo de maíz estéril al 0.05% de la masa del sustrato.

## **5.6 Cosecha**

Los experimentos 1 y 2 tuvieron una duración de seis semanas y a la tercera semana se colocaron una y dos larvas de *P. vetula* del tercer estadio por maceta, respectivamente. El experimento 3 estuvo subdividido en tres grupos (cada uno con ocho tratamientos) los cuales se cosecharon a la segunda, cuarta y octava semana. En el cuarto experimento se colocaron 2 larvas a la tercera semana después de la siembra y se cosechó en la séptima semana. En el último experimento, se colocaron tres larvas por maceta, y a la séptima semana se cosechó (anexo 2).

## **5.7 Determinación de biomasa y mortalidad de *P. vetula***

Previamente a su colocación en las macetas las larvas se pesaron las larvas con una balanza analítica (Marca Ohalis, modelo Adventurer Pro AV213). Al final del experimento, se determinó la ganancia de biomasa por diferencia de pesos. Cuando se aplicaron tres larvas por maceta, se promedió la biomasa de las larvas.

Una vez realizada la cosecha y pesadas las larvas, éstas se guardaron nuevamente en contenedores y se observaron periódicamente para detectar algún síntoma de infección por *B. bassiana* y calcular el porcentaje de mortalidad, la cual fue expresada en términos de porcentaje.

## **5.8 Densidad de *Beauveria bassiana* en el suelo**

Se pesaron 4 g de suelo y se diluyeron en 36 mL de agua estéril, la muestra se agitó por un lapso de 2 minutos y se tomó una alícuota de 1 mL que fue transferida a otro tubo

Falcon con capacidad de 10 mL. En cada tubo se agregaron previamente 9 mL de agua destilada, con el objetivo de efectuar diluciones seriadas ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ) al pasar 1 mL de la suspensión a 9 mL de agua destilada. Una vez hechas la diluciones, en cámara de flujo laminar se sembraron 100  $\mu$ L de esta suspensión en una caja Petri con medio de cultivo semiselectivo para *B. bassiana*. La siembra de cada dilución se realizó por duplicado y las muestras se incubaron durante nueve días en oscuridad a 26 °C y se procedió a contar el número de colonias que se expresaron en UFCg<sup>-1</sup> de suelo seco. La humedad del suelo se determinó mediante la diferencia de pesos antes y después de un secado del sustrato en horno durante 72 horas a 80 °C (Kessler *et al.*, 2003).

### **5.9 Colonización de HMA en raíces**

El primer paso para determinar la colonización de HMA fue la tinción de las raíces. El procedimiento utilizado es una modificación de la técnica de Phillips y Hayman (1970) y consistió en aclarar 2 g de raíces con una solución de KOH al 10% en baño María por 20 minutos a 90 °C, posteriormente las muestras fueron colocadas en peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por 20 minutos a temperatura ambiente y finalmente se tiñeron en azul tripano al 0.05% por 5 minutos a 90° C en baño María. Las raíces teñidas se almacenaron en frascos de plástico con glicerol.

El conteo de vesículas y arbuscúlos en el córtex de la raíz se realizó por el método de línea-intercepto (Giovannetti y Mosse, 1980) basado en la presencia-ausencia de estructuras micorrízicas en el córtex de las raíces que interceptan sobre las líneas de una cuadrícula (1x1 cm) dibujada en la caja Petri, en la cual se coloca la muestra. Se utilizó un microscopio estereoscópico (Marca Olympus SZX7, modelo Micros-AmScope) con aumento 40x.

### **5.10 Determinación de nitrógeno y fósforo total en el tejido vegetal**

Previo al análisis, las muestras de la parte foliar y radical se secaron a 70 °C por 48 h. Se molieron y tamizaron con una malla de 2 mm.

La determinación de N y P total se realizó en dos etapas: la digestión de la muestra y la cuantificación del nutrimento en el extracto digerido. Ambos métodos se basan en una técnica colorimétrica donde el nitrógeno total (Nt) y fósforo total (Pt) son leídos colorimétricamente a 660 nm en el autoanalizador Braun+Luebbe III.

La determinación de N total se realizó por el método de semi-Kjendahl, durante la digestión ácida, las formas orgánicas de N se transforman en amonio, el cual reacciona con el complejo nitropruciato-salicilato, formándose un complejo de color verde (Bremmer, 1996).

La determinación de P total se realizó por la reducción con ácido ascórbico para la formación del complejo fosfomolibdeno de color azul (Murphy y Riley, 1962).

### 5.11 Análisis estadístico

Las variables de respuesta medidas se muestran en el cuadro 2. Se realizaron análisis de varianza factoriales de 2 y 3 vías, con un nivel de significancia de 0.05, con el programa StatGraphics Centurion XV.II. Las diferencias entre los tratamientos fueron analizados por la prueba LSD de múltiples rangos. La homogeneidad de varianza fue verificada mediante la prueba de Bartlett. Los datos de colonización de HMA fueron transformados mediante la función arcoseno. La correlación (Pearson) entre el aumento de biomasa de la larva y la colonización de HMA fue realizada con el programa estadístico Sigma Plot 11.0.

Cuadro 2. Variables de respuesta para cada uno de los experimentos realizados. PSPR/PSPA es la relación entre peso seco parte radical/ parte aérea.

Variables	Experimento				
	1	2	3	4	5
<b><i>Zea mays</i></b>					
Peso seco parte aérea (g)	✓	✓	✓	✓	✓
Peso seco parte radical (g)	✓	✓	✓	✓	✓
Peso seco total (g)	✓	✓	✓	✓	✓
PSPR/PSPA	✓	✓	✓	✓	✓
Concentración de N en hojas y raíces (mg/g)				✓	
Concentración de P en hojas y raíces (mg/g)				✓	
<b><i>P. vetula</i></b>					
Ganancia de biomasa (g)	✓	✓		✓	✓
Larvas infectadas (%)	✓	✓		✓	✓
<b><i>B. bassiana</i></b>					
Densidad en suelo (esporas g <sup>-1</sup> suelo)			✓	✓	✓
<b>HMA</b>					
Colonización (%)	✓	✓	✓	✓	✓



## 6. RESULTADOS

### 6.1 Experimento 1: Interacción *Phyllophaga vetula* y plantas de maíz

En este experimento se determinó el efecto de la herbivoría de *Phyllophaga vetula* sobre el crecimiento de plantas de maíz en presencia y ausencia de microorganismos rizosféricos nativos. Mediante el análisis de varianza (Cuadro 3), se observó que los microorganismos rizosféricos tuvieron efectos sobre las variables de biomasa vegetal, principalmente para la parte radical, mientras que el efecto de la herbivoría de *P. vetula* fue más marcada en la parte aérea de las plantas de maíz, aunque el valor de *p* cercano al valor de significancia (0.06) señala que el efecto de la herbivoría también fue importante en las raíces.

Cuadro 3. Valores de probabilidad (*p*) asociados a los análisis de varianza (ANOVA) para determinar los efectos de *P. vetula* y el suelo sobre las variables de respuesta: peso seco parte radicular (PSPR), peso seco parte aérea (PSPA), peso seco total (PST), la relación PSPR/PSPA, biomasa de larvas y cobertura de HMA.

Factores	PSPR (g)	PSPA (g)	PST (g)	PSPR/PSPA	Biomasa larvas (g)	% HMA
<i>P. vetula</i>	0.06	*	*	0.822	-	0.054
Suelo	***	0.146	***	***	0.699	-
<i>P. vetula</i> x Suelo	0.201	0.67	0.432	0.246	-	-

\*  $p \leq 0.05$ , \*\*\*  $p \leq 0.01$

Después de seis semanas de crecimiento de las plantas, en cuanto a la presencia/ausencia de microorganismos rizosféricos (suelo no esterilizado/suelo esterilizado, respectivamente) se observó que en ausencia de microorganismos de la rizósfera, la biomasa vegetal de la raíz fue mayor, no así, en la parte aérea, donde estas diferencias no fueron significativas (Fig. 6). Esto concuerda con los resultados obtenidos para la variable PSPR/PSPA (peso seco parte radical/peso seco parte aérea) (fig. 6d), en donde la asignación de recursos al crecimiento de raíces es mayor en comparación con los tratamientos con microorganismos.

En suelo esterilizado, la herbivoría de una larva de *P. vetula* por maceta disminuyó la biomasa vegetal en la parte radical de la planta. Cabe decir, que la herbivoría de la larva tiene un efecto semejante sobre la biomasa vegetal de las raíces y de la parte aérea en todos los tratamientos, aunque dichas diferencias no fueron

significativas (Fig. 6). Si bien la herviboría tiene efectos sobre la biomasa vegetal, no se observó que haya influido en la asignación de recursos en la parte aérea y radical de la planta (Fig. 6d).

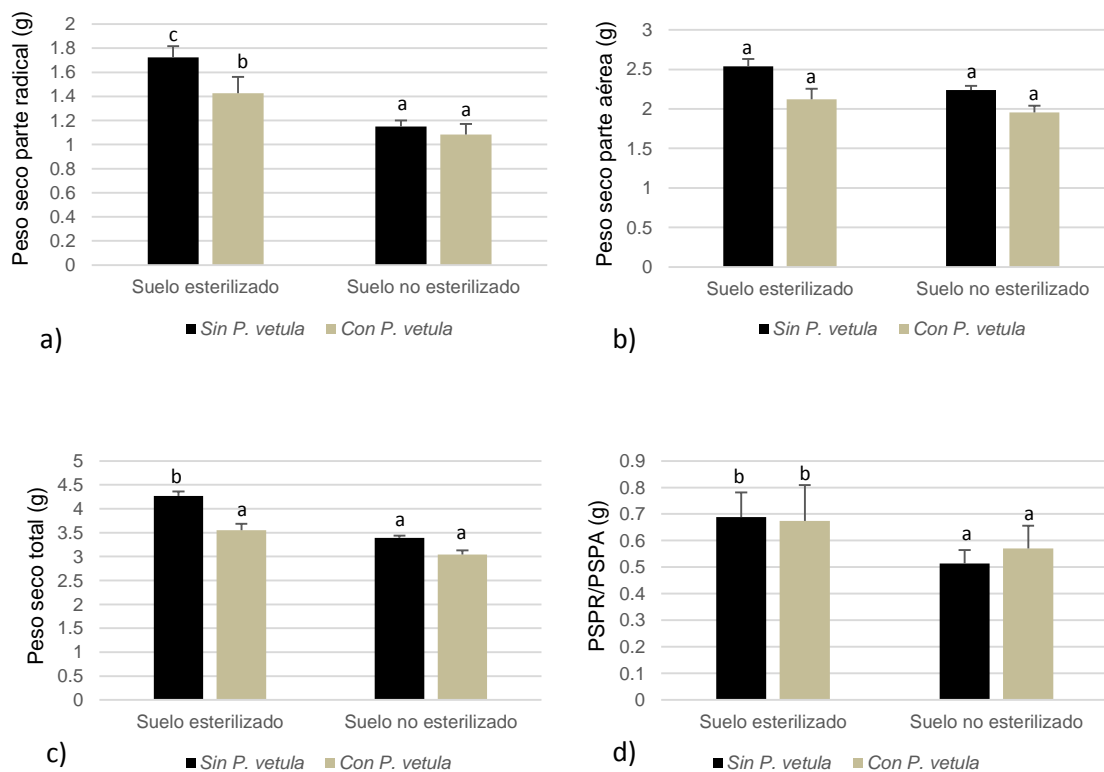


Figura 6. Peso seco de plantas de maíz con presencia y ausencia de *P. vetula*. Parte radical (PSPR) (a), parte aérea (PSPA) (b), total (PST) (c) y la relación PSPR/PSPA (d), analizados con la prueba LSD de múltiples rangos ( $p < 0.05$ ), donde las letras hacen referencia a diferencias significativas y las barras representan el error estándar.

Aunque la ganancia de biomasa en *P. vetula* no registró diferencias significativas en los tratamientos con suelo esterilizado y no esterilizado, como se muestra en la figura 7, es ligeramente mayor en los tratamientos con microorganismos rizosféricos.

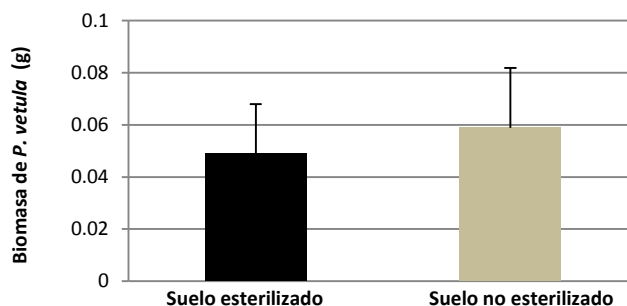


Figura 7. Biomasa fresca de larvas de *P. vetula* alimentadas con raíces de maíz en suelo estéril o suelo no-estéril (n=8) analizados con la prueba LSD de múltiples rangos ( $p < 0.05$ ). Las barras representan el error estándar.

En presencia de *P. vetula* la colonización de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) fue menor: en ausencia de larvas la colonización por hongos micorrízicos fue 54 %, y en presencia del herbívoro fue de 43 % (Fig. 8).

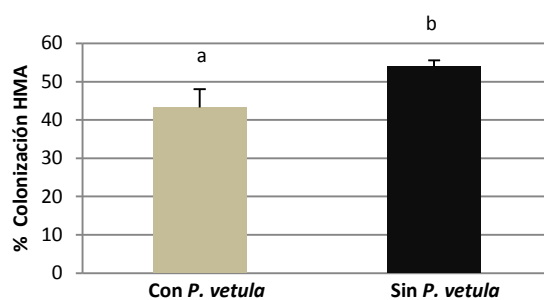


Figura 8. Promedio de la colonización total (%) por hongos micorrízicos arbusculares en suelo no estéril en presencia y ausencia de *P. vetula*. Analizados con la prueba LSD de múltiples rangos ( $p < 0.05$ ), donde las letras hacen referencia a diferencias significativas y las barras representan el error estándar.

La figura 9 muestra una correlación negativa entre la ganancia de biomasa de *P. vetula* y la colonización de HMA, en suelo no estéril. Esto es, cuando el aumento de biomasa de las larvas es mayor, el porcentaje de colonización de HMA nativos es menor.

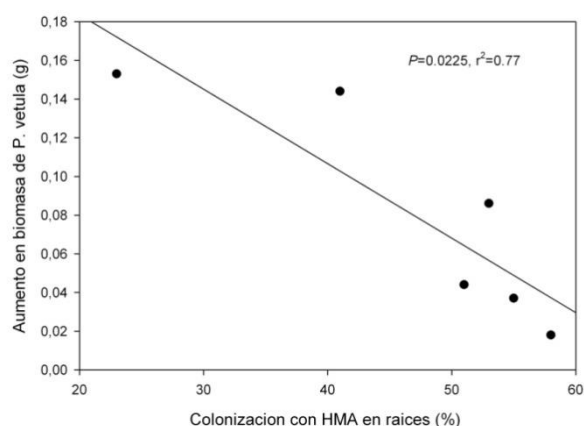


Figura 9 Correlación entre colonización total con HMA y biomasa de *P. vetula* en suelo no estéril. Analizados con la prueba LSD de múltiples rangos ( $p < 0.05$ ), donde las letras hacen referencia a diferencias significativas y las barras representan el error estándar.

## 6.2 Experimento 2: Interacciones maíz-*P. vetula*-hongos (*B. bassiana* o *R. irregularis*)

El experimento 2 tuvo el objetivo de estudiar las interacciones planta-herbívoro-hongo mediante un diseño factorial fraccionado, de tal manera que no se incluyó la interacción del hongo entomopatógeno con el micorrízico. Para ello todos los tratamientos tuvieron suelo esterilizado y fueron inoculados los tratamientos correspondientes con el HMA *R. irregularis* o con el hongo entomopatógeno *B. bassiana*. Los análisis de varianza indicaron que *R. irregularis* y *B. bassiana* fueron los factores que determinaron el peso seco de las plantas, siendo menor en presencia de los inóculos (Cuadro 4 y Fig. 10).

Cuadro 4 Valores de probabilidad ( $p$ ) asociados a los análisis de varianza (ANOVA) para determinar los efectos de *P. vetula* y hongos sobre las variables de respuesta: peso seco parte radicular (PSPR), peso seco parte aérea (PSPA), peso seco total (PST), la relación PSPR/PSPA, biomasa de larvas y colonización de HMA.

Factores	PSPR (g)	PSPA (g)	PST (g)	PSPR/ PSPA	Biomasa larvas (g)	% HMA
<i>R. irregularis</i>	***	***	***	***	0.572	-
<i>B. bassiana</i>	***	***	***	***	0.087	-
<i>P. vetula</i>	0.951	0.965	0.958	0.707	-	0.779

\*  $p \leq 0.05$ , \*\*\*  $p \leq 0.01$

No se observaron efectos de herbivoría *P. vetula* sobre la biomasa de las plantas (Fig. 10), a pesar de que se aplicaron dos larvas por maceta, además, de que las larvas no afectaron la colonización de *R. irregularis* como se observó en el primer experimento (Figs. 10 y 11).

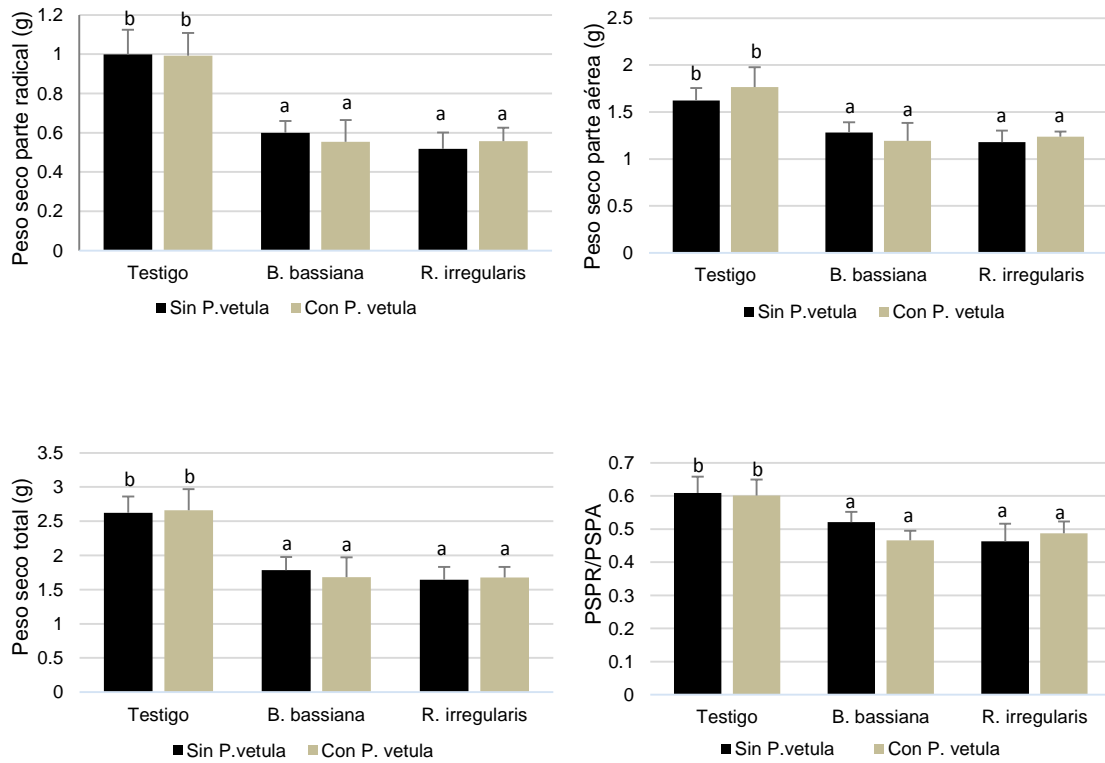


Figura 10. Peso seco de plantas de maíz. Parte radical (PSPR) (a), parte aérea (PSPA) (b), total (PST) (c) y la relación PSPR/PSPA (d), analizados con la prueba LSD de múltiples rangos ( $p < 0.05$ ) donde las letras hacen referencia a diferencias significativas y las barras representan el error estándar.

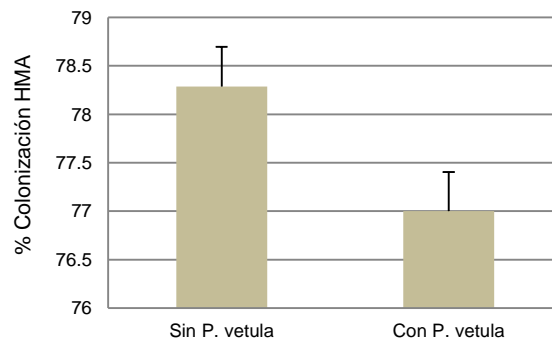


Figura 11. Colonización total (%) por *R. irregularis* en presencia y ausencia de *P. vetula*. Datos analizados con la prueba LSD de múltiples rangos ( $p < 0.05$ ). Las barras representan el error estándar.

El aumento de biomasa de *P. vetula* fue mayor para el tratamiento con *B.bassiana*, a pesar de que se esperaba un efecto contrario, ya que los entomopatógenos al infectar a las larvas, producen una disminución de apetito y por tanto de biomasa de las larvas (Fig.12).

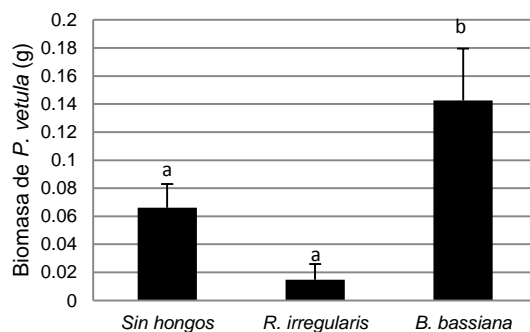


Figura 12. Biomasa fresca de larvas de *P. vetula* alimentadas con raíces de maíz (n=8). Datos analizados con la prueba LSD de múltiples rangos ( $p<0.05$ ), donde las letras hacen referencia a diferencias significativas y las barras representan el error estándar.

### 6.3 Experimento 3: Persistencia de *B. bassiana* en presencia de HMA nativos

La presencia de los microorganismos del suelo, incluidos los HMA, fueron un factor determinante para la biomasa vegetal. Por el contrario, ni la presencia de *B. bassiana* ni la adición de rastrojo de maíz influyeron en estas variables (Cuadro 5).

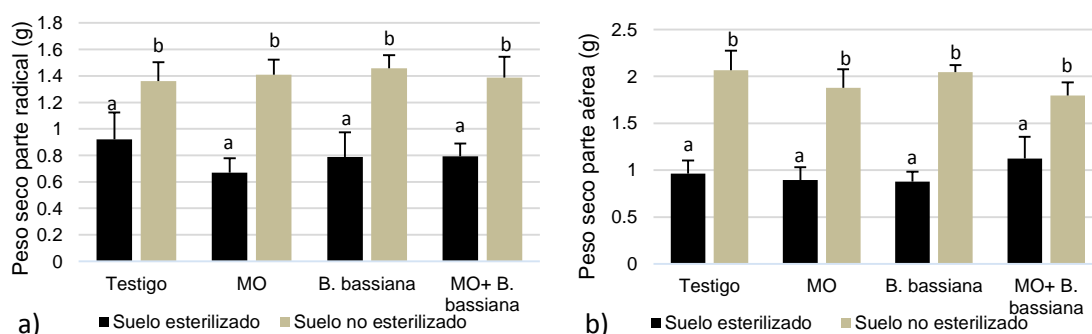
Cuadro 5. Valores de probabilidad ( $p$ ) asociados a los análisis de varianza (ANOVA) de tres vías a las dos, cuatro y ocho semanas del experimento ( $n=4$ ) para determinar los efectos del suelo, *B. bassiana* y rastrojo de maíz sobre las variables de respuesta: peso seco parte radical (PSPR), peso seco parte aérea (PSPA), peso seco total (PST) y la relación PSPR/PSPA. S=Suelo, Bb=*B. bassiana*, MO=Materia orgánica (rastrojo de maíz).

Factores	Variables									
	Semanas	PSPR (g)		PSPA (g)			PST (g)		PSPR/ PSPA	
		4	8	2	4	8	4	8	4	8
S		*	***	0.09	*	***	*	***	0.226	*
Bb		0.849	0.874	0.315	0.924	0.931	0.877	0.899	0.599	0.961
MO		0.515	0.518	0.532	0.552	0.577	0.938	0.529	0.093	0.395
S x Bb		0.83	0.838	0.936	0.402	0.588	0.595	0.840	0.858	0.439
S x MO		0.07	0.587	0.098	0.747	0.190	0.238	0.638	0.051	***
Bb x MO		0.886	0.735	0.076	0.502	0.582	0.682	0.635	0.838	0.926
S x Bb x MO		0.822	0.366	0.608	0.747	0.420	0.776	0.37	0.617	0.641

\*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.01$

En las primeras dos y cuatro semanas no se observaron diferencias significativas en el peso seco de la parte radical y de la parte aérea (PSPR y PSPA, respectivamente). Hasta la octava semana, las plantas que crecieron en suelo no esterilizado tuvieron mayor PSPR y PSPA (Fig. 13).

La relación PSPR/PSPA (peso seco parte radicular/peso seco parte aérea) mostró que a medida que transcurre el tiempo aumenta la asignación de recursos al crecimiento de las raíces. A la octava semana fue prácticamente la misma asignación de recursos a la parte aérea y a la parte radical (Fig. 13d).



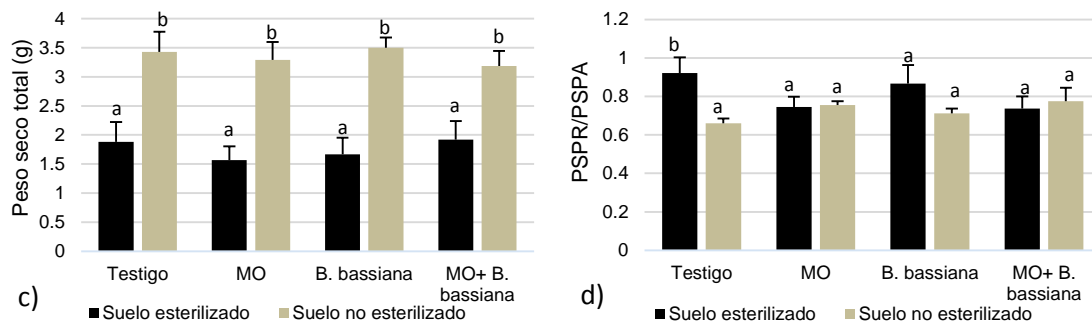


Figura 13. Peso seco plantas de maíz. Peso seco de la parte radical (PSPR) (a), peso seco de la parte aérea (PSPA) (b), peso seco total (PST) (c) y la relación PSPR/PSPA de las plantas de maíz (n=4) analizados con la prueba LSD de múltiples rangos ( $p < 0.05$ ), donde las letras hacen referencia a diferencias significativas y las barras representan el error estándar.

*B. bassiana* tampoco afectó la biomasa vegetal, lo que resalta su importancia como agente de control de plagas que no afecta los sistemas de cultivo, a una densidad de aplicación inicial de  $10^7$  esporas por  $g^{-1}$  (Fig.13).

A la octava semana, la colonización de HMA nativos fue mayor en los tratamientos en los que se inoculó *B. bassiana* (Fig. 14 y Cuadro 6).

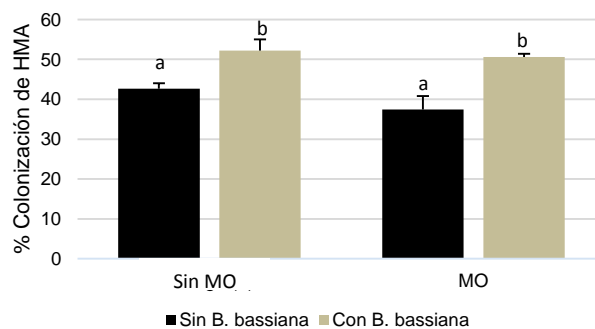


Figura 14. Colonización total (%) por HMA en presencia y ausencia de materia orgánica (MO) y de *B. bassiana*. Datos analizados con la prueba LSD de múltiples rangos ( $p < 0.05$ ) donde las letras hacen referencia a diferencias significativas y las barras representan el error estándar.



La densidad de *B. bassiana* disminuyó de  $10^7$  hasta  $10^5$  conidios  $g^{-1}$  en ocho semanas (Fig. 15) y en los tratamientos con suelo esterilizado la disminución de la densidad de *B. bassiana* fue menor en comparación con las plantas con suelo no estéril (esto es, con microorganismos rizosféricos y los HMA) (Fig. 15 y Cuadro 6)

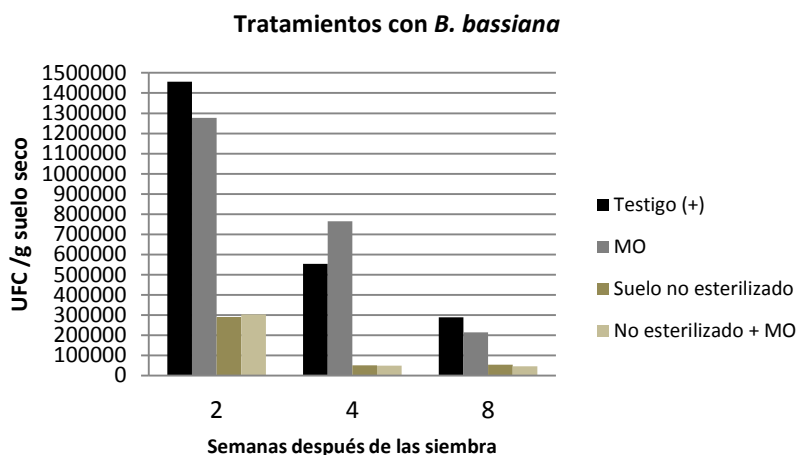


Figura 15. Densidad poblacional de *B. bassiana* en suelo esterilizado y no esterilizado, con y sin materia orgánica (MO).

La materia orgánica no afectó a las poblaciones del HEP ni la colonización de los HMA nativos, del mismo modo en que tampoco se observó incremento del crecimiento del maíz.

Cuadro 6 Valores de probabilidad ( $p$ ) asociados al análisis de varianza (ANOVA) de tres vías ( $n=8$ ) a las dos, cuatro y ocho semanas del experimento ( $n=4$ ), para determinar los efectos del suelo, de *B. bassiana* y del rastrojo de maíz sobre las variables de respuesta: colonización de HMA y densidad en suelo de *B. bassiana*. S=Suelo, Bb=*B. bassiana*, MO=Materia orgánica.

Factores principales	Variables			UFC Bb $g^{-1}$			
	Semanas	% HMA			2	4	8
S		-	-	-	***	***	*
Bb		0.205	0.132	***	-	-	-
MO		0.085	0.457	0.16	0.838	0.591	0.576
S x Bb		-	-	-	-	-	-
S x MO		-	-	-	0.827	0.585	0.78
Bb x MO		*	0.999	0.444	-	-	-
S x Bb x MO		-	-	-	-	-	-

\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*  $p \leq 0.01$

#### 6.4 Experimento 4: Interacciones *P. vetula*, HMA nativos, *B. bassiana* y maíz

El análisis de varianza muestra que los HMA, *B. bassiana* y *P. vetula* fueron importantes en la determinación de la biomasa vegetal, además, se encontró interacción entre estos (Cuadro 7). Mientras que el efecto de los HMA se da principalmente en la parte aérea, el efecto de *B. bassiana* fue mayor en la parte radical, y el de herbivoría fue evidente en ambas partes de la planta.

Cuadro 7. Valores de probabilidad (*p*) asociados a los análisis de varianza (ANOVA) (n=5) para determinar los efectos de *P. vetula*, *B. bassiana* y HMA sobre las variables de respuesta: peso seco parte radical (PSPR), peso seco parte aérea (PSPA), peso seco total (PST) y el ratio PSPR/PSPA. HMA= hongos micorrízicos arbusculares, Bb=*B. bassiana*, Pv= *P. vetula*.

Factores principales	Variables			
	PSPR (g)	PSPA (g)	PST (g)	PSPR/ PSPA
HMA	0.288	***	***	***
Bb	*	0.134	*	0.391
Pv	***	***	***	****
HMA x Bb	0.294	0.609	0.352	0.227
HMA x Pv	0.276	0.129	0.909	0.072
Bb x Pv	0.234	0.079	0.856	0.068
HMA x Bb x Pv	*	*	***	***

\*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.01$

En la figura 16a observamos que la presencia de *B. bassiana* se relacionó con los tratamientos con mayor biomasa de las raíces. En tanto que la herbivoría de dos larvas por maceta disminuyó el PSPR. Los HMA no influyeron en la determinación de esta variable, sin embargo, los HMA interactuaron sinérgicamente con *B. bassiana* y contribuyeron a mantener un crecimiento mayor de las raíces, en presencia de *P. vetula*.

Para el PSPA (Fig. 16b), los HMA nativos contribuyeron al aumento significativo de biomasa vegetal, mientras que *P. vetula* lo disminuyó y *B. bassiana* no tuvo efectos. Es notable que para esta variable es más evidente la influencia de los HMA, además de que en aquellos tratamientos donde no hay HMA, la falta aparente de respuesta a los otros factores estudiados (*B. bassiana* y *P. vetula*) sea consecuencia de falta de P (presente en bajas concentraciones en el suelo), que actúa como recurso limitante, por lo que la planta ya no puede crecer más allá de un umbral.

Como puede observarse en el PST (Fig. 16c), los HMA tuvieron un efecto positivo principalmente en la parte aérea y *B. bassiana* en la parte radical, como también lo indica la relación PSPR/PSPA (Fig. 16d). En combinación de estos dos factores su efecto también fue positivo en presencia del herbívoro. En tanto que *P. vetula* tuvo un efecto negativo sobre las plantas.

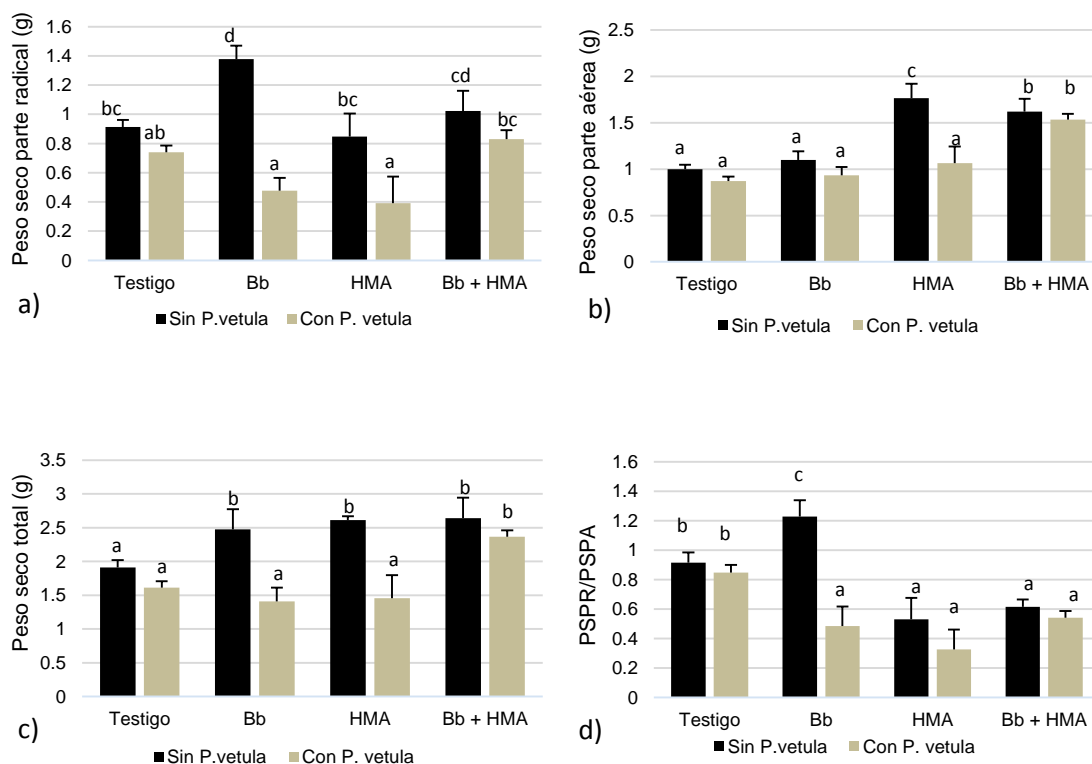


Figura 16. Pesos secos de la parte radicular (a), peso seco de la parte aérea (PSPA) (b), peso seco total (PST) (c) y la relación PSPR/PSPA de las plantas de maíz (n=8) analizados con la prueba LSD de múltiples rangos ( $p < 0.05$ ), donde las letras hacen referencia a diferencias significativas y las barras representan el error estándar.

En cuanto a la nutrición vegetal, los HMA fueron importantes para la absorción de nitrógeno y fósforo. *B. bassiana* jugó un papel sobresaliente en cuanto a la concentración de N en hojas, y *P. vetula* en el N de las raíces (Cuadro 8).

Cuadro 8. Valores de probabilidad (*p*) asociados al análisis de varianza (ANOVA) (n=5), para determinar los efectos de *P. vetula*, HMA y *B. bassiana* sobre las variables de respuesta: contenido de nitrógeno y fósforo en tejido vegetal. HMA= hongos micorrizicos arbusculares, Bb=*B. bassiana*, Pv=*P. vetula*

Tratamientos Factores principales	Variables			
	P raíces (mg/g)	P hojas (mg/g)	N raíces (mg/g)	N hojas (mg/g)
HMA	***	***	*	***
Bb	0.195	0.22	0.088	*
Pv	0.483	0.223	*	0.187
HMA x Bb	0.155	0.362	***	0.789
HMA x Pv	0.58	0.334	0.843	0.316
Bb x Pv	0.254	0.397	*	0.779
HMA x Bb x Pv	0.559	0.654	0.812	0.987

\*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.01$

Para la concentración de P observamos una clara diferencia entre los tratamientos con y sin micorrizas (Fig. 17a y b); en tanto que para las concentraciones de N esta diferencia no es tan marcada (Fig. 17c y d).

La herbivoría de *P. vetula* disminuyó la concentración de N en las raíces, solamente en las plantas en las que no se adicionó *B. bassiana*. Cuando estuvieron presentes *B. bassiana* y los HMA, se observó que no cambió la concentración de N en las raíces en la presencia del herbívoro en comparación con el tratamiento testigo. Aunque *B. bassiana* no provocó la muerte de las larvas, su interacción fue importante para que no disminuyeran las concentraciones de nitrógeno en el tejido radical (Fig. 17c).

Por el contrario, para el N de la parte foliar, la presencia de *B. bassiana* se relacionó con menores concentraciones de nitrógeno. Para esta variable no se encontraron interacciones entre los microorganismos y las larvas (Fig. 17d).

Si consideramos el resultado final de la concentración de N en toda la planta, concluimos que la interacción *B. bassiana*-HMA es importante para el incremento de la concentración de este nutriente. Aún no existen trabajos que hagan referencia a esta interacción.

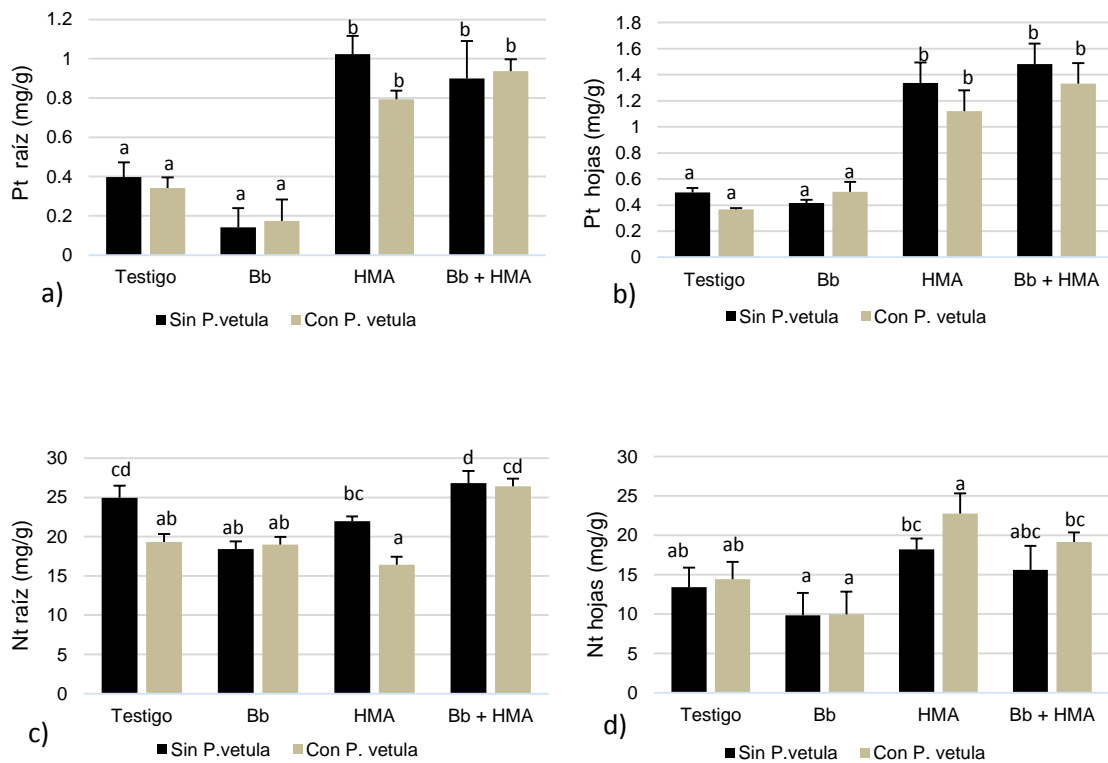


Figura 17. Concentración de Nt y Pt en tejido vegetal en parte radical (a y c) y en la parte aérea (PSPA) (b y d), (n=5) analizados con la prueba LSD de múltiples rangos ( $p < 0.05$ ), donde las letras hacen referencia a diferencias significativas y las barras representan el error estándar.

El análisis de varianza mostrado a continuación, muestra que la biomasa de *P. vetula* no fue afectada por la presencia de los hongos. Mientras que la colonización de los HMA estuvo influida por la herbivoría de las larvas y por algunas interacciones entre los microorganismos y la larva. La densidad de *B. bassiana* estuvo influida por la presencia de los HMA (Cuadro 9).

Cuadro 9 Valores de probabilidad (*p*) asociados al análisis de varianza (ANOVA) (*n*=5) para determinar los efectos de *P. vetula*, HMA y *B. bassiana* sobre las variables de respuesta: biomasa de *P. vetula*, colonización de HMA y densidad en suelo de *B.bassiana*. HMA= hongos micorrizicos arbusculares, Bb=*B. bassiana*, Pv=*P. vetula*.

Efectos principales	Variables		
	Biomasa larvas (g)	% HMA	UFC Bb g <sup>-1</sup>
HMA	0.781	-	***
Bb	0.084	0.599	-
Pv	-	*	0.812
HMA x Bb	0.149	-	-
HMA x Pv	-	-	0.724
Bb x Pv	-	*	-
HMA x Bb x Pv	-	-	-

\*, *p*≤0.05;\*\*\*, *p*≤0.01

La figura 18 muestra que en aquellos tratamientos con *B. bassiana* el promedio de la biomasa de las larvas fue mayor, contrario a lo esperado, dado que *B. bassiana* es un entomopatógeno.

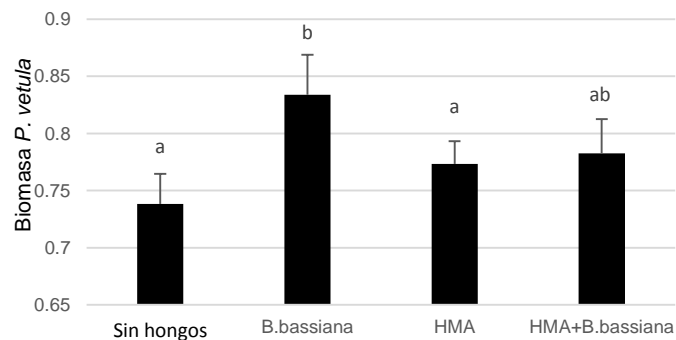


Figura 18. Biomasa fresca de larvas de *P. vetula* alimentadas con raíces de maíz (*n*=5). Datos analizados con la prueba LSD de múltiples rangos (*p*<0.05), donde las letras hacen referencia a diferencias significativas y las barras representan el error estándar.

La colonización de HMA en raíces fue menor en el tratamiento con la presencia de *P. vetula*, y aunque, en el análisis de múltiples rangos esta diferencia no fue significativa (Fig.19), el análisis de varianza (Cuadro 9) muestra que el efecto negativo de *P. vetula* sobre la biomasa es menor cuando existe *B. bassiana* en el suelo.

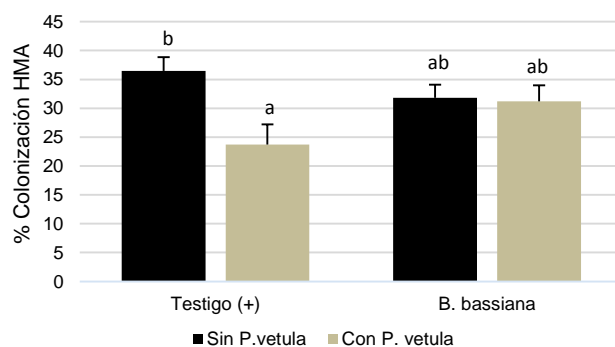


Figura 19. Colonización (%) por HMA en presencia y ausencia de *P. vetula* y de *B. bassiana*. Datos analizados con la prueba LSD de múltiples rangos ( $p < 0.05$ ), donde las letras hacen referencia a diferencias significativas y las barras representan el error estándar.

El registro de las unidades formadoras de colonias de *B. bassiana* permite conocer que en presencia de HMA disminuye su población de manera considerable al igual que en los anteriores experimentos (Fig.20).

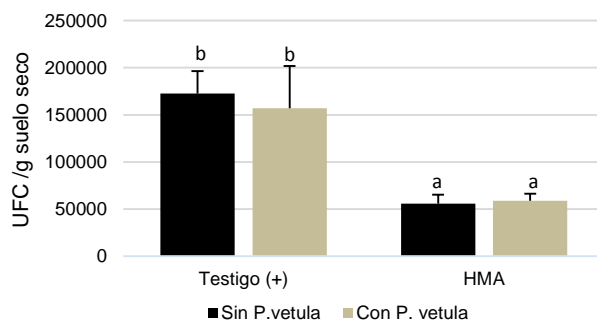


Figura 20. Densidad poblacional de *B. bassiana* en presencia y ausencia de HMA y *P. vetula*. Datos analizados con la prueba LSD de múltiples rangos ( $p < 0.05$ ), donde las letras hacen referencia a diferencias significativas y las barras representan el error estándar.

### 6.5 Experimento 5: Interacciones *P. vetula*, *R. irregularis*, *B. bassiana* y maíz.

*R. irregularis* y *P. vetula* influyeron de manera importante sobre la biomasa vegetal. Además, de que se encontraron algunas interacciones entre los hongos y el herbívoro (Cuadro 10).

Cuadro 10 Valores de probabilidad (p) asociados a los análisis de varianza (ANOVA) (n=8) para determinar los efectos de *P. vetula*, *B. bassiana* y *R. irregularis* sobre las variables de respuesta: peso seco parte radical (PSPR), peso seco parte aérea (PSPA), peso seco total (PST) y el radio PSPR/PSPA *Ri*= *R. irregularis*, *Bb*=*B. bassiana*, *Pv*= *P. vetula*.

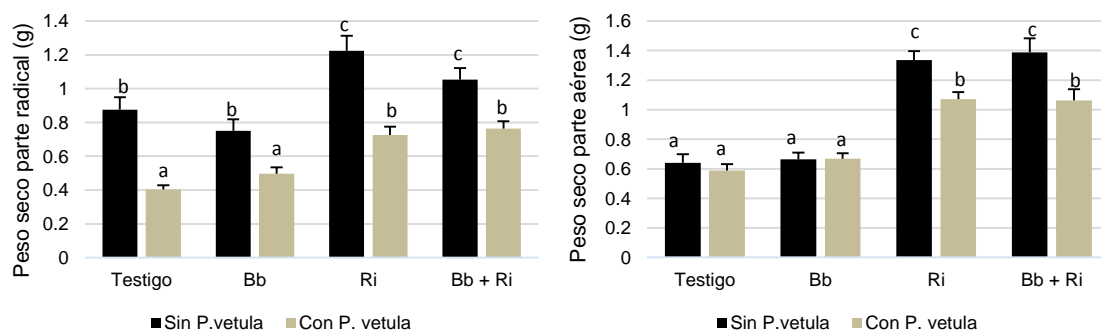
Factores principales			Variables			
<b>Ri</b>	<b>Bb</b>	<b>Pv</b>	PSPR (g)	PSPA (g)	PST (g)	PSPR/ PSPA
<b>Ri</b>			***	***	***	***
<b>Bb</b>			0.340	0.413	0.941	0.09
<b>Pv</b>			***	***	***	***
<b>Ri x Bb</b>			0.558	0.737	0.596	0.425
<b>Ri x Pv</b>			0.724	***	*	***
<b>Bb x Pv</b>			*	0.982	0.164	***
<b>Ri x Bb x Pv</b>			0.963	0.509	0.682	0.442

\*, p<0.05;\*\*\*, p<0.01

Después de seis semanas, los efectos de *R. irregularis* en el aumento del PSPA son semejantes a los generados por los HMA nativos, como se observó en el experimento anterior. Por el contrario, la presencia de *P. vetula* disminuyó el peso de la parte radical debido a los efectos de herbivoría (Fig. 21).

No se observó influencia de *B. bassiana* ni para peso seco de la parte radical, ni para la parte aérea. Por el contrario, las tres larvas por maceta ejercieron un efecto de herbivoría importante, disminuyeron el crecimiento de las raíces y de la parte aérea del maíz (Fig. 21).

La relación PSPR/PSPA muestra que en los tratamientos inoculados con HMA, la planta asigna igualmente recursos a la parte aérea y a la parte radical, sin embargo, para los tratamientos sin este inóculo, hay diferencias entre los tratamientos: en el testigo y con *B. bassiana* se asigna una mayor proporción de recursos a la parte radical.





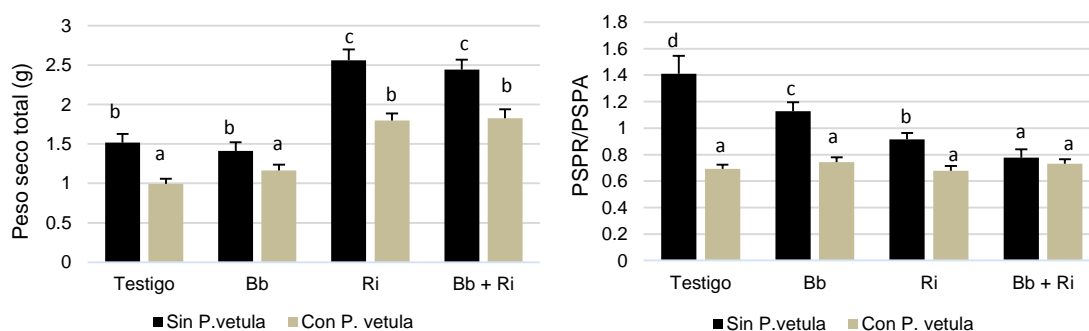


Figura 21. Peso seco de la parte radicular (a), de la parte aérea (PSPA) (b), peso seco total (PST) (c) y la relación PSPR/PSPA de las plantas de maíz (n=8) analizados con la prueba LSD de múltiples rangos ( $p < 0.05$ ), donde las letras hacen referencia a diferencias significativas y las barras representan el error estándar.

La biomasa promedio de las larvas no presentó diferencias significativas entre los tratamientos. La colonización de *R. irregularis* tampoco mostró diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 11).

Cuadro 11 Valores de probabilidad (p) asociados a los análisis de varianza (ANOVA) (n=8) para determinar los efectos de *P. vetula*, *B. bassiana* y *R. irregularis* sobre las variables de respuesta: biomasa de *P. vetula*, colonización de *R. irregularis* y densidad en suelo de *B. bassiana*. Ri= *R. irregularis* Bb=*B. bassiana*, Pv= *P. vetula*.

Factores principales			Variables		
Ri	Bb	Pv	Biomasa larvas (g)	% HMA	UFC Bb g <sup>-1</sup>
Ri			0.768	-	***
Bb			0.216	0.71	-
Pv			-	0.446	0.223
Ri x Bb			0.413	-	-
Ri x Pv			-	-	0.508
Bb x Pv			-	0.251	-
Ri x Bb x Pv			-	-	-

\*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.01$

La densidad de *B. bassiana* hasta la sexta semana mostró un patrón semejante a los resultados del experimento anterior, siendo menor en los tratamientos con *R. irregularis* (Fig. 22).

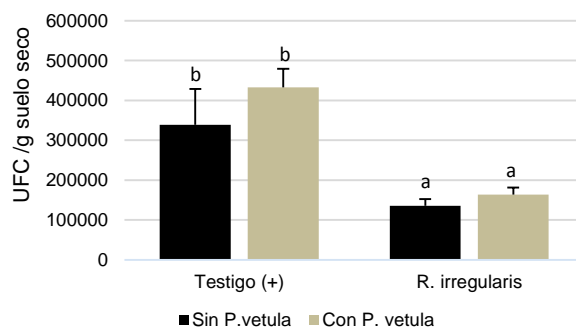


Figura 22. Densidad poblacional de *B. bassiana* en presencia y ausencia de HMA y *P. vetula*. Datos analizados con la prueba LSD de múltiples rangos ( $p < 0.05$ ), donde las letras hacen referencia a diferencias significativas y las barras representan el error estándar.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Herbivoría de *P. vetula*

Los efectos de herbivoría de *P. vetula* sobre el maíz variaron en función del número de larvas y el grado de alimentación de éstas. Una larva por maceta fue suficiente para disminuir la biomasa vegetal, como se observó en el Experimento 1. Sin embargo, cuando las larvas se acercan a la fase de pupa, disminuyen su grado de alimentación como sólo observamos en el Experimento 2, donde a pesar de colocar dos larvas por maceta, estas no afectaron la biomasa vegetal.

*P. vetula* también influyó en la nutrición del maíz, ya que interrumpió el flujo de nitrógeno del suelo a la planta. En un trabajo de Johnson y colaboradores (2005) atribuyen al efecto de herbivoría la ruptura de redes de hifas de los HMA, interrumpiendo el flujo de nutrientes. Resultados semejantes se han registrado en otros trabajos en los que los herbívoros de las raíces, como la gallina ciega *Ligyris subtropicus*, disminuyeron los niveles de N, P y K en toda la planta (Blossey y Hunt, 2003).

### 7.2 *P. vetula* e interacciones bióticas

En los experimentos realizados, la mortalidad provocada por el entomopatógeno fue menor al 5 % y ésta se manifestó después de la cosecha de las plantas. Sin embargo, *B. bassiana* aumentó la biomasa del herbívoro, pero este efecto es posiblemente indirecto. Es posible que *B. bassiana* en su fase saprófita contribuya a incrementar la disponibilidad de nutrientes en el suelo y a mejorar la biomasa del maíz y con ello, a que la larva tuviera acceso al tejido vegetal, que podría ser de mayor calidad nutritiva. Conclusiones similares han sido obtenidas pero a partir de los HMA, en los que también sugieren que este grupo de hongos mejora la calidad nutritiva de la planta, lo que a su vez incrementa el desempeño del herbívoro (Vannette y Hunter 2009; Currie *et al.*, 2011).

La herbivoría disminuyó la colonización de los HMA nativos y del inoculado (*R. irregularis*). Estos resultados son semejantes a los estudios realizados por Bennett y colaboradores (2013), quienes lo atribuyen a que la pérdida de los tejidos de la raíz lleva

también a la pérdida de superficie colonizable por los HMA. Una segunda hipótesis es que las larvas prefieren comer las raíces que están colonizadas y en este sentido, en futuras investigaciones podría realizarse un estudio de marcadores de ácidos grasos específicos de los HMA (Larsen *et al.*, 1998; Larsen y Bodker, 2000) para comprobar si las larvas han comido raíces con HMA o más bien, en el proceso de masticación la larva rompe las raíces colonizadas sin consumirlas.

Además en el Experimento 1, se observó una correlación negativa entre la colonización de HMA y la ganancia de biomasa de *P. vetula*. Una posible explicación es que las larvas más voraces, consumen mayor tejido vegetal, aumentan en alto grado su biomasa y disminuyen por tanto, el porcentaje de colonización de HMA al consumir las raíces. Otra posible explicación, relacionada con lo que se mencionó anteriormente, es que las raíces colonizadas por HMA pueden liberar sustancias que atraigan a las larvas y éstas se alimenten de las raíces con una alta colonización de HMA, disminuyendo por tanto, su porcentaje de colonización, además de que la calidad nutritiva de las raíces podría ser mayor cuando están colonizadas por HMA y por ello, el aumento de biomasa es mayor.

En los experimentos 2 y 5 no se observó este comportamiento, posiblemente esta diferencia se deba a que en estos experimentos se usó el inóculo *R. irregularis*, mientras que en el Experimento 1 los HMA eran nativos. Esto podría sugerir que algunas especies de HMA nativos podrían atraer en mayor medida a las larvas en comparación con *R. irregularis*. Otra explicación, es que a pesar de que se aplicaron dos larvas por maceta en el Experimento 2, el menor grado de herbivoría observado en las plantas, se reflejó en que no hubo un cambio en la colonización de los hongos. Por lo cual, sería interesante que en futuros estudios se analizaran las emisiones inducidas por los HMA de compuestos como volátiles o exudados de las raíces que podrían funcionar como atrayentes de las larvas.

### **7.3 Interacción maíz-microorganismos**

Las plantas que crecieron en ausencia de microorganismos rizosféricos (suelo esterilizado) tuvieron mayor biomasa en las primeras semanas (experimentos 1 y 2), esto puede ser consecuencia de que el proceso de esterilización genera mayor

disponibilidad de nutrientes, como fósforo y nitrógeno, debido a la lisis celular de los microorganismos del suelo (Bowen y Cawse, 1964; Cawse, 1967). Además, se observó una mayor asignación de recursos a las raíces, y esto podría suceder porque la ausencia de microorganismos benéficos induce a que la planta desarrolle sus raíces para tener mayor acceso a los nutrientes del suelo (Dupuy *et al.*, 2010).

Sin embargo, en los experimentos que tardaron más tiempo establecidos (experimentos 3, 4 y 5) la presencia de microorganismos del suelo se relacionó con el aumento de la biomasa vegetal. Esto es, las relaciones mutualistas entre las raíces de las plantas y los microorganismos de la rizósfera no son inmediatas, sino que tienen un periodo de establecimiento, por ejemplo, los HMA tardan en colonizar las raíces alrededor de cinco semanas (Smith y Read, 2008), pero una vez establecidas tienen un efecto positivo en la planta.

En todos los experimentos, los HMA nativos y el inoculado (*R. irregularis*) incrementaron la biomasa vegetal de la parte aérea y en menor medida la de la parte radical. En trabajos previos, también han encontrado que la mayor alocaación de biomasa se da en la parte aérea (Smith y Read, 2008; Vannette *et al.*, 2012). Este efecto positivo sobre la biomasa de la planta también se ha obtenido en trabajos previos. Hoeksema *et al.* (2010) señalan que las plantas C<sub>4</sub> como el maíz, responden a la inoculación de HMA positivamente.

Es reconocido que los HMA contribuyen al aporte del 90 % del fósforo hacia la planta (Smith y Smith 2011). En cuanto al transporte de nitrógeno, Cavagnaro *et al.* (2006) y Finlay (2008), señalan que los hongos micorrizicos también contribuyen al transporte de este nutriente, pero este proceso depende de factores como el contenido de agua en el suelo, el pH, el tipo de suelo, etc. (Hodge y Storer, 2014), además, ciertas cantidades de nitrógeno son retenidas en el micelio del hongo (Hodge y Fitter, 2010), por lo que las cantidades transportadas pueden variar (Smith y Smith, 2011). De hecho, en los resultados obtenidos en el presente trabajo, la concentración de N en el tejido vegetal dependió de algunas interacciones explicadas más adelante.

Las interacciones de *B. bassiana* con las raíces de la planta también cambian en el tiempo. Al principio, no sólo este microorganismo, sino otros del suelo, se relacionaron con el menor crecimiento vegetal, pero a medida que establecen relaciones mutualistas con las plantas, mejoraron la biomasa vegetal.

*B. bassiana* incrementó la concentración de N total en el tejido vegetal. Behie y Bidochka (2014) concluyeron que cinco especies de *Metarhizium* y *B. bassiana* se asociaron como endófitos y fueron capaces de transferir N al tejido vegetal de sus hospederos. El mecanismo que sugieren es que los hongos infectan a los insectos y transfieren el N hacia la planta a partir de la descomposición del insecto. Señalan la importancia del estudio de los endófitos en el ciclo de nutrientes y su impacto ecológico. Sin embargo, en este trabajo, la mortalidad ocasionada por *B. bassiana* fue menor al 5 % y entonces debería existir otro mecanismo que explique la transferencia de N al tejido vegetal cuando está presente *B. bassiana*.

Al mismo tiempo, *B. bassiana* disminuyó la concentración de N en la parte aérea de la planta. Una posible explicación a esto fenómeno es que si *B. bassiana* se asoció a la planta como endófito, podría producir alcaloides, los cuales son compuestos de defensa vegetal ricos en nitrógeno, que podrían concentrarse en las raíces, donde está presente el herbívoro, disminuyendo su concentración en la parte foliar de la planta.

#### **7.4 Interacciones entre microorganismos**

*B. bassiana* favoreció la colonización de los HMA nativos, principalmente. El mecanismo sugerido es que el entomopatógeno en su fase saprófita favorece la disponibilidad de nutrientes de la planta y, por tanto, la planta tiene una alta disponibilidad de fotosintatos para intercambiar con los HMA. Otro mecanismo sugerido, es mediante una interacción indirecta, en la cual *B. bassiana* puede asociarse a la planta como endófito, de tal forma, que podría favorecer el crecimiento vegetal y así, la planta tiene posibilidades de invertir energía en la asociación con los HMA. Gualandi y colaboradores (2014) también observaron que la adición de *B. bassiana* se relacionó con una mayor colonización de HMA, pero no sugieren algún mecanismo.

Por el contrario, los HMA y otros microorganismos nativos se asociaron a una menor densidad poblacional de *B. bassiana*. En trabajos previos se ha reportado el bajo nivel competitivo de este entomopatógeno (Zimmermann, 2007). A pesar de esta limitación, este hongo presenta una amplia distribución, por lo que no se debe minimizar su importancia como agente de control biológico.

Otro mecanismo propuesto es que los HMA podrían inducir cambios en la producción de metabolitos secundarios o exudados en las raíces (Schliemann *et al.*, 2008), los cuales podrían inhibir el crecimiento de *B. bassiana*. De hecho es reconocido el papel que tienen los HMA sobre la estructura de la comunidad de microorganismos del suelo (Finlay, 2008).

En la investigación de Gualandi *et al.* (2014), dicha relación no se encontró. Observaron que la presencia de los HMA no influyó en la colonización de *B. bassiana* como endófito, sin embargo, en nuestro estudio, la medición que se hizo de la densidad de *B. bassiana* fue dentro del suelo, en donde además, habían otros microorganismos.

Kessler *et al.* (2003) obtuvieron resultados similares en experimentos de laboratorio. Recuperaron un mayor número de UFC (unidades formadoras de colonias) de *B. brongniartii* en suelo esterilizado que en suelo no esterilizado. Este resultado lo atribuyen a que como resultado de la esterilización del suelo se incrementa la disponibilidad de nutrientes solubles y al mismo tiempo se eliminan microorganismos antagonistas. Además, tanto los conidos de *B. brongniartii* y de *B. bassiana*, son capaces de germinar y crecer en suelo estéril debido a su mayor disponibilidad de nutrientes (Lingg y Donaldson, 1981; Kessler *et al.*, 2003).

## **7.5 Interacciones multitróficas**

En el cuarto experimento, la biomasa vegetal estuvo determinada por las interacciones de los tres factores estudiados, donde la interacción HEP-HMA favoreció el crecimiento de la planta en presencia del herbívoro. Los efectos de la herbivoría son menores cuando los nutrientes son suficientes para la planta (Blossey y Hunt, 2003), por lo que, en presencia de los HMA se minimiza el efecto de herbivoría ya que estos hongos contribuyen a mejorar la nutrición vegetal (Currie *et al.*, 2011). Además, *B. bassiana* en interacción con los HMA también contribuyó al incremento del nitrógeno en el tejido vegetal, principalmente de las raíces.

Pineda *et al.* (2010) señalan que los microorganismos benéficos pueden facilitar la regeneración del tejido vegetal después de la herbivoría, promoviendo la tolerancia de la planta mediante la mejora en la toma de nutrientes y agua. En el presente trabajo la

presencia del hongo entomopatógeno y de los micorrízicos tuvieron un papel importante en aumentar la tolerancia a los efectos de herbivoría y la principal causa pudiera ser por la mejora de la captación de nutrientes.

Similares resultados se han obtenido en otros estudios. Gualandi *et al.* (2014) estudiaron el efecto de los hongos micorrízicos arbusculares (*Rhizophagus intraradices* y *Gigaspora margarita*) y del entomopatógeno y endófito *B. bassiana* sobre el crecimiento y contenido de fitoquímicos de *Echinacea purpurea*. En todos los casos encontraron un aumento de biomasa en plantas micorrizadas, y aunque *B. bassiana*, como endófito, tuvo un efecto en el crecimiento de la biomasa vegetal, este fue menor.

El papel de *B. bassiana* como endófito ha sido previamente reconocido (Ownley *et al.*, 2008; Vega, 2008). Su papel radica en que se asocia a las plantas e induce la producción de metabolitos secundarios y mejora el crecimiento de la planta (Griffin, 2007; Ownley *et al.*, 2010). Por lo que en posteriores estudios podría probarse si este hongo se asocia como endófito y entonces los efectos se deben a este tipo de relación, y no su papel como saprobio.

En cuanto a la nutrición vegetal, la concentración de N en las raíces de la planta estuvo influida también por la interacción *P. vetula*-*B. bassiana*. Si bien *B. bassiana* no provocó mortalidad de las larvas, contribuyó a minimizar los efectos de la herbivoría sobre la disminución de N en las raíces. Es posible que *B. bassiana* tuviera un papel importante en la respuesta de la planta ante el herbívoro, lo que permitió que la planta asignara mayores cantidades de N en la parte radical para la formación de metabolitos necesarios para la defensa vegetal.

En el contexto del estudio de las interacciones multitróficas sería interesante el estudio de exudados en la rizosfera. Los exudados incluyen compuestos como mucílagos, metabolitos secundarios, iones, enzimas, aminoácidos, azúcares, compuestos fenólicos, proteínas (Bais *et al.*, 2006). Los exudados de las raíces pueden ser importantes en el estudio de las interacciones indirectas ya que modifican la composición del suelo y procesos biológicos del suelo y pueden influir en la disponibilidad de nutrientes (Dakora y Phillips, 2002). Estudios de exudados ya se han realizado en maíz, en donde *Diabrotica virgífera* promovió la liberación de compuestos que atraían nematodos entomopatógenos *Heterorhabditis megidis* en laboratorio y en campo (Rasmann *et al.*, 2005; Kollner *et al.*, 2008). Del mismo modo, también podría



estudiarse la emisión de compuestos orgánicos volátiles para explicar las cascadas multitróficas arriba y debajo de las plantas. (Campos-Herrera *et al.*, 2013).

## 7.6 Interacciones y factores abióticos

En el Experimento 3 se observó que la materia orgánica no influyó en la densidad de *B. bassiana*, en la colonización de los HMA ni en el crecimiento de la planta. En otros estudios, se ha encontrado que la presencia de materia orgánica en el sustrato se asocia al incremento del micelio externo de los HMA, y esto se explica por la intervención de actividades bacterianas que crecen asociadas a las hifas (Ravnskov *et al.* 1999). Gryndler *et al.* (2012) suponen que dicha respuesta se debe a que se liberan compuestos a partir de la descomposición de la materia orgánica y metabolitos secundarios producidos por los microorganismos involucrados en la descomposición.

Sin embargo, en trabajos previos Gryndler y colaboradores (2012) señalan que para que algunos compuestos como la celulosa, contenido en el rastrojo de maíz, promuevan el crecimiento del hongo, es necesario que estén lo suficientemente descompuestos; si la celulosa es fresca puede más bien inhibir la simbiosis con la micorrizas. Es probable que la falta de respuesta de los HMA ante la adición de rastrojo de maíz se deba a que se necesitaba mayor tiempo para que sucediera la descomposición de la materia orgánica. Ravnskov *et al.* (1999) señalan que la adición de celulosa puede disminuir el crecimiento de *G. intraradices*. Este efecto lo explican a que se estimula el desarrollo de microorganismo saprófitos que tiene efectos antagónicos con los HMA.

En cuanto a la persistencia que tiene *B. bassiana* en el suelo existen estudios que señalan que los factores abióticos como la temperatura y la radiación ultravioleta tienen un papel relevante (Zimmermann, 2007; Rolim -Borges *et al.*, 2010). En un estudio de Kessler *et al.* (2003) probaron la persistencia de *Beauveria brongniartii* en suelo, y observaron que esta depende de periodo del año en que se aplica, en primavera-verano la persistencia es mayor y sugieren que la influencia de factores climáticos, como la temperatura y la humedad, son de gran importancia en el crecimiento y establecimiento de los hongos en el suelo. También demostraron que la disminución de la densidad de *Beauveria brongniartii* fue mayor en suelo con un alto contenido de materia orgánica, sin embargo, en nuestro estudio, la materia orgánica no influyó en la persistencia de *B. bassiana*.

## 8. CONCLUSIONES

En este estudio concluimos que las interacciones entre los hongos micorrízicos arbusculares (nativos y *R. irregularis*) y el entomopatógeno *B. bassiana* disminuyeron los efectos negativos de la herbivoría de *P. vetula* sobre la biomasa vegetal, a pesar de que *B. bassiana* generó una mortalidad menor al 5 % y de que mejoró la biomasa de la larva, también fue promotor de la colonización de los HMA, quienes en todos los experimentos fueron importantes en el crecimiento y nutrición del maíz.

El daño provocado por *P. vetula* del tercer estadio estuvo determinado por el número de larvas y por el grado de alimentación, y en todos los experimentos, redujo la biomasa vegetal.

Con este trabajo se resalta la importancia de estudiar las interacciones en su complejidad, donde se tome en cuenta la relación entre las especies, su comportamiento y sus funciones ecológicas. Observamos que *B. bassiana* podría tener una función adicional a su papel como entomopatógeno y como lo señala Ownley *et al.* (2010) la habilidad de algunos hongos de usar diferentes estrategias reduce la probabilidad del desarrollo de resistencia.

## 9. REFERENCIAS

- Aragón A. G. y Morón M.A. (2004). Descripción de larvas de tres especies de *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae) del Valle de Puebla, México. *Folia Entomol. Mex.* 43: 295-306.
- Aragón A.G., Morón M.A., López-Olguín J.F. y Cervantes-Peredo L.M. (2005). Ciclo de vida y conducta de adultos de cinco especies de *Phyllophaga* Harris, 1827 (Coleoptera: Melolonthidae; Melolonthinae). *Acta zoologica Mexicana.* 21:87-99.
- Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S. y Vivanco J.M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:233–66.
- Barreto de Novais C., Lustrino B.W., Conceição E.J, Saggin J.O.J. y Siqueira J.O. (2014). Inter- and intraspecific functional variability of tropical arbuscular mycorrhizal fungi isolates colonizing corn plants. *Appl. Soil Ecol.* 76:78-86.
- Behie S.W. and Bidochka M.J. (2014). Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. *Appl. Environ. Microbiol.* 80:1553–1560.
- Bennett A.E., Alers-García J. y Bever J.D. (2006). Three-way interactions among mutualistic mycorrhizal fungi, plants, and plant enemies: Hypotheses and synthesis. *Am. Nat.* 167:141–152.
- Bennett A.E., Bever J.D. y Bowers M.D. (2009) Arbuscular mycorrhizal fungal species suppress inducible plant responses and alter defensive strategies following herbivory. *Oecologia.* 160:771–779.
- Bennett A.E., Macrae A.M., Moore B.D., Caul S. y Johnson S.N. (2013). Early root herbivory impairs arbuscular mycorrhizal fungal colonization and shifts defence allocation in establishing *Plantago lanceolata*. *Plos One.* 8:1-9.
- Blossey B. y Hunt-Joshi T.R. (2003). Belowground herbivory by insects: Influence on plants and aboveground herbivores. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 521–547.

- Bowen H.J. y Cawse P.A. (1964). Effects of ionizing radiation on soils and subsequent crop growth. *Soils Sci.* 59:39-45.
- Bremner J.M. (1996). Nitrogen total. In: *Methods of soil analysis part 3: chemical analyses* (eds. Spark D.L., Page A.L., Summer M.E., Tabatabai M.A. y Helmke P.A.), pp. 1085-1121. Soil Science Society of America, American Society of Agronomy, Madison, WI.
- Brimner T. A. y Boland G.J. (2003). A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agr. Ecosyst. Environ.* 100:3-16.
- Campos-Herrera R., Ali J.G., Díaz B.M. y Duncan L.W. (2013). Analyzing spatial patterns linked to the ecology of herbivores and their natural enemies in the soil. *Frontiers in plant science.* 4:1-18.
- Carrillo-Benitez M.G., Guzmán-Franco A.W., Alatorre-Rosas R. y Enríquez-Vara J.N. (2013). Diversity and genetic population structure of fungal pathogens infecting white grub larvae in agricultural soils. *Microb. Ecol.* 65:437–449.
- Cavagnaro T.R., Jackson L.E., Six J., Ferris H., Goyal S., Asami D. y Scow K.M. (2006). Arbuscular mycorrhizas, microbial communities, nutrient availability, and soil aggregates in organic tomato production. *Plant Soil.* 282:209-225.
- Cawse P.A. (1967). Effects of low sub-sterilising doses of gamma radiation on carbon, nitrogen and phosphorus in fresh soils. *J. Sci. Fd. Agric.* 18:388-391.
- Currie A.F., Murray P.J. y Gange A.C. (2006) Root herbivory by *Tipula paludosa* larvae increases colonization of *Agrostis capillaris* by arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 38:1994–1997.
- Currie A.F., Murray P.J. y Gange A.C. (2011) Is a specialist root-feeding insect affected by arbuscular mycorrhizal fungi? *Appl. Soil Ecol.* 47:77–83.
- Dakora F.D. y Phillips D.A. (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil.* 245:35–47.
- Dehne H.W. y Oerke E.C. (2004). Safeguarding production – losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Prot.* 23:275-285.

- Dupuy L., Vignes M., McKenzie B.M. y White P.J. (2010). The dynamics of root meristem distribution in the soil. *Plant Cell Environ.* 33:358-369.
- Erb M., Lenk C., Degenhardt J. y Turlings T.C.J. (2009). The underestimated role of roots in defense against leaf attackers. *Trends in Plant Sci.* 14:653–659.
- Erb M. y Lu J. (2013). Soil abiotic factors influence interactions between belowground herbivores and plant roots. *Journal of Experimental Botany.* 64:1295–1303
- FAOSTAT (2009). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division. <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>.
- Finlay R.D. (2008). Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *J Exp Bot.* 59:1115–1126.
- Gange A.C. (2001) Species-specific responses of a root- and shoot-feeding insect to arbuscular mycorrhizal colonization of its host plant. *New Phytol.* 150:611–618.
- Gange A. C., Bower E. y Brown V. K. (2002). Differential effects of insect herbivory on arbuscular mycorrhizal colonization. *Oecologia.* 131:103-112.
- Gange A. C. (2007). Insect-mycorrhizal interactions: patterns, processes, and consequences, pp. 124-143. In T. Ohgushi, T. P. Craig, and P. W. Price (eds.), *Ecological communities: plant mediation in indirect interaction webs*. Cambridge University Press, London, United Kingdom.
- Gehring C. y Bennett A. (2009). Mycorrhizal fungal–plant–insect interactions: the importance of a community approach. *Environ Entomol.* 38:93-102.
- Giovannetti M. y Mosse B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection roots. *New Phytol.* 84:489-500.
- Gómez-Arroyo S., Martínez-Valenzuela C., Villalobos-Pietrini R. y Waliszewski S. (2011). Pesticides: genotoxic risk of occupational exposure. En: *Pesticides: the impacts of pesticide exposure*. Stoycheva M. Intech. India. pp 423.

- Griffin M.R. (2007) *Beauveria bassiana*, a cotton endophyte with biocontrol activity against seedling disease. Dissertation, University of Tennessee - Knoxville, Tennessee.
- Gryndler M., Vosátka M., Hřelová H., Chvátalová I. y Jansa J (2002) Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and cellulose in growth substrate. *Appl Soil Ecol* 19:279–288.
- Gryndler M., Hřelová H., Cajthaml T., Havránková M., Rezacová V., Gryndlerová H. y Larsen J. (2009). Influence of soil organic matter decomposition on arbuscular mycorrhizal fungi in terms of asymbiotic hyphal growth and root colonization. *Mycorrhiza*. 19:255–266.
- Gualandi R.J., Augé R.M., Kopsell D.A., Ownley B.H., Chen F., Toler H.D., Dee M.M. y Gwinn K.D. (2014). Fungal mutualists enhance growth and phytochemical content in *Echinacea purpurea*. *Symbiosis*. 63:111–121.
- Guerrieri E., Lingua G., Digilio M. C., Massa N. y Berta G. (2004). Do interactions between plant roots and the rhizosphere affect parasitoid behavior? *Ecol Entomol*. 29:753–756.
- Guzmán-Franco A.W., Hernández-López J., Enríquez-Vara J.N., Alatorre-Rosas R., Tamayo-Mejía F. y Ortega-Arenas L.D. (2012). Susceptibility of *Phyllophaga polyphylla* and *Anomala cincta* larvae to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates and the interaction with soil properties. *BioControl*. 57:553–563.
- Hajek A. (2004) *Natural Enemies, an introduction to biological control*. Cambridge. Págs. 378.
- Hernández-Velázquez V.M., Cervantes-Espíndola Z, Villalobos F.J., Lina-García L. y Peña-Chora G. (2011). Aislamiento de hongos entomopatógenos en el suelo y sobre gallinas ciegas en agroecosistemas de maíz. *Acta Zoológica Mexicana*. 27:591-599.
- Herrera T. y Ulloa M. (2004). *El reino de los hongos: micología básica y aplicada*. 2ª edición. México, FCE, IB, UNAM. Págs. 552.
- Hidalgo E. (2001). Uso de microorganismos para el control biológico de *Phyllophaga* spp. *Manejo integrado de plagas*. 60:1-4

- Hodge A. y Fitter A.H. (2010). Substantial nitrogen acquisition by arbuscular mycorrhizal fungi from organic material has implications for N cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 107:13754–13759.
- Hodge A. y Storer K. (2015). Arbuscular mycorrhiza and nitrogen: implications for individual plants through to ecosystems. *Plant and Soil*. 386:1–19.
- Hoeksema J.D., Chaudhary V.B., Gehring C.A., Collins Johnson N., Karst J., Koide R.T., Pringle A., Zabinski C., Bever J.D., Moore J.C., Wilson G.W. T., Klironomos J.N. y Umbanhowar J. (2010). A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecol Lett*. 13:394–407.
- Hunter M.D. (2001). Out of sight, out of mind: the impacts of root-feeding insects in natural and managed systems. *Agric. Forest Entomol*. 3:3–9.
- Johnson D., Krsek M., Wellington E. M. H., Stott A.W., Cole L., Bardgett R.D., Read D.J., Leake J.R. (2005). Soil invertebrates disrupt carbon flow through fungal networks. *Science*. 309:1047.
- Johnson S.N. y Rasmann S. (2015). Root-feeding insects and their interactions rhizosphere. *Annu. Rev. Entomol*. 60:517–535.
- Kaplan I., Halitschke R., Kessler A., Sardanelli S. y Denno R.F. (2008) Constitutive and induced defenses to herbivory in above- and belowground plant tissues. *Ecology* 89:392–406.
- Keith R.S. (2001). Ecotoxicological risk assessment of pesticides in the environment. En: Krieger R. *Handbook of pesticides. Toxicology principles*. 353-374.
- Kessler P.H., Matzke y Keller S. (2003). The effect of application time and soil factors on the occurrence of *Beauveria brongniartii* applied as biological control in soil. *J Invertebr Pathol*. 84:15-23.
- Khachatourians G.G. y Sohail S.Q. (2008). Entomopathogenic Fungi, In: Brakhage A.A., and Zipfel P.F. (eds.), *Biochemistry and molecular biology, human and animal relationships*, 2<sup>nd</sup> Edition. The Mycota VI, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Khan S., Guo L., Maimaiti Y., Mijit M. y Qiu D. (2012). Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent. *Molecular Plant Breeding*. 3:63-79.

- Kiers E.T., Duhamel M., Beesetty Y., Mensah J.A., Franken O., Verbruggen E., Fellbaum C.R., Kowalchuk G.A., Hart M.M., Bago A., Palmer T.M., West S.A., Vandenkoornhuysen P., Jansa J. y Bücking H. (2011). Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science*. 303:880-882.
- Kollner T.G., Held M., Lenk C., Hiltbold I., Turlings T.C.J., Gershenzon J. (2008). A maize (E)-beta-caryophyllenesynthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties. *Plant Cell*. 20: 482–494.
- Koricheva J., Gange A.C. y Jones T. (2009). Effects of mycorrhizal on insect herbivores: a meta-analysis. *Ecology*. 90:2088–2097.
- Krauss U., Hidalgo E., Arroyo C. y Piper S.R. (2004) Interaction between the *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* and the mycoparasites *Clonostachys spp.* *Trichoderma harzianum* and *Lecanicillium lecanii*. *Biocontrol Sci. Technol.* 14:331-346.
- Kula A.A.R., Hartnett D. C. y Wilson G.W.T. (2005). Effects of mycorrhizal symbiosis on tallgrass prairie plant herbivore interactions. *Ecol. Lett.* 8:61-69.
- Larsen J., Olsson P.A. y Jakobsen I. (1998). The use of fatty acid signatures to study mycelial interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and the saprotrophic fungus *Fusarium culmorum* in root-free soil. *Mycol. Res.* 102:1491-1496.
- Larsen J. y Bodker L. (2000). Interactions between pea root-inhabiting fungi examined using signature fatty acids. *New Phytol.* 149:487-493.
- Lingg, A.J. y Donaldson, M.D. (1981). Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. *J. Invertebr. Pathol.* 38:191–200.
- López-Carmona D. (2013). Respuestas de micorrizas de maíz (*Zea mays*) a un gradiente de estrés hídrico y fertilización mineral (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Mantzoukas S., Milonas P., Kontodimas D. y Angelopoulos K. (2013). Interaction between the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and two



- entomopathogenic fungi in bio-control of *Sesamia nonagrioid* (Lefebvre) (Lepidoptera:Noctuidae). *Ann Microbiol* 63:1083–1091.
- Morón, M.A. (1983). Introducción a la biosistemática y ecología de los coleópteros Melolonthidae edafícolas de México. EN: Memorias II Mesa Redonda sobre Plagas del Suelo. Chapingo, Edo. De México. pp. C1-C13
- Morón M.A. (1986). El género *Phyllophaga* en México: morfología, distribución y sistemática supraespecífica (Insecta: Coleoptera). *Pub* 19, Instituto de Ecología. México. págs. 344.
- Morón M. A. (2001). Larvas de escarabajos del suelo en México (Coleoptera: Melolonthidae). *Acta Zool. Mex.* No. especial 1: 111-130.
- Morón M. A. (2010). Diversidad y distribución del complejo gallina ciega (Coleoptera: Scarabaeoidea). In: Rodríguez del Bosque L. A., y Morón M. A. Plagas del Suelo. pp. 41-64.
- Mueller R. C., Martinez T., Sthultz C. M., Gehring C. A. y Whitham T. G. (2005). The relationship between stemgalling wasps and the mycorrhizal colonization of *Quercus turbinella*. *Can. J. Botany*. 83:1349-1353.
- Murphy J. y Riley J.P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*. 27:31-36
- Nájera-Rincón M.B., Jackson T.A. y López-Mora J.D. (2003). Especies de “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae) asociadas al cultivo de maíz en tres localidades de la Ciénega de Zacapu, Michoacán, México. En: Aragón A., Morón M.A. y Marín A. (eds.). Estudios sobre Coleópteros del suelo en América. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. pp. 215-230.
- Nájera-Rincón M.B. (2005). Control microbiano de “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae), una alternativa para el manejo agroecológico de plagas rizófagas. En: A. Aragón J.F., López-Olguín y A.M. Tapia (eds.), Manejo agroecológico de sistemas. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México. pp. 101-125.

- Nicholls E.C.I. (2008). Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín. Págs. 282.
- Ocampo-Hernández J.A., Tamez-Guerra P., Pineda S., Tamayo-Mejía F., Guzmán-Franco A., Figueroa de la Rosa J.I. y Martínez A.M. (2011). Susceptibility of the Mexican bean beetle *Epilachna varivestis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) to endemic isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Clavicipitaceae). *J Pest Sci.* 84:471–477.
- Oerke E.C. (2006). Crop losses to pests. *J Agric Sci.* 144:31-43.
- Ortiz-Urquiza A., Riveiro-Miranda L., Santiago-Álvarez C. y Quesada-Moraga E. (2010). Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus. *J Invertebr Pathol.* 105:270–278.
- Ownley B.H., Griffin M.R., Klingeman W.E., Gwinn K.D., Moulton J.K. y Pereir R.M. (2008). *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. *J Invertebr Pathol.* 98:267–270.
- Ownley B.H., Gwinn K.D. y Vega F. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *Biocontrol.* 55:113–128.
- Paliwal R.L. (2001) Food and Agriculture Organization of the United Nations, Granados G., Lafitte H.R., Violic A.D. y Maratheé J.P. El maíz en los trópicos: mejoramiento y producción. Food Agric Org. Italia. Págs. 392.
- Phillips J. y Hayman D. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society.* 55:157-160.
- Pineda A., Zheng S.J., Van Loon J.J.A., Pieterse C.M.J. y Dicke M. (2010). Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. *Trends in Plant Science* 15:507–514.

- Pozo M.J., Cordier C., Dumas-Gaudot E., Gianinazzi S., Barea J.M. y Azcón-Aguilar C. (2002) Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *J Exp Bot.* 53:525–534.
- Ravnskov S., Larsen J., Olsson P.A. y Jakobsen I. (1999). Effects of various organic compounds on growth and phosphorus uptake of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.* 141: 517-524.
- Redecker D., Kodner R. y Graham L.E. (2000). Glomalean fungi from the Ordovician. *Science.* 289: 1920–1921.
- Requena N., Serrano E. y Ocón A., Breuninger A. (2007). Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry.* 68:33-40.
- Richter, P.O. (1966). *White grubs and their allies.* Oregon State University Press. Corvallis. Págs.219
- Robinson D., Hodge A. y Fitter A. (2003). Constraints on the form and function of root systems. See De Kroon & Visser 2003. pp. 1–32.
- Rodríguez-del Bosque L. A. (1988). *Phyllophaga crinita* Burmeister (Coleoptera: Melolonthidae): Historia de una plaga del suelo (1855-1988). Pp. 53-79. In: Memorias de la III Mesa Redonda sobre Plagas del Suelo. Soc. Mex. Entomol. Morelia, Michoacán, México.
- Rodríguez del Bosque L.A. y Morón M.A. (2010). *Plagas del suelo.* 1ª Edición. China. Págs. 418.
- Rolim-Borges L., Noemberg L.S.M., Chapaval P.I., Cardoso B.C.L. y Mattos K.L. (2010). Persistencia no solo de inoculo de *Beauveria bassiana* empregado para o controle de *Hedypathes betulinus* em plantio de *Ilex paraguariensis*. *Floresta.* 41:135-144.
- Ronald M.A. (2002). *Introducción a la ecología microbiana y microbiología ambiental.* Pearson Addison-Wesley. 4ª edición. España. Págs. 677.
- Ruiz-Lozano J.M., Azcón R. y Gómez M. (1995). Effects of arbuscular mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:456–460.

- Schliemann W., Ammer C. y Strack D. (2008). Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry*. 69:112–146.
- Senthilraja G., Anand T., Durairaj C., Kennedy J.S., Suresh S., Raguchander T. y Samiyappan R. (2015). A new microbial consortia containing entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and plant growth promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* for simultaneous management of leafminers and collar rot disease in groundnut. *Biocontrol Sci Techn.* 20:449-464.
- Shrivastava G., Ownley B.H., Augé R.M., Toler H., Dee M., Vu A., Kollner T.G. y Chen F. (2015). Colonization by arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi enhanced terpene production in tomato plants and their defense against a herbivorous insect. *Symbiosis*. 65:65–74.
- SIAP (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera)-SAGARPA (2009). La actividad agropecuaria en México 1980-2008. Base de datos. SAGARPA. México.
- Singh M., Vyas D. y Singh P.K. (2014). Interaction of soil microbes with mycorrhizal fungi in tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 47:737–743.
- Smith S. y Read D. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press. 3rd edition. Great Britain. Págs. 800.
- Smith S.E. y Smith F.A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62:227–50.
- Statpoint, Inc. (2005). STATGRAPHICS Centurion XV Version 15.02. <http://www.statgraphics.com>
- Stout M.J., Thaler J.S. y Thomma B.P.H.J. (2006) Plant-mediated interactions between pathogenic microorganisms and herbivorous arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 51:663-689.
- Stoycheva M. (2011). Pesticides: the impacts of pesticide exposure. Intech. India. Págs. 423.
- Tefera T. y Pringle K.L. (2003). Food consumption by *Chilo partellus* (Lepidoptera Pyralidae) larvae infected with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and

effects of feeding natural versus artificial diets on mortality and mycosis. *J Invertebr Pathol.* 84:220–225.

Tisserant E., Malbreil M., Kuo A., Kohler A., Symeonidi A., Balestrini R., Charron P., Duensing N., Frei dit Frey N., Gianinazzi-Pearson V., Gilbert L.B., Handa Y., Herr J.R., Hijri M., Koul R., Kawaguchi M., Krajinski F., Lammers P.J., Masclaux F.G., Murat C., Morin E., Ndikumana S., Pagni M., Petitpierre D., Requena N., Rosikiewicz P., Riley R., Saito K., San Clemente H., Shapiro H., van Tuinen D., Bécard G., Bonfante P., Paszkowski U., Shachar-Hill Y.Y., Tuskan G.A., Young J.P., Sanders I.R., Henrissat B., Rensing S.A., Grigoriev I.V., Corradi N., Roux C. y Martin F. (2013). Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110: 20117-20122.

Torres S.E., Cárdenas C.H.M. y De la Torre M.M. (2007). Biocontrol de plagas agrícolas y enfermedades. En: Bolívar Zapata F. G. Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. Rosa Campos de la Rosa. 2ª edición. pp. 505-528.

Van Dam N.M. (2009). Belowground herbivory and plant defenses. *Annu Rev Ecol Evol S.* 40:373–391.

Van der Heijden M.G.A., Martin F.M., Selosse M.A. y Sanders R. (2014). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytol.* 205:1406-1423.

Vannette, R.L. y Hunter, M.D. (2009) Mycorrhizal fungi as mediators of defence against insect pests in agricultural systems. *Agricultural and Forest Entomology.* 11:351–358.

Vannette R.L. y Rasmann S. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungi mediate below-ground plant–herbivore interactions: a phylogenetic study. *Functional Ecology.* 26: 1033–1042.

Vega F. (2008). Insect pathology and fungal endophytes. *J Invertebr Pathol.* 98:277–279.

Vega E.F., Goettel S.M., Blackwell M., Chandler D., Jackson A.M., Keller S., Koike M., Maniania K.N., Monzon A., Ownley H.B., Pell K.J., Rangel E.N.D y Roy E.H. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecol.* 2:149-159.

- Vega F.E. y Kaya H.K. (2012). Insect pathology. Elsevier 2<sup>nd</sup> edition. China. Págs.509.
- Vestergaard S., Cherry A., Keller S. y Goettel M. (2003). Safety of hyphomycete fungi as microbial control agents. In: Hokkanen H.M.T., Hajek A.E., editors. Environmental impacts of microbial insecticides. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp 35-62.
- Wamberg C., Christensen S. y Jakobsen I. (2003). Interaction between foliar-feeding insects, mycorrhizal fungi, and rhizosphere protozoa on pea plants. *Pedobiologia*. 47:281-287.
- Whipps J. M. (2004). Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Can. J. Bot.* 82:1198–1227.
- Whittaker J.B. (2003). Root-animal interactions. See De Kroon & Visser 2003, pp. 363–385. de Kroon H, Visser EJW. *Root Ecology*. Berlin: Springer Verlag.
- Wraight S.P., Ramos M.E., Avery P.B., Jaronsky S.T. y Vanderberg J. D. (2010). Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests in vegetables crops. *J Invertebr Pathol.* 103:186–199.
- Zimmermann G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci Tech.* 17: 553-596.

# ANEXOS

## Anexo 1. Análisis físico-químico del suelo



### Laboratorio Nacional de Fertilidad de Suelos y Nutrición Vegetal (Campo Experimental Bajío)

#### ANÁLISIS COMPLETO DE SUELO

INFORMACION GENERAL			
No. Registro	1539	Cliente	UNAM
Fecha Recepción	03/14/2013	Municipio	Morelia
Fecha Entrega	05/21/2013	Estado	Michoacán
Prof. de Muestra	0-25 cm.	Proyecto	Universidad Nacional Autónoma de México
Lote / Sector		Rancho	C.E. CRUCCO - U.A. de México
		Tipo de Análisis	Suelo
		Agricultura	Riego
		Cultivo	Maíz

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL SUELO	
Arena	19.48%
Arcilla	33.54%
Limo	27.28%
Tipo de Suelo	Arcilla
Punto de Saturación	50.0 % Mod. Alto
Capacidad de Campo	37.5 %
Punto March. Perm.	19.7 %
Cond. Hidráulica	ND cm/hr ND
Densidad Aparente	1.17 g/cm <sup>3</sup> Color Munsell :

REACCIÓN DEL SUELO	
pH (1:2 agua)	7.28 Neutro
pH (1:2 CaCl <sub>2</sub> )	ND ND
Carbonatos Totales (%)	1.46 Bajo
Requisitos de Cal	No Req. Ton/Ha
Requisitos de Yeso	No Req. Ton/Ha

FERTILIDAD												
Muy Alto												
Alto												
Mod. Alto												
Mediano												
Mod. Bajo												
Bajo												
Muy Bajo												
Determinación	MO	N-Inorg.	P-Extr.	K	Ca	Mg	Na *	Fe	Zn	Mn	Cu	
Unidades	%	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	
Resultados	2.74	23.2	5.80	303	2963	709	192	78.2	5.37	30.3	1.97	

\* Es deseable que este elemento sea bajo

EXTRACTO DE SATURACION (SALINIDAD-SODICIDAD)			
CEC - U+3	dSm	RAS	g+/g
pH <sub>e</sub>	7.10	PSI	3.72
<b>Cationes (meq/l)</b>	<b>Aniones (meq/l)</b>		
Ca++ : 0.40	CO <sub>3</sub> : 0.40		
Mg++ : 0.30	HCO <sub>3</sub> : 0.60		
Na+ : 0.95	Cl- : 1.11		
K+ : 0.71	SO <sub>4</sub> : 2.43		
PO <sub>4</sub> : 0	N-NO <sub>3</sub> : 0		
		Grado de	Salin. RAS PSI

RELACIONES DE BASES DE CAMBIO				
Muy Alto				
Alto				
Mod. Alto				
Mediano				
Bajo				
Muy Bajo				
Relación	Ca/Mg	Mg/K	Ca-Mg/K	Ca/K
Resultados	2.56	7.55	26.9	19.0
Rango Medio	2 - 6	2 - 3	20 - 30	10 - 15

PORCENTAJE ACTUAL Y SUGERIDO DE LAS BASES DE CAMBIO									
		H	Al	Acidez Total Inter.	Ca ++	Mg ++	K +	Na +	CEC
Resultado	meq/100 gr	ND	ND	ND	14.9	5.81	0.77	0.83	22.3
	% Actual	ND	ND	ND	66.3	26.1	3.45	3.71	
Sugerido	% Sugerido	0 - 5	0 - 5	0 - 10	65 - 75	10 - 20	ND	0 - 5	

COMENTARIOS	ATENTAMENTE
	<b>IBQ MAYRA LIZBETH FRIAS P.</b>
	ENCARGADO(A) DE LABORATORIO

Km. 8.5 Carr. Celaya, San Miguel de Allende, Celaya, Gto. C.P. 38110; Tel (461) 61 1 53 23 Ext. 226 y 227 labsuelos.inifap@hotmail.com FOR-SU-02, Revisión 3

**Anexo 2. Duración del experimento y tiempo de contacto de las larvas con las plantas.**

<b>Experimento</b>	<b>Duración del experimento</b>	<b>Tiempo de contacto de las larvas con la planta</b>	<b>Número de larvas por maceta</b>
1	6 semanas (23 Ago-26 Oct)	3 semanas (17 Sep- 7 Oct)	1
2	6 semanas (13 Sep- 7 Oct)	3 semanas (1-26 Oct)	2
3	8 semanas (28 Mar-22 May)	-	-
4	7.5 semanas (7 Ago-29 Sept)	3 semanas (8-29 Sept)	2
5	6 semanas (12 Sept-23 Oct)	2 semanas (9-23 Oct)	3