

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA  
SUBDIRECCIÓN GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA  
PROGRAMA DE POSGRADO

RESPUESTA DE *Phyllophaga menetriesi* (Blanchard) y *Phyllophaga  
obsoleta* (Blanchard) (Coleoptera: Scarabaeidae) a *Bacillus  
popilliae* Dutky.

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico Académico del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agropecuarias y de Recursos Naturales Renovables del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE, como requisito parcial para optar al título de *Magister Scientiae* en Fitoprotección.

Por

MARISOL DIAZ CALVO

Turrialba, Costa Rica

1992

Esta tesis ha sido aceptada, en su presente forma, por la Coordinación del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

COMITE ASESOR:



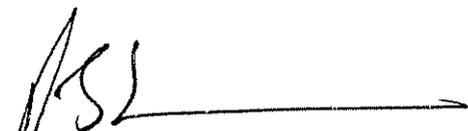
---

Luko Hilje, Ph. D.  
Profesor Consejero



---

Elkin Bustamante, Ph. D.  
Miembro del Comité



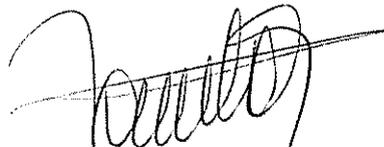
---

Phillip Shannon, M. Sc.  
Miembro del Comité



---

Thomas Zoebisch, Ph. D.  
Miembro del Comité



---

Ramón Lastra, Ph. D.  
Coordinador Programa Maestría



---

Marisol Díaz Calvo  
Candidato

"El campesino costarricense no se sienta a llorar cuando se vuelca la carreta. Con más sabiduría que ciencia, con más diligencia que palabras, la para, la desembarrialala, y sigue".

José Figueres Ferrer.

## DEDICATORIA

A la memoria de mi madre Blanca (que de Dios goce), quien no pudo ser testigo de la culminación de mis estudios de maestría.

A mi padre Oscar, ejemplo de honradez, trabajo y perseverancia.

A mis hermanos Oscar y Judith a quienes amo.

A mi esposo Eddy, por su apoyo incondicional.

A mi querida patria Costa Rica de donde vengo.

"Vengo de una tierra de volcanes y de ríos profundos y violentos, tierra de colibríes, tierra verde de tinajas, maíz y machete. Vengo de tierra de árboles, de humedades secretas y oscuras, tierra de luna dormida en las regiones más antiguas del agua, la tarde, la lluvia, los caminos, la lágrima, corazón del pueblo transparente y cancioncilla en la vieja guitarra. Vengo de una tierra de luchas campesinas tensando su suerte, tierra de sol y alegrías, para derrotar la muerte, bajo ese sol las espigas de vida crecen. Tierra, viento y madrugada, tierra que huele a esperanza, semilla de futuro en nuestras manos".

Fidel Gamboa

A la mujer profesional costarricense, que demuestra cada día que con estudio, dedicación y tenacidad se pueden alcanzar todas las metas en la vida.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo dejar constancia de mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas e instituciones:

A los miembros de mi Comité Asesor, Luko Hilje Ph. D., Tomás Zoebish Ph. D., Elkin Bustamante Ph. D. y especialmente a Phillip Shannon M. Sc., por sus orientaciones y sugerencias durante el desarrollo y culminación del presente trabajo.

A mi esposo Eddy, quien siempre estuvo presente para brindarme la ayuda y el apoyo necesario durante todas las etapas de este estudio.

A mi estimada amiga y compañera de promoción, Lic. Raquel Chavarría M. Sc., por su desinteresada colaboración a lo largo de todo el proceso de investigación.

A las autoridades del Ministerio de Agricultura y Ganadería, por la licencia concedida de dos años, hecho que me permitió efectuar mis estudios de posgrado y superarme así, desde el punto de vista profesional.

Al Proyecto CATIE-RENARM-MIP por la beca otorgada, lo cual hizo posible la realización de mis estudios de Maestría.

A la Lic. Nelly Vázquez M. Sc. del Laboratorio de Biotecnología y al Sr. Rodolfo Sánchez del Laboratorio de Semillas del CATIE por la ayuda brindada.

Al personal de todos los proyectos del CATIE que de alguna manera colaboró para que esta tesis se realizara.

Y, sobre todo al Lic. Luis Mora y al Ing. Carlos Calvo profesores de la Sede Regional de la Universidad de Costa

Rica en Turrialba, quienes gentilmente autorizaron la utilización de las instalaciones del Laboratorio de Entomología, sin cuyo hecho esta investigación no hubiera podido llevarse a cabo.

Al Sr. Gerardo Zúñiga, asistente de laboratorio de la Sede Regional de la Universidad de Costa Rica en Turrialba, quien colaboró con este trabajo como lo hizo siempre durante mi carrera universitaria.

Un agradecimiento especial a Franklin Jiménez Ph. D., Dagmar Utzinger, asistente de laboratorio, y sobre todo a Mario Vargas Ph. D., de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, cuya asesoría científica fue un complemento determinante para la realización de este trabajo. Muchas Gracias a todos por ese espíritu de desinteresada colaboración.

A todas aquellas personas que de una manera u otra hicieron posible la culminación de este estudio,

Muchas Gracias.

## BIOGRAFIA

La autora de nacionalidad costarricense, nació en Turrialba, provincia de Cartago. Realizó sus estudios secundarios en el Instituto de Educación Dr. Clodomiro Picado Twight en su ciudad natal.

Efectuó sus estudios superiores en la Universidad de Costa Rica de la cual se graduó en octubre de 1986, obteniendo el título de Ingeniero Agrónomo con énfasis en Producción. Su tesis de grado fue galardonada con una "Mención Honorífica" en la Trigésima Reunión Anual del Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos y Animales (PCCMCA), realizada en Guatemala en abril de 1987.

En febrero de 1987, empezó a laborar en la Subdirección de Extensión Agrícola del Ministerio de Agricultura y Ganadería, donde desempeñó el cargo de Contraparte Nacional de la Consultoría en Extensión y Comunicación Agrícola del Proyecto IICA-PIPA-MAG.

En 1988 pasó a ocupar el puesto de Asistente de la Dirección Superior de Operaciones Regionales de esa misma institución. En 1989, además de la función anterior, tuvo a su cargo la Coordinación Nacional de Capacitación del Sector Agropecuario.

En setiembre de 1989 ingresó al Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales Renovables del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE, obteniendo el título de *Magister Scientiae* con énfasis en *Fitoprotección* en abril de 1992.

## CONTENIDO

	Pag.
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
BIOGRAFIA.....	vii
CONTENIDO.....	viii
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xii
LISTA DE CUADROS.....	xiii
LISTA DE ANEXOS.....	xiii
I. INTRODUCCION.....	1
1.1. Objetivo general.....	2
1.2. Objetivos específicos.....	2
II REVISION DE LITERATURA.....	3
2.1. Características generales del género <i>Phyllophaga</i> ....	3
2.1.1. Reconocimiento.....	3
2.1.2. Distribución.....	3
2.1.3. Hospedantes.....	4
2.1.4. Ciclo de vida.....	4
2.2. Fenología de <i>Phyllophaga menetriesi</i> .....	6
2.3. Importancia económica .....	7
2.4. Medidas de combate .....	8
2.5. Métodos de cría de escarabeidos en condiciones de laboratorio.....	9
2.5.1. Cría de <i>P. menetriesi</i> en el laboratorio.....	10
2.6. Control de escarabeidos con <i>B. popilliae</i> .....	11
2.6.1. Epizootiología.....	14
2.6.2. Patogenicidad de <i>B. popilliae</i> en diferentes especies de escarabeidos.....	20
2.6.3. Producción comercial de <i>B. popilliae</i> .....	22
2.6.4. Ventajas de la utilización de <i>B. popilliae</i> .....	24
III. MATERIALES Y METODOS.....	25

3.1.	Localización.....	25
3.2.	Descripción del trabajo y material experimental....	25
3.3.	Etapas de investigación.....	25
3.3.1.	Etapa I. Captura de adultos y obtención de huevos.....	26
3.3.2.	Etapa II. Cría de larvas.....	27
3.3.3.	Etapa III. Colecta de larvas de tercer estadio en el campo.....	28
3.3.4.	Etapa IV. Aplicación del insecticida bacterial..	28
3.4.	Tratamientos.....	29
3.5.	Diseño y unidad experimental.....	30
3.6.	VARIABLES MEDIDAS.....	30
3.7.	Pruebas adicionales de susceptibilidad en <i>Phyllophaga obsoleta</i> (Blanchard).....	30
3.8.	Prueba con los productos comerciales aislados medios de cultivo.....	31
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	33
V.	CONCLUSIONES.....	45
VI.	RECOMENDACIONES.....	46
VII.	REFERENCIAS.....	47
VIII.	ANEXOS.....	65

DIAZ CALVO, M. 1992. RESPUESTA DE *Phyllophaga menetriesi* (Blanchard) y *Phyllophaga obsoleta* (Blanchard) (Coleoptera: Scarabaeidae) a *Bacillus popilliae* Dutky. Tesis M. Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica.

Palabras clave: *Phyllophaga menetriesi*, *Phyllophaga obsoleta*, *Bacillus popilliae*, Scarabaeidae, bacterias entomopatógenas, enfermedad lechosa, bioensayo.

### RESUMEN

Con el objetivo de probar opciones de combate biológico contra larvas del género *Phyllophaga*, se evaluó la respuesta de larvas de dos especies, *Phyllophaga menetriesi* (Blanchard) y *Phyllophaga obsoleta* (Blanchard) a la cepa comercial de *Bacillus popilliae* Dutky. En el caso de *P. menetriesi*, también se evaluó la susceptibilidad de larvas de dos "grupos" uno criado en condiciones naturales y otro en condiciones de laboratorio.

Se determinó que las dos especies evaluadas se pueden infectar con la enfermedad lechosa. No obstante, los porcentajes de infección fueron muy bajos. Las larvas de *P. menetriesi* criadas en el laboratorio se infectaron solo por inyección intrahemocélica de esporas. Mientras que las recolectadas en el campo lo hicieron por inyección y por exposición a suelo inoculado. El tiempo de aparición de síntomas fue variable. Las larvas de *P. obsoleta* se infectaron por inyección intrahemocélica, pero no por ingestión oral de esporas. No obstante, se produjo la enfermedad lechosa cuando se administraron vía oral bacterias obtenidas de medio artificial. El tiempo de aparición de síntomas fue similar en los dos casos.

Con base en los resultados obtenidos en este experimento, se puede concluir que posiblemente *P. menetriesi* y *P. obsoleta* no son susceptibles a la cepa comercial de *B. popilliae*, a través de las vías normales de infección.

DIAZ CALVO, M. Response of *Phyllophaga menetriesi* (Blanchard) and *Phyllophaga obsoleta* (Blanchard) (Coleoptera: Scarabaeidae) to *Bacillus popilliae* Dutky. M. Sc. Thesis. CATIE. Turrialba, Costa Rica.

key words: *Phyllophaga menetriesi*, *Phyllophaga obsoleta*, *Bacillus popilliae*, Scarabaeidae, entomopathogenic bacteria, Milky Spore Disease, biotest.

### SUMMARY

A commercial strain of *Bacillus popilliae* Dutky was used to test its biological activity against larvae of *Phyllophaga menetriesi* (Blanchard) and *Phyllophaga obsoleta* (Blanchard). Two experimental populations of *P. menetriesi*, one reared under laboratory conditions and the other taken from the field, were also evaluated for their susceptibility to the bacterium.

It was determined that both species can be infected with the Milky Spore Disease. However, the percentages of infection were very low. *P. menetriesi* larvae reared in the laboratory were infected only by intrahemocelic spore injection. Those collected in the field were infected by injection as well as by exposure to inoculated soil. Time for the appearance of symptoms was variable. *P. obsoleta* larvae were infected by intrahemocelic injection, but not by oral ingestion of spores. Yet, Milky Spore Disease symptoms appeared when bacteria obtained by artificial means were administered orally. Time for the appearance symptoms was similar in both cases.

Based on the results obtained in this study, it can be concluded that *P. menetriesi* and *P. obsoleta* possibly are not susceptible to the commercial strain of *B. popilliae* through normal infection routes.

## LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Mortalidad causada por *B. popilliae* en larvas de *P. menetriesi* criadas en el laboratorio....33
- Cuadro 2. Mortalidad causada por *B. popilliae* en larvas de *P. menetriesi* recolectadas en el campo.....38
- Cuadro 3. Mortalidad causada por *B. popilliae* en larvas de *P. obsoleta* recolectadas en el campo.....41
- Cuadro 4. Mortalidad causada por *B. popilliae* en larvas de *P. obsoleta* recolectadas en el campo, utilizando bacterias de cultivos *in vitro* administradas por 2 vías. ....43

## LISTA DE ANEXOS

- 1A. Especificaciones del insecticida Doom.....66
- 2A. Especificaciones del insecticida Grub Attack.....67

## I. INTRODUCCION

Las larvas del género *Phyllophaga* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae), conocidas como gallinas ciegas, jobotos o jogotos, constituyen uno de los problemas entomológicos más importantes en América Central.

Las características biológicas de estas plagas polífagas, provocan que el problema sea complejo, ya que los estadios dañinos no son visibles y frecuentemente se detectan cuando ya han causado daño a las partes subterráneas de la planta. Esto se traduce en una expresión de síntomas aéreos como el amarillamiento, la declinación en vigor y la muerte de la misma (Watts y Hatcher, 1954).

En Costa Rica, se cree que los jobotos ya atacaban los cultivos de los aborígenes en la época precolombina (Hilje *et al.*, 1985). En la actualidad son considerados como una de las plagas más importante en los cultivos de granos básicos, hortalizas (CATIE, 1985) y forestales (Hilje *et al.*, 1991).

El tipo de medida más recomendada para el combate de *Phyllophaga* es la utilización de insecticidas químicos, lo cual puede producir varios efectos nocivos desde el punto de vista ecológico y ambiental. Por lo tanto, es necesario evaluar la posibilidad del combate biológico de este insecto, mediante el uso de bacterias entomopatógenas, tales como *Bacillus popilliae*.

El efecto de la bacteria entomopatógena *B. popilliae* Dutky en el control natural de larvas de escarabeidos se conoce desde 1933 (Warren y Potter, 1983), cuando se descubrió que la misma era el agente causal de la "enfermedad lechosa" en el escarabajo japonés *Popillia japonica* Newman (Coleoptera: Scarabaeidae). Las larvas se infectan al ingerir las esporas bacterianas, las cuales germinan en el

intestino. Posteriormente, se presenta una invasión de la hemolinfa, en la cual las esporas se multiplican aceleradamente, alcanzando números de hasta  $20 \times 10^9$ /individuo (Dutky, 1940). Como producto de esta proliferación bacteriana, el color claro normal de la hemolinfa cambia a opaco, razón por la cual se le denomina enfermedad lechosa (Buchanan, 1951; Warren y Potter, 1983; Fuxa y Tanada, 1987).

La presente investigación pretendió evaluar la respuesta de *Phyllophaga menetriesi* (Blanchard) y *Phyllophaga obsoleta* (Blanchard) (Coleoptera: Scarabaeidae) a *B. popilliae* Dutky, basándose en los siguientes objetivos:

### 1.1. Objetivo General

Probar opciones de combate biológico contra larvas de *Phyllophaga* spp.

### 1.2. Objetivos específicos

Evaluar la respuesta de larvas de dos especies de tercer estadio de *Phyllophaga* a la cepa comercial de *Bacillus popilliae*.

Evaluar la respuesta de dos "grupos" de larvas de tercer estadio de *Phyllophaga menetriesi* -criadas en condiciones diferentes- a dosis crecientes de *Bacillus popilliae*.

## II. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. Características generales del género *Phyllophaga*

#### 2.1.1. Reconocimiento

Los adultos, conocidos como "abejones de mayo" son escarabajos que varían desde tonalidades de pardo sin lustre, pardo rojizo hasta bicoloreados sin lustre. El tamaño varía entre 9 y 29 mm, de acuerdo con la especie.

Las larvas, conocidas como gallinas ciegas, jobotos o jogotos son blancuzcas y de tipo escarabeiforme, es decir tienen forma de C, con la cabeza parda o rojiza. Pueden alcanzar longitudes de hasta 5 cm. Las patas torácicas son fuertes y bien desarrolladas, lo mismo que las mandíbulas (Andrews, 1984), lo cual les permite excavar con facilidad.

#### 2.1.2. Distribución

Existen especies económicamente importantes desde Estados Unidos hasta América del Sur (King y Saunders, 1984).

En América Central las especies de más comunes son: *P. parvisetis*, *P. hondura*, *P. elenans*, *P. menetriesi*, *P. obsoleta* y *P. vicina*. Las tres primeras completan su ciclo de vida en dos años y prefieren las regiones secas, mientras que las otras tres requieren de un año para completar su desarrollo y son más comunes en áreas de mayor precipitación. Su distribución parece estar ampliamente relacionada con la altitud y la cantidad y distribución de las lluvias (King, 1984).

*P. menetriesi*, especie de ciclo de vida de un año, está distribuida en toda América Central, pero es común solamente

en las zonas más húmedas y elevaciones intermedias de Costa Rica, con una distribución limitada a aquellas áreas que tienen una estación seca regular de al menos dos meses (King, 1982).

En Cartago, Costa Rica, se determinó que el mayor número de *P. menetriesi* se localizaba en suelos volcánicos, profundos y bien drenados en altitudes de 1300 a 1400 m. Esta especie es gradualmente reemplazada por *P. obsoleta* en altitudes sobre 1500 m y por *P. vicina* en las regiones más secas del país en elevaciones de 1500 m, aproximadamente (King, 1985).

### 2.1.3. Hospedantes

La lista de cultivos atacados por larvas de *Phyllophaga* es muy extensa, debido a la naturaleza polífaga de ellas. Entre los mismos se encuentran: maíz, sorgo, arroz de secano, frijol, solanáceas, camote, café, frutales y pastos (Andrews, 1984). También causan daños en estado de vivero en las siguientes especies forestales: ciprés (*Cupressus lusitanica*), guayaquil (*Albizzia guachapele*), melina (*Gmelina arborea*), pino caribe (*Pinus caribaea* var. *hondurensis*), pochote (*Bombacopsis quinatum*), ron-ron (*Astronium graveolens*) y teca (*Tectona grandis*) (Hilje *et al.*, 1991).

### 2.1.4. Ciclo de vida

En las especies cuyo ciclo de vida dura un año, los adultos emergen del suelo cuando se inician las lluvias. Son fuertemente atraídos hacia las plantas y los árboles de hojas anchas (ej. *Erythrina poeppigiana*, *Anona* sp., *Ceiba* sp., *Hibiscus* spp. y *Manihot esculenta*). Se alimentan y copulan

en estas plantas durante las primeras horas de la noche y regresan al suelo en el día, donde las hembras ovipositan.

Las hembras de *Phyllophaga* spp. depositan sus huevos en forma individual, envueltos en pequeñas partículas de suelo y son dejados en sitios que albergan hasta 26 huevos (Guppy y Harcourt, 1970). Además, depositan sus huevos a una profundidad de 10 a 20 cm, diseminados en un área de 20 cm y a la sombra de las plantas hospedantes o en zonas con altas concentraciones de materia orgánica (Morón, 1986).

Las larvas eclosionan del huevo en unas dos semanas y los primeros dos estadios se alimentan de materia orgánica y raíces tiernas por un período de cuatro a seis semanas. El tercer estadio dura de seis a ocho semanas y es durante este período (de junio a octubre) que ocasionan los mayores daños, al alimentarse de las raíces. La larva forma una celda en el suelo a una profundidad de 10-20 cm donde permanece hasta diciembre o enero. El período pupal tarda de dos a tres semanas. Los adultos que emergen precozmente, en enero o febrero permanecen en la celda hasta que el agua de las lluvias de abril o mayo penetra en el suelo y suaviza la capa de tierra que los envuelve (King, 1984).

Las especies con ciclo de vida de dos años, presentan un comportamiento similar al descrito anteriormente, pero al terminar el segundo estadio, la larva entra en una fase de latencia en una celda en el suelo. Al iniciarse las lluvias nuevamente, muda y en el tercer estadio se alimenta de las raíces, entre mayo y setiembre. El período pupal termina en febrero o marzo (Andrews, 1984; King y Saunders, 1984).

## 2.2. Fenología de los adultos de *Phyllophaga menetriesi*

*P. menetriesi* es la especie más común en Costa Rica, excepto en las zonas altas. Probablemente constituye la especie de mayor importancia económica (King 1980a).

Los adultos permanecen en el interior de sus celdas hasta las primeras lluvias de abril, cuando empiezan a emerger del suelo (King, 1984). En Turrialba, el principal período de vuelo se presenta entre marzo y mayo (King 1980a, 1980b, 1981, 1982). No obstante, Funes (1990), encontró que en esta misma zona, la época de mayor captura de adultos se extiende desde las últimas semanas de marzo hasta mediados de junio. El vuelo está claramente relacionado con el inicio de las lluvias.

Ambos sexos emergen del suelo y comienzan a volar a la hora crepuscular (17:45 horas, en abril). Las hembras vírgenes se ubican en el follaje a 30 o 60 cm del suelo y adoptan una posición característica de "llamado". Los machos vuelan en los alrededores en búsqueda de las hembras, copulando inmediatamente. El macho se cuelga en forma invertida de la genitalia de la hembra. La cópula dura de 10 a 15 min y luego ambos vuelan en busca del follaje de plantas de yuca o árboles de poró (King, 1980a).

Después del período de alimentación, que dura de una a varias horas, los escarabajos vuelan distancias relativamente cortas o permanecen en el suelo para descansar u ovipositar. La mayoría de los huevos se encuentran en las proximidades de las plantas que les sirven de alimento, lo cual indica que la dispersión es limitada (King, 1980a).

Después de alimentarse, las hembras vuelan hacia el suelo, en donde se entierran para ovipositar. Una hembra puede poner hasta 200 huevos (King, 1984).

En el caso de *P. menetriesi* existe una marcada preferencia por ovipositar en suelos con coberturas de pastos y malezas en vez de suelos desnudos (King, 1985).

### 2.3. Importancia económica

En América Central las larvas de *Phyllophaga* atacan una gran variedad de cultivos, que incluyen desde plantaciones de café (Contreras y León, 1974) hasta granos básicos (King y Saunders, 1979) y forestales (Hilje *et al.*, 1991). Los pequeños agricultores son los que sufren la mayoría de las pérdidas. En Costa Rica, el ataque de *Phyllophaga* produce pérdidas en los siguientes cultivos: arroz de secano, café, frijol, maíz, papa y repollo (CATIE, 1985).

Las larvas del tercer estadio se alimentan de las raíces y tubérculos de las plantas. La distribución del daño se presenta en parches y generalmente restringida a los meses de junio hasta octubre (King y Saunders, 1984). Las plantas cuyas raíces han sido podadas por las larvas no crecen bien, muestran síntomas de deficiencias de agua y nutrientes, son susceptibles al acceso de fitopatógenos y al "acamado" y se ven afectadas en el rendimiento (Ríos y Romero, 1982; Andrews, 1984; King y Saunders, 1984).

King (1985), en ensayos realizados en Turrialba, Costa Rica, estableció que 4,45 plántulas de maíz se pierden por larva por m<sup>2</sup>, lo cual equivale aproximadamente a 170 kg de grano seco/ha.

Watts y Hatcher (1954), reportan que poblaciones de pino en EE.UU., han sido destruidas en un 60% por daños ocasionados por *Phyllophaga*.

En ensayos realizados en Jalisco, México, se determinó que en el testigo del ataque de *Phyllophaga* y *Diabrotica*, se redujo la población de plantas de maíz en aproximadamente un 50% en relación con el mejor insecticida aplicado (Romero y Ríos, 1978).

Se ha encontrado (INIA, 1977) que en aplicaciones al momento de la siembra del maíz, bajo infestación de *Phyllophaga* y elatéricos, el testigo tuvo 57% menos plantas que el mejor tratamiento con insecticida. El rendimiento disminuyó en un 67%, ya que el testigo produjo 0,5 t/ha contra 1,5 t/ha en el tratamiento con insecticida que se comportó mejor.

Ríos y Romero (1982) en experimentos con maíz realizados en México con *Diabrotica virgifera*, *Phyllophaga dentex*, *Phyllophaga ravidia* y gusanos de alambre (Coleoptera: Elateridae), determinaron que la presencia de una sola larva en el área radicular provoca una disminución del rendimiento en un 7,54%, lo cual equivale a 353 kg/ha.

#### 2.4. Medidas de combate

La mayoría de la literatura reporta que el principal método de combate de *Phyllophaga* es el químico (Morales, 1966; Contreras y León, 1974; King y Saunders, 1979; Andrews, 1984; CATIE, 1985). En décadas anteriores los principales insecticidas que se aplicaban para el combate de esta plaga eran los organoclorados, especialmente el aldrín, dieldrín y heptacloro (Contreras y León, 1974; King y Saunders, 1979), que funcionaban muy bien debido a su gran residualidad.

En años más recientes un gran número de productos químicos han sido recomendados para su control. Entre los granulados aplicados al momento de la siembra se encuentran

el foxim, carbofuran, clorpirifos, y etoprofos (Andrews, 1984). En Costa Rica, uno de los insecticidas más usados por los productores de hortalizas para el combate de *Phyllophaga* es el clorpirifos (Hilje y Cartín, 1990).

## 2.5. Métodos de cría de escarabeidos en condiciones de laboratorio

Es muy importante para la cría de escarabeidos que al transportar los adultos capturados hacia el laboratorio, estén protegidos del calor excesivo y la desecación (Fox y Ludwig, 1937) . Debe evitarse la aglomeración de los mismos en los recipientes. Antes de ubicar los insectos en los recipientes de cría, es recomendable colocar algunas ramas de sus plantas preferidas para que les sirvan de apoyo y trozos de frutas suculentas para su alimentación. Para la obtención de huevos se puede utilizar recipientes de 30 cm, con suelo fino previamente tamizado y una humedad moderada. El exceso de humedad no favorece la oviposición y puede dificultar la extracción de los huevos. Estos se remueven del suelo con ayuda de un tamiz. Las larvas pueden ser colocadas en envases de metal con capacidad de 1 oz. No es conveniente ubicar más de una larva por envase por problemas de canibalismo. El medio usado en los recipientes de crianza debe estar esterilizado y tamizado. Puede ser de composición variada, pero que tenga una adecuada capacidad para retener humedad y a la vez que sirva de alimento para las larvas. Para este doble propósito es recomendable agregar material vegetativo molido de diferentes partes de la planta. El alimento debe ser removido periódicamente.

Muchos autores (Dutky, 1941b, 1963; Beard, 1944; Haynes *et al.*, 1961; Tashiro y Steinkraus, 1966; Weiner *et al.*, 1966; Ladd y McCabe, 1967; Hall *et al.*, 1968; St. Julian *et al.*, 1970; Dumbar y Beard, 1975) señalan la importancia de

agregar semilla de pasto y trébol blanco como fuente de alimento a las larvas del escarabajo japonés, *P. japonica*, que crecen en condiciones de laboratorio. Goonewardene y Mckay (1969) y Goonewardene y Zepp (1969, 1970) para la cría de larvas del escarabajo japonés, citan la utilización de bolsas de polietileno con una mezcla de volúmenes iguales de vermiculita, arena, limo y turba. La misma debe estar sembrada con *Agrostis alba*, *Triticum sativum* o *Lolium perenne* y ser humedecida periódicamente con agua destilada.

Fowler (1974) utilizó medios de suelo y vermiculita en proporciones de 1:2 y una mezcla de suelo, estiércol de oveja y vermiculita en proporciones de 1:1:4 para criar larvas de *Costelytra zealandica* en condiciones de laboratorio. Las mismas fueron alimentadas con raíces de pasto y trozos de zanahoria. Milner (1974) también usó este tipo de alimento para larvas de *Rhopaea verreauxi*, pero en turba húmeda como substrato. Boucias *et al.* (1986) criaron larvas de *Ligyris subtropicus* y *Cyclocephala parallela* en recipientes plásticos a 23° C y las alimentaron con trozos de zanahoria.

King (1980a, 1980b, 1982, 1985) reporta que para la crianza de larvas de *P. menetriesi*, *P. obsoleta* y *P. vicina*, se debe usar una mezcla de suelo arcillo-limoso con bagazo de caña en estado de descomposición en una proporción de 1:1. También es necesario sembrar plántulas de maíz que sirvan como fuente de alimento.

#### 2.5.1 Cría de larvas de *P. menetriesi* en el laboratorio

King (1980a) crió individuos de *P. menetriesi* en condiciones de laboratorio, colocando larvas individuales en recipientes que contenían una mezcla de suelo y bagazo de caña en una proporción de 1:1 en la cual se sembró maíz. La mortalidad fue alta y casi enteramente concentrada en el

primer estadio. Se considera que un suelo con alto contenido de materia orgánica es la única condición necesaria para la supervivencia de los primeros dos estadios de *Phyllophaga* spp. En condiciones de campo la mayoría de las larvas se han encontrado en suelos con "mulch" y en lugares donde muchos residuos de materia orgánica se han incorporado. La supervivencia de *P. menetriesi* fue mayor en suelos ricos en materia orgánica y las larvas jóvenes fueron capaces de sobrevivir sin la presencia de raíces vivas por lo menos una semana King (1980a). No obstante dichas raíces constituyen una importante fuente de alimento para las larvas jóvenes.

## 2.6. Control de escarabeidos con *B. popilliae*

El control natural de larvas de escarabeidos por la bacteria entomopatógena *B. popilliae* Dutky se conoce desde hace más de 50 años (Dutky, 1940; White, 1940, 1941; White y Dutky, 1940, 1942; Easter, 1947). Constituye el primer agente de control biológico registrado por el Departamento de Agricultura de los EE.UU (USDA), en 1950 (Upholt, 1973; Lundholm y Stackerud, 1980).

*B. popilliae*, agente causal de la enfermedad lechosa en el escarabajo japonés (*P. japonica*) y el escarabajo oriental (*Anomala orientalis*), ha sido utilizada exitosamente para el control de estas plagas en los EE.UU desde 1939 (Dutky, 1963; Fuxa y Tanada, 1987). Fuxa (1987) cita el uso de este patógeno, como el primer ejemplo de control de una plaga introducida por un organismo nativo.

White (1941) indica la importancia de esta enfermedad al actuar como agente de control natural del escarabajo japonés en áreas muy infestadas. Sus datos muestran un rápido crecimiento de la enfermedad en las mismas y una disminución de la población correspondiente a tal incremento.

En Connecticut, EE.UU., el control fue eficaz hasta 1962, pero en 1974 la población de insectos aumentó a pesar del extensivo establecimiento del inóculo en el suelo. Dumbar y Beard (1975) encontraron que la infectividad de las esporas de *B. popilliae* había disminuido significativamente, y sugirieron que las larvas habían desarrollado resistencia. No obstante, Klein (1986) señala que un promedio de larvas de 75% desarrolló la enfermedad mediante un proceso de incubación en suelos de diez sitios de Connecticut. Se concluyó que no hay evidencia de que las larvas de ese lugar mostraran resistencia a las esporas de *B. popilliae* encontradas en esa zona. También se notó que las larvas que no desarrollaron la infección presentaban síntomas de toxicidad por insecticidas. Las dosis subletales de los hidrocarburos clorados pueden haber causado que las larvas murieran antes de que se completara la esporulación.

Hutton y Burbutis (1974) en muestreos realizados en Delaware, EE.UU., en aquellos sitios que habían sido inoculados en la década de los 40, encontraron que la enfermedad lechosa estaba todavía presente y virulenta. Estas zonas estaban "produciendo" larvas infectadas; su población larval era más baja y la tasa promedio de infección más alta (26%) que en otras áreas (7%).

Datos presentados por Polivka (1956) de muestreos realizados en Ohio, EE.UU., indicaron que la enfermedad lechosa juega un papel muy importante en el mantenimiento de la población larval del escarabajo japonés en un bajo nivel. Muestreos efectuados en pastizales de Florida (Harris, 1959) indicaron que en menos de un mes, el número de larvas de *Cyclocephala borealis*, disminuyó de 9 a 0.5 por pie<sup>2</sup>. El porcentaje de larvas enfermas aumentó de un 17% a un 52%.

Hanula y Andreadis (1988) realizaron muestreos de varias especies de escarabeidos en Connecticut, encontrando que los

microorganismos *B. popilliae* y *Rickettsiella popilliae* eran patogénicos, pero juntos afectaban menos del 6% de las larvas examinadas. No obstante, de acuerdo con Anderson y May (1981), el bajo predominio está inversamente relacionado con la patogenicidad, de manera que patógenos muy virulentos que contribuyen en forma significativa a regular la población, generalmente están caracterizados por un bajo predominio.

Vora y Ramakrishnan (1978) reportaron que las aplicaciones bacteriales realizadas en áreas endémicas del escarabeido *Holotrichia consanguinea*, en la India, infectaron de un 35% a un 60.7% de la población larval en 1977 y de un 20 a un 75% en 1977. Ferron *et al.*, (1969) reportaron la existencia de un sinergismo cuando larvas de *Melolontha melolontha* fueron infectadas primero con *B. popilliae* y luego con *Beauveria tenella*. Sharpe y Detroy (1979) agregan que de algún modo la enfermedad lechosa causó que las larvas del escarabajo japonés se volvieran susceptibles a *Bacillus thuringiensis*. Posiblemente el jugo intestinal desarrolló la alcalinidad suficiente para solubilizar y activar el cristal.

Las infecciones dobles con diferentes razas de *B. popilliae* pueden tener un efecto antagónico. Beard (1946) reportó que una raza de subespecie *popilliae* inhibió el crecimiento de una de subespecie *lentimorbus* en larvas de *P. japonica*. Parece que ambos patógenos no se desarrollan simultáneamente en el mismo hospedero.

Por otro lado, la enfermedad se establece lentamente en el campo (de dos a cuatro años) cuando las larvas ingieren las esporas del suelo infestado. Una vez que la larva muere libera de 1 a 2 x 10<sup>9</sup> esporas (Fleming, 1968).

Adams y Wheeler (1946) indicaron que bajo las condiciones climáticas de Nueva York, la reducción de la población de *P. japonica* a un nivel satisfactorio, requiere

cerca de 4 años a una dosis de 4 libras de polvo de esporas/acre (0.73 kg/ha). Agregaron que el establecimiento de la enfermedad lechosa en el campo es más lenta conforme la latitud aumenta.

Cuando la bacteria se establece en el suelo, se presenta un balance entre el número de hospedantes y la densidad del patógeno a través de un mecanismo de retroalimentación. Si se presenta una alta población de larvas, el número de esporas aumenta en el suelo cuando las larvas mueren, de manera que la posibilidad de sobrevivencia larval disminuye. Una reducida población de hospedantes implica una población menor del patógeno y por ende una disminución de la posibilidad de infección para una determinada larva (Fuxa y Tanada, 1987).

La enfermedad lechosa en el escarabajo japonés no se establece hasta que la población larval es alta, pero cuando la misma se desarrolla la población disminuye y se mantiene en ese nivel (White, 1941).

### 2.6.1. Epizootiología

*B. popilliae* fue aislada y descrita por Dutky (1940). Es un bacilo delgado, no mótil, formador de esporas, las cuales se caracterizan por la presencia de un cuerpo parasporal refringente dentro de un esporangio henchido. El cuerpo parasporal, estrechamente adherido a la espora, consiste en una inclusión romboidal en un substrato amorfo cuyos límites no están bien definidos. El esporangio no cuenta con constituyentes citoplásmicos y la membrana plasmática y la pared celular no pueden ser consideradas como estructuras individuales (Black, 1968a).

*B. popilliae* produce el estado patológico conocido como el nombre de "enfermedad lechosa tipo A" en el escarabajo japonés *P. japonica* (Warren y Potter, 1983). Fue descubierta en Nueva Jersey, EE.UU.; probablemente era una enfermedad nativa que se transmitió rápidamente a dicho escarabajo. El origen exacto no se conoce, a pesar de que diferentes razas de la bacteria han sido encontradas infectando larvas de otros escarabeidos (White, 1947; Buchanan, 1951) en Nueva York (Adams, 1949a, 1949b; Tashiro y White, 1954; Tashiro, 1957), Florida (Harris, 1959; Boucias *et al.*, 1986), Francia (Hurpin y Robert, 1972), la India (Vora y Ramakrishnan, 1978; Vyas *et al.*, 1986), Australia (Beard, 1956; Milner, 1976) y Nueva Zelanda (Dumbleton, 1945; Fowler, 1974).

Las enfermedades lechosas constituyen el único grupo de bacterias aeróbicas y formadoras de esporas que además de ser patógenos obligados, se encuentran exclusivamente en coleópteros de la familia Scarabaeidae (Milner, 1974).

Las larvas se infectan al ingerir las esporas bacterianas, las cuales germinan en el intestino. Las células vegetativas inducen infecciones localizadas en el tejido epitelial. Posteriormente, se presenta una invasión del hemocele a través de una necrosis de la pared intestinal (Splittstoesser *et al.*, 1973).

En la hemolinfa las esporas se multiplican aceleradamente, alcanzando números de hasta  $20 \times 10^9$ /individuo (Dutky, 1940), sin ocasionar cambios apreciables en el pH de la misma (Steinkraus, 1957a; Weiner *et al.*, 1966). Como producto de esta proliferación bacteriana, el color claro normal de la hemolinfa cambia a opaco, razón por la cual se le denomina enfermedad lechosa (Buchanan, 1951; Warren y Potter, 1983; Fuxa y Tanada, 1987).

La invasión y multiplicación de la bacteria en la hemolinfa causan septicemia, pero la infección crónica prolongada y la no detección de ninguna toxina, sugiere la presencia de una bacteremia (Fuxa y Tanada, 1987). El cuerpo parasporal de este bacilo no se considera tóxico, pero Weiner (1978), demostró que adquiere esta característica cuando es solubilizado e inoculado en la hemolinfa.

El desarrollo de la enfermedad lechosa presenta cuatro fases (St. Julian *et al.*, 1970, 1973). La fase I, de dos días de duración, se caracteriza por el estado de incubación inicial, durante el cual pocas células bacterianas aparecen en la hemolinfa. La fase II corresponde al estado de proliferación vegetativa y continúa hasta el quinto día. La fase III (del quinto al décimo día), marca un cambio intermedio entre el crecimiento predominantemente vegetativo y el desarrollo de esporas. Finalmente se presenta la fase de esporulación, o fase IV, que implica la esporulación masiva y la sucesiva muerte de la larva. Esta etapa se extiende del día 14 al 21.

La transición de células vegetativas a esporas (fases III y IV) demanda una gran cantidad de compuestos energéticos e intermedios. Como éstos deben ser "drenados" de la hemolinfa, su disponibilidad para la larva se reduce, ocasionando la muerte de la misma (Bulla y St. Julian, 1972). Vora y Ramakrishnan (1978) indicaron que la enfermedad reduce el contenido de proteína de la hemolinfa en un 63.8%.

St. Julian *et al.* (1972) encontraron que menos del 30% de las larvas infectadas sobreviven a la fase IV. Las larvas mueren en todas las etapas de la enfermedad, pero el mayor porcentaje de mortalidad se presenta en las fases II y III.

Una larva enferma contiene un promedio de  $5 \times 10^{10}$  esporas/ml de hemolinfa. De esta manera las poblaciones

masivas de esporas que caracterizan la enfermedad lechosa, son el resultado de la acumulación de las mismas, durante un prolongado período de crecimiento vegetativo y esporulativo que ocurre en forma simultánea (St. Julian *et al.*, 1970, 1973).

La infección generalmente es fatal, ya que las células bacterianas esporulan por millones y se liberan en el suelo con la desintegración de la larva (Buchanan, 1951). Las esporas le permiten a este patógeno sobrevivir en forma latente por largos períodos en el suelo y constituyen a la vez el medio de diseminación de la enfermedad (St. Julian *et al.*, 1973).

Los pájaros, pequeños mamíferos y otros insectos como hormigas y avispas ayudan a diseminar las esporas bacterianas, ya que se alimentan o parasitan el escarabajo japonés (White y Dutky, 1940). El descubrimiento de la enfermedad lechosa en los insectos adultos de *P. japonica* indica otro medio de diseminación del patógeno (Langford *et al.* 1942). El movimiento del suelo infestado por el agua, el viento y las prácticas culturales, también constituyen factores importantes de diseminación (Beegle, 1986).

La transmisión se presenta cuando las larvas infectadas mueren y se descomponen, creando focos locales de altas concentraciones de esporas, las cuales se mantienen adheridas a las partículas del suelo (Beegle, 1986).

White (1940) señala que la habilidad de esta bacteria para soportar condiciones adversas de humedad y sequedad, así como su permanencia una vez establecida, aumentan su valor como un factor de combate de *P. japonica*. En el suelo (White y Dutky, 1942) las esporas no están sujetas a la radiación ultravioleta o a temperaturas extremas que afectan negativamente a la mayoría de los entomopatógenos.

Bonnefoi *et al.* (1959) y Beard (1945) en estudios realizados sobre resistencia al calor, encontraron que las esporas de *B. popilliae* sobrevivieron por una hora a 70° C.

Rhodes (1965) señala que la resistencia al calor no constituye un beneficio particular para este organismo en la naturaleza, mientras que la resistencia a la desecación es una característica fundamental para su supervivencia en el suelo.

White (1948) indica que la utilización de fertilizantes comerciales en mezcla con las esporas de *B. popilliae* no afecta o reduce la viabilidad de las mismas. En contraste, Rao y Veeresh (1988) probando la influencia de los abonos orgánicos sobre la incidencia de la infección de *B. popilliae* en larvas del escarabeido *Holotrichia serrata*, encontraron que la misma fue mayor (45%) en suelos tratados con abono de ganado vacuno, en comparación con aquellos tratados con abono de aves de corral (36.67%), de caballo (28.33%), de oveja (21.67%) y de cerdo (18.33%). De los tres estadios larvales examinados, el segundo fue el más vulnerable a la infección.

Las esporas de *B. popilliae* persisten en el suelo de 2 a 7 años, pero el patógeno permanece en los sitios de colonización hasta 25 años después de su aplicación (Hurpin 1959, 1967; Ladd y McCabe, 1967; Hutton y Burbutis, 1974); ello sugiere que la infección de los escarabajos que invaden los mismos, mantienen el inóculo en el suelo (Klein, 1981).

St. Julian *et al.* (1978) almacenaron esporas de *B. popilliae* por un período de siete años, bajo tres condiciones diferentes: congeladas en agua estéril, secadas en portaobjetos y almacenadas en suelo limoso. Sus resultados mostraron una disminución significativa en el porcentaje de infección de larvas de *P. japonica* en las tres condiciones,

concluyéndose que las esporas "viejas" de *B. popilliae* son mucho menos infectivas que las "jóvenes"

El ámbito de temperatura para el desarrollo de *B. popilliae* en el escarabajo japonés parece estar entre 15.5 y 36° C (Dutky, 1940, 1963). Hurpin (1968) encontró que en suelos inoculados con *B. popilliae* subsp. *melolonthae*, la temperatura óptima para el desarrollo de la bacteriosis en larvas de tercer estadio de *M. melolontha* es de 20° C, mientras que Milner (1974) encontró un límite superior a los 30° C en el caso de *R. verreauxi*. Por otro lado, Vora y Ramakrishnan (1978) reportaron el máximo desarrollo de la enfermedad a una temperatura de incubación de 20° C para *Holotrichia consanguinea*.

Tashiro y White (1954) trabajando con dos razas de *B. popilliae* y una de *B. lentimorbus* en el escarabajo *Amphimallon majalis*, encontraron que la tasa de infección de la enfermedad aumentó con la temperatura. St. Julian y Hall (1968) demostraron que el calor aumenta la capacidad de infección de las esporas de *B. popilliae*.

Tashiro (1957) señala que la falta de una mayor eficacia de la enfermedad lechosa en el campo, bajo las condiciones de Nueva York, puede ser causada por las bajas temperaturas del suelo imperantes durante la estación activa de alimentación de la larva, en otoño y primavera.

Dutky (1941b) señala que en especies susceptibles, cerca del 60-75% de las larvas en suelos inoculados debe desarrollar síntomas visibles de la enfermedad en un período de un mes.

### 2.6.2. Patogenicidad de *B. popilliae* en diferentes especies de escarabeidos

Dutky (1941a), reporta que la bacteria *B. popilliae* ha sido inoculada en otras especies de escarabeidos que mostraron ser susceptibles. Entre éstas figuran: *A. orientalis*, *Autoserica castanea*, *Cyclocephala borealis*, *P. anxia*, *P. bipartita*, *P. ephilida*, *P. fusca*, *P. rugosa*, *Strigoderma arboricola* y *Strigodermella pygmaea*. Estudios preliminares han demostrado que *P. anxia*, *P. fusca* y *P. rugosa* son susceptibles a la enfermedad lechosa tipo A en su segundo estadio. *B. popilliae* ataca indiscriminadamente todos los estadios de *P. japonica* (Beard, 1945) y *M. melolontha* (Hurpin, 1959).

Tashiro y White (1954) informan del descubrimiento de larvas del género *Phyllophaga* infectadas con la enfermedad lechosa en Nueva York.

Hall *et al.* (1968) encontraron que tanto las larvas de *P. japonica* criadas en laboratorio, como aquellas colectadas en el campo muestran igual susceptibilidad a *B. popilliae*.

Dutky (1941b) recomienda que para pruebas de alimentación en condiciones de laboratorio, las larvas deben colocarse en un suelo que contenga aproximadamente  $2 \times 10^9$  esporas/kg. Esta dosis es suficiente para obtener de un 65 a un 75% de larvas infectadas.

Beard (1944) estableció una relación lineal entre el contenido de esporas en el suelo y la tasa de infección en larvas de tercer estadio de *P. japonica*. Una concentración aproximada de  $2 \times 10^6$  esporas/g de suelo produjo la infección del 50% de las larvas. Asimismo, obtuvo un 50% de infección en larvas de tercer estadio de *P. japonica*, incubadas por dos semanas y media a  $25^\circ \text{C}$  en suelos inoculados con  $2 \times 10^9$

esporas de *B. popilliae*/kg. Bajo las mismas condiciones, pero con larvas de tercer estadio de *A. majalis*, Tashiro y White (1954) alcanzaron un poco más del 50% de infección.

St. Julian *et al.* (1970) reportan un 50% de larvas enfermas de *P. japonica* a una temperatura de 29° C, utilizando  $1 \times 10^9$  esporas de *B. popilliae*/g de suelo.

Beard (1945) encontró que aproximadamente el 96% de las larvas de *P. japonica* se enfermaban cuando se mantenían en suelo inoculado con  $4 \times 10^6$  esporas frescas/g.

De acuerdo con Dutky (1963) una dosis de  $2 \times 10^9$  esporas/kg de suelo a una temperatura de 30° C, causa cerca de un 84% de larvas enfermas después de 28 días. En contraste, Schwartz y Sharpe (1970) obtuvieron un 60% de larvas infectadas, utilizando esporas producidas comercialmente a esa misma dosis.

Weiner *et al.* (1966) reportan un 20% de infección en larvas de *P. japonica*, utilizando dosis de  $1-10 \times 10^6$  esporas/g de suelo.

Tashiro (1957) colocó larvas de tercer estadio de *P. japonica* y *A. majalis* en suelo húmedo inoculado con  $1 \times 10^9$  de esporas de tres razas (dos de *B. popilliae* y una de *B. lentimorbus*)/kg de suelo seco. Sus resultados mostraron que después de tres semanas de incubación a 21° C, el 81% de las larvas de *A. majalis* estaban "lechosas" en contraste con solo el 1% de *P. japonica*.

Steinkraus y Tashiro (1955) realizaron pruebas de alimentación con larvas de *A. majalis* incubadas en suelo con  $1 \times 10^9$  esporas/kg. A los 21 días de exposición, el 92% de las larvas habían desarrollado la enfermedad.

Larvas de tercer estadio de *A. majalis* incubadas a 27° C en suelo húmedo, fueron utilizadas para probar la virulencia de seis razas de *Bacillus* (tres de *B. popilliae*, dos de *B. lentimorbus* y una de *B. euloomarahae*). Los resultados indican que la raza "DeBryne" de *B. popilliae* tuvo la mayor virulencia en esta prueba por ingestión, un 98% en cuatro semanas (Tashiro y Steinkraus, 1966).

Jarvis (1966) colocó larvas de *P. anxia* en un suelo inoculado con esporas comerciales de *B. popilliae* a una dosis de  $1 \times 10^9$  esporas/kg, durante un período de treinta días. Esta prueba preliminar mostró que las larvas del segundo y tercer estadio son susceptibles a la enfermedad lechosa.

Warren y Potter (1983) obtuvieron 55 y 64% de infección utilizando concentraciones de  $4.8 \times 10^5$  y  $4.8 \times 10^6$  esporas de *B. popilliae* raza *Cyclocephala/g* de suelo en larvas de *Cyclocephala immaculata*.

### 2.6.3. Producción comercial de *B. popilliae*

*B. popilliae* necesita tiamina, biotina y varios aminoácidos para su desarrollo, pero sólo muestra crecimiento vegetativo y algún grado de esporulación en medio artificial (Steinkraus, 1957b; Rhodes, 1965). Bajo condiciones óptimas, aproximadamente un 3% de las células en las colonias completan el proceso de esporulación (Rhodes, 1965).

Gran número de investigaciones se han realizado con el objetivo de producir esporas infectivas *in vitro*, pero es poco el éxito que se ha logrado (Haynes *et al.*, 1961; Hrubant y Rhodes, 1968; Bennett *et al.*, 1968; Black, 1968b; Lüthy *et al.*, 1970; Bennett y Shotwell, 1972; Haynes y Weih, 1972; Bhumiratana *et al.*, 1974).

La producción de esporas virulentas sólo se garantiza en hospederos susceptibles, como resultado de una infección (Klein 1981, 1986).

Para la producción en masa de esporas *in vivo*, el inóculo es inyectado intrahemocélicamente en larvas o adultos. Este procedimiento requiere un período de incubación mucho más corto que el suministro de alimento inoculado a las larvas (Fuxa y Tanada, 1987). Las esporas así obtenidas se mezclan con carbonato de calcio y un diluyente para su aplicación en el campo. Cada gramo de la mezcla contiene aproximadamente 100 millones de esporas viables (Steinhaus, 1957; Briggs, 1963; Fleming, 1968).

Las preparaciones de *B. popilliae* han estado disponibles en el mercado desde 1945 bajo los nombres comerciales de Japidemic y Doom (Steinhaus, 1957; Ignoffo, 1973). Esta intensiva labor de producción ha provocado que los productos a base de *B. popilliae* sean caros (de \$150 a \$400 dólares/acre) (Klein, 1988). Shetlar *et al.* (1988) y Potter y Braman (1991), indicaron que la bacteria *B. popilliae* es eficaz, pero se ha hecho poco uso del producto comercial, porque es difícil de aplicar, poco confiable, caro, no está disponible en grandes cantidades y necesita un largo período de establecimiento para su control. Las formulaciones comerciales han sido relativamente caras debido a que su producción requiere la colecta a mano de las larvas e inoculación individual de cada una de ellas. Además, un atributo crucial de cualquier agente de control biológico es que debe ser capaz de producirse en gran escala en una forma virulenta (Rhodes, 1965).

No obstante, según estudios recientes (Klein, 1988; Reuter Laboratories Inc., 1989; Obenchain y Ellis, 1991), la producción de esporas infectivas en medio artificial ha dado resultado. La fermentación en gran escala para la producción

de *B. popilliae* podría aumentar su disponibilidad y reducir el costo de las formulaciones. Si este nuevo método es exitoso se solucionaría uno de los problemas más grandes para el uso de los productos a base de este patógeno y mejores formulaciones podrían ser desarrolladas. Los métodos de producción *in vitro* también podrían hacer formulaciones bacteriales comerciales que tuvieran la cualidad de ser infecciosas para otras especies de escarabeidos (Reuter Laboratories Inc., 1989).

#### 2.6.4. Ventajas de la utilización de *B. popilliae*

Todas las pruebas de seguridad convencional realizadas con *B. popilliae* han resultado negativas, es decir no infecta las abejas, mamíferos o personas relacionadas con su manipulación (Ignoffo, 1973; Heimpel y Hrubant, 1973; Obenchain y Ellis, 1991). Ninguna evidencia de producción de toxinas ha sido encontrada en dichas pruebas ni en estudios sobre la etiología del patógeno en sus plagas hospedadas. De esta manera, *B. popilliae* no puede infectar al hombre ni a vertebrados útiles. Probablemente sólo ataca a los coleópteros de la familia Scarabaeidae (Burges, 1980).

### III. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Localización

El experimento se efectuó en las instalaciones del Laboratorio de Entomología de la Sede Regional del Atlántico de la Universidad de Costa Rica en Turrialba, Costa Rica, entre abril y diciembre de 1991. Turrialba se encuentra a 9° 53' N y 83° 39' O, a 600 msnm. En la región se presenta una precipitación anual de 2.763 mm y una temperatura promedio anual de 22,6° C. La zona corresponde a la formación bosque muy húmedo premontano (Holdridge, 1978). El promedio de temperatura de la sala de laboratorio de fue de 22° C.

#### 3.2. Descripción del trabajo y material experimental

Se utilizaron dos "grupos" de *Phyllophaga menetriesi*, una críado en condiciones de laboratorio y otra colectado en el campo. Se evaluó la respuesta del tercer estadio a *B. popilliae*, mediante la aplicación de seis concentraciones del insecticida biológico "Milky Disease Spore" (Doom), que contiene 100.000 esporas de ingrediente activo/g de producto comercial (Farm Chemical Handbook, 1991).

#### 3.3. Etapas de investigación

La investigación constó de cuatro etapas: la captura de adultos y obtención de huevos, la cría de larvas para obtener el tercer estadio necesario para el experimento, la colecta de larvas en el campo y la aplicación del producto bacterial.

### 3.3.1. Etapa I. Captura de adultos y obtención de huevos.

Para capturar adultos y reproducirlos en condiciones de laboratorio, se colocó desde mediados de marzo una trampa de luz de 20 watts, tipo "Pennsylvania", en la Estación Experimental La Montaña, del CATIE. Funes (1990), utilizando el mismo tipo de trampa, encontró que en Turrialba, la época de mayor captura de adultos de *Phyllophaga* spp., se extiende desde las últimas semanas de marzo hasta mediados de junio.

No obstante, el número de adultos capturados con la trampa fue bajo, tanto con luz blanca como con luz negra. Por esta razón, se decidió coleccionar los insectos en forma manual. Para ello se visitó La Montaña todos los días de 6 p.m. a 8:30 p.m., desde el 20-IV-91 al 15-V-91. Los adultos se capturaron en los árboles de poró (*Erythrina* spp.), se colocaron en envases plásticos y se trasladaron al laboratorio. La especie fue identificada por medio de la genitalia del macho.

Una vez en el laboratorio, los insectos capturados fueron sexados e introducidos por parejas en recipientes de plástico de 26 cm de diámetro en su parte superior, 21,5 cm en su parte inferior y 24 cm de altura. Cada recipiente contenía 6 cm de suelo proveniente de La Montaña, humedecido con agua destilada. El mismo había sido secado previamente a temperatura ambiente, tamizado en malla de 4 mm y esterilizado a 150° C durante 24 h. Para la alimentación de los abejones, se colocaron brotes y hojas de poró en agua destilada, los cuales fueron removidos periódicamente, conforme los insectos los consumían o se marchitaban.

Cuando las hembras empezaron a ovipositar, los huevos se recolectaron diariamente y se colocaron por medio de una espátula acanalada en bandejas de plástico de 40 cm de largo,

25 cm de ancho y 5 cm de profundidad. Estas bandejas, contenían una mezcla de suelo y bagazo de caña en estado de descomposición, en una proporción de 1:1 (King, 1980a, 1985), humedecida con agua destilada. La mezcla se esterilizó en autoclave a una temperatura de 130° C y a 2,2 kg/cm<sup>2</sup> de presión. El suelo y el bagazo fueron secados previamente a temperatura ambiente hasta obtener un 12% de humedad. El bagazo se molió a un grosor de partícula de 1 mm y el suelo se tamizó en una malla de 4 mm antes de realizar la mezcla.

Esta etapa abarcó los meses de marzo, abril, mayo y la mitad de junio.

### 3.3.2. Etapa II. Cría de larvas

Cuando las larvas eclosionaron, el bagazo mezclado con el suelo les sirvió de fuente de alimento. La mortalidad en este primer estadio fue muy elevada, de hasta un 80%. Este dato concuerda con los obtenidos por King (1980a) para esta especie.

Las larvas permanecieron en las bandejas de plástico aproximadamente 15 días y luego se colocaron en forma individual en recipientes de vidrio de 7 cm de diámetro y 12,5 cm de altura. Cada envase contenía 5 cm de mezcla esterilizada de suelo y bagazo y tres plántulas de maíz, cuyas semillas habían sido pregerminadas en la Cámara de Pregerminación del Laboratorio de Semillas del CATIE.

Las larvas se revisaron frecuentemente para determinar si estaban sanas y verificar a la vez, su estado de desarrollo, vaciando el contenido de los recipientes en bandejas plásticas. Aquellas que se encontraban muertas eran reemplazadas. Las plántulas de maíz se removían conforme las larvas se alimentaban de las raíces. La mezcla de suelo y

bagazo se mantuvo húmeda, por medio del riego con agua destilada.

Esta etapa comprendió los meses de junio, julio y agosto de 1991.

### 3.3.3. Etapa III. Colecta de larvas de tercer estadio en el campo.

Para tener un "grupo" desarrollado en condiciones naturales y compararlo con aquel criado en el laboratorio, se recolectaron larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* en la Estación Experimental La Montaña. Dichas larvas fueron recogidas en los mismos lugares donde se habían colectado previamente los adultos que se utilizaron para la obtención de huevos en el laboratorio.

Las larvas colectadas en el campo fueron llevadas rápidamente al laboratorio y sometidas a igual tratamiento metodológico que aquellas que habían sido criadas en el mismo. Es decir, se colocaron en forma individual en recipientes de vidrio que contenían una mezcla de suelo con bagazo de caña en una proporción de 1:1 y plántulas de maíz como alimento. Esto con el objetivo de "habituárlas" a ese medio.

Esta etapa se realizó durante la última semana de julio y la primera de agosto de 1991.

### 3.3.4. Etapa IV. Aplicación del insecticida bacterial

Para la realización de esta etapa una mezcla de suelo y bagazo de caña en una proporción de 1:1, fue esterilizada en autoclave a 130° C y 15 lb/pulg<sup>2</sup> de presión. Posteriormente la misma fue inoculada con cinco concentraciones de *B.*

*popilliae*, mediante la aplicación del insecticida biológico Milky Disease Spore (Doom) (Anexo 1A). Con la adición de agua se aseguró la diseminación de las esporas. Luego la mezcla se colocó en recipientes de vidrio que contenían en forma individual, una larva de tercer estadio de las dos poblaciones de *P. menetriesi*.

### 3.4. Tratamientos

Los tratamientos que se evaluaron en larvas de tercer estadio de *P. menetriesi* fueron los siguientes:

- T1. Aplicación de la concentración  $2 \times 10^9$  esporas de *B. popilliae*/kg de mezcla.
- T2. Aplicación de la concentración de  $4 \times 10^9$  esporas de *B. popilliae*/kg de mezcla.
- T3. Aplicación de la concentración de  $8 \times 10^9$  esporas de *B. popilliae*/kg de mezcla.
- T4. Aplicación de la concentración  $16 \times 10^9$  esporas de *B. popilliae*/kg de mezcla.
- T5. Aplicación de la concentración de  $32 \times 10^9$  esporas de *B. popilliae*/kg de mezcla.
- T6. Testigo con aplicación de la concentración  $1 \times 10^6$  esporas de *B. popilliae*/larva, vía inyección intrahemocélica.
- T7. Testigo con aplicación de talco a una concentración de 400 g/kg de mezcla.

Para el tratamiento de larvas inyectadas, se utilizó un inyector modelo PB600, el cual se reguló para que expulsara la cantidad de 5  $\mu$ l, equivalentes a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas por larva. Cada larva se inyectó en forma parenteral en el sexto o séptimo segmento abdominal.

Se utilizaron dos poblaciones de 280 larvas de *P. menetriesi* cada una, a las cuales se le aplicaron las cinco concentraciones. Cada tratamiento constó de diez larvas con cuatro repeticiones.

### 3.5. Diseño y unidad experimental

Se empleó el diseño de bloques completos al azar con siete tratamientos y cuatro repeticiones en forma individual en cada población evaluada. La unidad experimental estuvo formada por una larva en cada envase y la parcela experimental por diez larvas (diez envases de vidrio con una larva cada uno).

### 3.6. Variables medidas

Se cuantificó el número de individuos muertos por tratamiento cada 2 días en las dos "grupos" evaluados, para comparar así la eficacia de los mismos en dos grupos diferentes.

### 3.7. Pruebas adicionales de susceptibilidad en *Phyllophaga obsoleta* (Blanchard)

Las larvas de *P. obsoleta* se colectaron en Tierra Blanca, Cartago, Costa Rica. Tierra Blanca se encuentra localizada al norte de Cartago a  $10^{\circ}$  N y  $83^{\circ} 55' 0$ , a 2270

msnm. En la región se presenta una precipitación anual de 1513 mm y una temperatura promedio anual de 12,6° C. La zona corresponde a la formación bosque húmedo montano bajo (Holdridge, 1978).

De estas larvas se tomaron 60, de las cuales 30 se inyectaron intrahemocélicamente en el sexto o séptimo segmento abdominal con 3 diferentes dosis de *B. popilliae* ( $0,75 \times 10^6$ ,  $1,50 \times 10^6$  y  $3 \times 10^6$  esporas/larva). A las 30 larvas restantes se les administró por vía oral las mismas dosis. En ambos casos se utilizaron 10 larvas como testigo y el producto comercial Grub Attack (Anexo 2A) como fuente de esporas.

Para esta prueba se usó el mismo inyector descrito en el punto 3.4. Las larvas fueron examinadas cada día y se cuantificó el número de individuos muertos en cada tratamiento.

### 3.8. Prueba con los productos comerciales aislados en medios de cultivo.

Los productos comerciales Doom y Grub Attack fueron llevados al Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica. Allí las bacterias fueron aisladas por medio del método mencionado por Travers *et al.* (1987). Se aislaron tres "tipos" de colonias (posiblemente dos de *B. popilliae* y uno de *B. lentimorbus*) en un medio de cultivo L agar (triptona, extracto de levadura, cloruro de sodio y agar). Luego se incubaron en un medio T3 (triptona, triptosa, extracto de levadura, fosfato de sodio y cloruro de manganeso), a 30° C.

Posteriormente se tomaron 60 larvas de *P. obsoleta*, de las cuales 30 fueron inyectadas intahemocélicamente en el

sexto o séptimo segmento abdominal con los 3 "tipos" de colonias aisladas ( 10 larvas para cada "tipo") a una dosis de  $5 \times 10^7$  esporas/larva. A las otras 30 larvas se les suministró vía oral la misma dosis siguiendo el mismo procedimiento. En ambas ocasiones se utilizó un testigo de 10 larvas a las que se les administró agua. En todos los casos se cuantificó el número de individuos muertos por tratamiento.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION

Las larvas de *P. menetriesi* criadas en el laboratorio y expuestas durante 90 días a una mezcla de suelo y bagazo inoculada con *B. popilliae*, no mostraron infección alguna debida a la enfermedad lechosa (Cuadro 1). No obstante, de las 40 larvas inyectadas vía intrahemocélica con dicha bacteria a una dosis de  $1 \times 10^6$ , tres (7,5%) desarrollaron la enfermedad.

Cuadro 1. Mortalidad causada por *B. popilliae* en larvas de *P. menetriesi* criadas en el laboratorio.

Tratamientos (esporas/kg mezcla)	n	Mortalidad	
		EL	Otros
1 X 10 <sup>6</sup> (II)	40	3	8
2 X 10 <sup>6</sup>	40	0	0
4 X 10 <sup>6</sup>	40	0	0
8 X 10 <sup>6</sup>	40	0	0
16 X 10 <sup>6</sup>	40	0	0
32 X 10 <sup>6</sup>	40	0	0
Testigo	40	0	1
<b>TOTAL</b>	<b>280</b>	<b>3</b>	<b>9</b>

EL = Enfermedad lechosa.

II = Inyección intrahemocélica

Este resultado podría ser explicado según lo observado por Dutky (1963), quien menciona que existen especies como *P. fusca*, *P. futilis*, *P. hirticula*, *P. inversa* y *P. rugosa* que se infectan con *B. popilliae* vía inyección intrahemocélica, pero no lo hacen cuando se alimentan en suelo inoculado con la bacteria, a pesar de que las cuatro primeras se han encontrado infectadas en forma natural en el campo. Esta información también es mencionada por Lipa (1975) para los géneros *Melolontha* y *Amphimallon*. Milner (1974) obtuvo resultados positivos cuando logró infectar vía inyección intrahemocélica larvas de *Rhopaea verreauxi* con la enfermedad lechosa, pero ninguna larva se infectó cuando las alimentó con una dosis de  $1 \times 10^9$  esporas/larva. También Tashiro y Steinkraus (1966) lograron infectar más del 70% de las larvas de *Amphimallon majalis* con esporas de *B. popilliae* subsp. *euloomarahae*, cuando las inyectaron; no obstante, en repetidas pruebas por exposición a suelo inoculado y elevando las concentraciones hasta  $50 \times 10^9$  esporas/kg de suelo hasta por ocho semanas de incubación, no se produjo infección en ninguna larva.

Además, como señala Beard (1944), aún cuando las esporas penetren en el tracto digestivo del insecto, esto no garantiza que la enfermedad se presente, puesto que las mismas pueden pasar a través de él sin germinar y ser expulsadas junto con los excrementos. La manera como las esporas o las células vegetativas pasan del intestino a la cavidad hemocélica no se conoce con claridad aún. La membrana peritrófica puede actuar como una barrera al evitar que las mismas entren en el epitelio intestinal. También el intestino de los insectos contiene enzimas que eliminan las bacterias o evitan que ellas se multipliquen (Beard, 1944; Lipa, 1975). Poltev (1956) en pruebas repetidas de alimentación de insectos con bacterias, observó que se estimulaba la producción de enzimas y por esta razón los insectos se volvían inmunes a las bacterias.

Fowler (1974) obtuvo resultados similares a los de este experimento, al exponer 64 larvas de *Costelytra zealandica* a una concentración de  $10 \times 10^9$  esporas/kg de suelo, de las cuales ninguna desarrolló la enfermedad. En la misma serie de experimentos, este autor inyectó larvas del *Costelytra* vía intrahemocélica, con una dosis de  $1 \times 10^5$  esporas/larva de dos razas de *B. popilliae* de Nueva Zelanda (llamadas I y II), obteniendo resultados generalmente incongruentes, ya que en algunos casos se presentó una alta infección y en otros no se desarrolló la enfermedad. Utilizando el producto comercial "Doom" en la misma especie, en igual dosis e igual vía de administración, logró infectar 11 larvas de 208 inyectadas (5,28%). Los síntomas se presentaron a los 50 y 67 días después del tratamiento. Estos datos son similares a los obtenidos en el presente experimento, ya que de 40 larvas se infectaron tres (7,5%) y los síntomas aparecieron a los 75 días.

La especificidad de diferentes razas o subespecies de un patógeno a una especie determinada juega un papel determinante en este tipo de bioensayos. De su trabajo con *B. popilliae* subsp. *rhopaea*, Milner (1974) sugirió que el ámbito de eficacia de una subespecie está restringido a pocas especies dentro de un mismo género de hospedantes. Por ejemplo Tashiro (1957) realizó pruebas de infección de la enfermedad lechosa en *A. majalis* y *P. japonica*, utilizando *B. popilliae* raza DeBryne. Obtuvo resultados en *A. majalis* de 90 y 81% larvas infectadas por inyección e ingestión de esporas, respectivamente; no obstante, solamente el 1% de las larvas de *P. japonica* se enfermaron, siendo esta especie en la que primero se aisló esta bacteria. Estudios realizados con razas de *B. popilliae*, asociadas con larvas de los géneros *Melolontha* (Hurpin, 1959), *Ataenus* (Kawanishi *et al.*, 1974) y *Cyclocephala* (Warren y Potter, 1983) mostraron resultados similares, confirmando la gran restricción existente en cuanto al ámbito de hospedantes.

La supervivencia general de las larvas criadas en el laboratorio, fue muy alta (95,42%) (Cuadro 1). Es decir, hubo un porcentaje de mortalidad de solo 4,58% del cual 1,25% correspondió a la enfermedad lechosa. Se debe indicar que estas larvas sufrieron un proceso de selección desde el inicio del experimento, de manera que fueron las más sanas y fuertes las que se expusieron a este patógeno.

De todos modos, como señala Lipa (1975), la introducción de un determinado patógeno en una población de insectos, no siempre resulta en el desarrollo de una epizootia. Por lo tanto se podría hablar de una población resistente o de una población infectada. Así como en el organismo de un insecto el patógeno puede tener diferentes respuestas, lo mismo sucede en una población resistente. Es decir, la población de un insecto plaga en la cual una epizootia se desarrolla puede contener "razas" con un grado variado de susceptibilidad a la infección causada por el patógeno.

La edad de los individuos (Dutky, 1963; Ladd y McCabe, 1967; Lipa, 1975) que componen una población es otro factor muy importante para el desarrollo de una enfermedad. Como regla general, las larvas jóvenes son más susceptibles a una infección, mientras que los estadios avanzados son parcial o completamente resistentes (Lipa, 1975). Por esta razón la posibilidad de que una enfermedad se manifieste, disminuye conforme los insectos de la población crecen. Por ejemplo, pruebas repetidas con *B. popilliae* subsp. *lentimorbus* (Dutky, 1963) en larvas de tercer estadio de *P. japonica*, confirmaron que el mismo es resistente a la infección y aunque las pruebas con el primero y segundo estadios mostraron algunos resultados positivos, fueron muy variables. En el presente experimento se utilizaron únicamente larvas de tercer estadio de *P. menetriesi*.

La temperatura también constituye un factor importante en el desarrollo de la enfermedad lechosa. En el caso de *P. japonica* el ámbito de temperatura para el crecimiento de *B. popilliae* parece estar entre 15.5 y 36° C (Dutky, 1940, 1963). Hurpin (1968) encontró que en suelos inoculados con *B. popilliae* subsp. *melolonthae*, la temperatura óptima para el desarrollo de la bacteriosis en larvas de tercer estadio de *M. melolontha* era de 20° C, mientras que Milner (1974) encontró un límite superior a los 30° C en el caso de *R. verreauxi* al igual que Dumbleton (1945) para *C. zealandica*. Por otro lado, Vora y Ramakrishnan (1978) reportaron el máximo desarrollo de la enfermedad a una temperatura de incubación de 20° C para *Holotrochia consanguinea*.

Tashiro y White (1954) trabajando con dos razas de *B. popilliae* y una de *B. lentimorbus* en el escarabajo *A. majalis*, encontraron que la tasa de infección de la enfermedad aumentó con la temperatura. St. Julian y Hall (1968) demostraron que el calor aumenta la capacidad de infección de las esporas de *B. popilliae*. En el presente experimento la temperatura promedio fue de 22° C.

Por su parte, de las larvas que fueron recolectadas en el campo (ver cuadro 2), dos de 40 (5%) expuestas a una concentración de  $2 \times 10^9$  esporas/kg de mezcla, mostraron infección debida a la enfermedad lechosa (Cuadro 2). Los síntomas se notaron a los 28 días de exposición. Fowler (1974) expuso 1027 larvas de *Costelytra zealandica* a una concentración de  $1 \times 10^9$  esporas/kg de suelo, pero solo se logró infectar dos (0,19%). Posteriormente alimentó con esporas 870 larvas de la misma especie y los síntomas visibles de la enfermedad se presentaron en 12 (1,5%). El intervalo de aparición de los síntomas varió entre los 19 y 72 días.

De las larvas que fueron inyectadas por la vía intrahemocélica, a una dosis de  $1 \times 10^6$  esporas/larva, tres de 40 (7,5%) desarrollaron la enfermedad, y los síntomas aparecieron 21 días después de la inyección. Resultados similares fueron obtenidos por Fowler (1974), con concentraciones de  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^7$  esporas/larva para *Odontria* sp., *Costleya suturalis* y *Pericoptus truncatus*, con un intervalo de aparición de síntomas que varió entre 18 y 35 días.

Cuadro 2. Mortalidad causada por *B. popilliae* en larvas de *P. menetriesi* recolectadas en el campo.

Tratamientos (esporas/kg mezcla)	n	Mortalidad	
		EL	Otros
$1 \times 10^6$ (II)	40	3	8
$2 \times 10^6$	40	2	2
$4 \times 10^6$	40	0	1
$8 \times 10^6$	40	0	4
$16 \times 10^6$	40	0	2
$32 \times 10^6$	40	0	0
Testigo	40	0	3
TOTAL	280	5	20

EL = Enfermedad lechosa.

II Inyección intrahemocélica

Estos datos difieren de los obtenidos con las larvas criadas en laboratorio (Cuadro 1), cuya sintomatología se presentó 75 días después.

Además de los factores previamente discutidos, no se puede descartar la posibilidad de que las larvas que presentaron síntomas de la enfermedad hayan venido infectadas del campo. Se han encontrado larvas de *P. menetriesi* infectadas con una enfermedad similar en La Montaña, donde se recolectaron las mismas (P. Shannon, comunicación personal) y, además, la enfermedad se manifestó en larvas expuestas a la menor concentración ( $2 \times 10^9$  esporas/kg de mezcla). No obstante, las larvas utilizadas en la prueba fueron seleccionadas y revisadas cuidadosamente, de modo que su apariencia fuera la más sana, es decir, sin ninguna presencia de coloración blanquizca en la hemolinfa.

La supervivencia de las larvas recolectadas en el campo, fue alta (90,42%) (Cuadro 2), pero un poco menor que la de las larvas criadas en el laboratorio (95,42%). El porcentaje de mortalidad también subió a 9,58% y el 2,50% correspondió a la enfermedad lechosa. Se debe indicar que estas larvas sufrieron estrés debido al manipuleo y al cambio de ambiente.

Estos resultados pueden ser explicados según los argumentos de Dutky (1963) y Lipa (1975) discutidos previamente.

Puesto que las pruebas con *P. menetriesi* fueron infructuosas, se decidió evaluar la respuesta a *B. popilliae* en *Phyllophaga obsoleta*, utilizando el producto comercial "Grub Attack" como fuente de esporas. No obstante, los resultados no difirieron mayormente (Cuadro 3). De las larvas inyectadas por vía intrahemocélica, dos desarrollaron la enfermedad en concentraciones de  $0.75 \times 10^6$  y  $1,5 \times 10^6$  esporas/por larva respectivamente. Los síntomas se

presentaron a los 21 y 23 días después del tratamiento, dato que se encuentra dentro del intervalo establecido por otros autores en otras especies de escarabeidos para este tipo de pruebas, con concentraciones similares de esporas (Dutky, 1941; Tashiro y White, 1954; Tashiro, 1957, 1966; Fowler, 1974; Dunbar y Beard, 1975). Esta información concuerda además con la obtenida en las larvas de *P. menetriesi* recolectadas en el campo e inyectadas con un dosis de  $1 \times 10^6$  esporas /larva.

En la mayor concentración inyectada ( $3 \times 10^6$  esporas por larva), no hubo manifestación de síntomas y las larvas que murieron (4), lo hicieron en las 72 horas posteriores al tratamiento, lo cual, según Fowler (1974), puede deberse aparentemente a una toxicidad de inóculo, ya que cuando el insecto se somete a dosis altas, muere poco tiempo después sin mostrar síntomas (Dutky, 1963).

En el caso de las larvas que ingirieron el producto, ninguna desarrolló la enfermedad. Como se había mencionado anteriormente, hay especies que se infectan vía inyección intrahemocélica y no lo hacen por ingestión (Dutky 1963; Tashiro y Steinkraus, 1966). Probablemente las bacterias pasaron por el tracto digestivo sin germinar, o si lo hicieron, no alcanzaron a llegar a la hemolinfa (Dutky, 1944; Lipa, 1976).

En cuanto a la mortalidad en general, por vía intrahemocélica hubo 6,67% de larvas muertas debido a enfermedad lechosa, dato muy similar al obtenido con larvas de *P. menetriesi* recolectadas en el campo (Cuadro 2), mientras que por ingestión no hubo mortalidad aparente debido a la bacteria, pero sí aumentó el porcentaje de la misma por otras causas (33,33%); posiblemente, además del estrés, este aumento se debió al manipuleo de las larvas en el momento de ingerir las dosis.

Cuadro 3. Mortalidad causada por *B. popilliae* en larvas de *P. obsoleta* recolectadas en el campo.

Tratamientos (esporas/larva)	n	Mortalidad	
		EL	Otros
<b>Inyección intrahemocélica</b>			
0,75 X 10 <sup>6</sup>	10	1	1
1,5 X 10 <sup>6</sup>	10	1	2
3 X 10 <sup>6</sup>	10	0	4
Testigo	10	0	0
<b>Vía oral</b>			
0,75 X 10 <sup>6</sup>	10	0	3
1,5 X 10 <sup>6</sup>	10	0	4
3 X 10 <sup>6</sup>	10	0	3
Testigo	10	0	3

EL = Enfermedad lechosa.

En un experimento adicional, los productos comerciales utilizados en experimentos previos, fueron colocados en medios de cultivo, resultando tres "tipos" de colonias. Del producto Doom, se obtuvieron dos, el "Tipo 1" y el "Tipo 2" (posiblemente *B. p.* subsp. *popilliae* y *B. p.* subsp.

*lentimorbus*, ya que según la etiqueta, en su formulación se pueden encontrar las dos subespecies). Del producto Grub Attack sólo se produjo uno, el "Tipo 3" (posiblemente *B. p. subsp. popilliae*, pero producido previamente *in vitro*). Según Obenchain y Ellis (1991), esta formulación comercial desarrollada *in vitro* contiene  $6,4 \times 10^8$  esporas/g (y así lo confirma su etiqueta), cuyo efecto infectivo en pruebas de campo y de laboratorio en *P. japonica* es equivalente a la formulación *in vivo*.

Los "tipos" de colonias no se identificaron porque este trabajo es sumamente difícil y llevaría mucho tiempo. Además de que en Costa Rica, en el caso de que se pudiera, sólo se llegaría a nivel de género (F. Jiménez, comunicación personal).

En todo caso no es extraño que este patógeno "crezca" en medio artificial. Si bien es cierto, *B. popilliae* es una bacteria que produce muy bajos porcentajes de esporulación en medio de cultivo, hasta un máximo de 20%, de acuerdo con la literatura (Rhodes, 1965; Schwartz y Sharpe, 1970), sí se obtienen células vegetativas (Steinkraus, 1957; Black, 1968; Hrubrant y Rhodes, 1968; Lüthy *et al.*, 1970; Haynes y Weih, 1972; Milner, 1974), las cuales tienen la propiedad de infectar larvas con la enfermedad lechosa por vía inyección intrahemocélica. Esto se ha documentado para *A. majalis* (Tashiro y Steinkraus, 1966) y *P. japonica*, aunque en ésta, las esporas producidas son menos infectivas por inyección y muestran poca actividad cuando se administran por ingestión (Schwartz y Sharpe 1970; Sharpe *et al.*, 1970).

Ninguno de los tres "tipos" de colonias produjo aparentemente la enfermedad en las larvas inyectadas (Cuadro 4). Fowler (1974) obtuvo resultados similares en *Costelytra zealandica*, *Pericoptus truncatus* y *Costelya suturalis*, cuando

las inyectó con células vegetativas obtenidas de medios de cultivo de tres razas diferentes.

Cuadro 4. Mortalidad causada por *B. popilliae* en larvas de *P. obsoleta* recolectadas en el campo, utilizando bacterias de cultivos *in vitro* administradas por 2 vías.

Tratamientos (5 x 10 <sup>7</sup> bacterias/larva)	n	Mortalidad	
		EL	Otros
<b>Inyección intrahemocélica</b>			
Tipo 1	10	0	2
Tipo 2	10	0	4
Tipo 3	10	0	4
Testigo	10	0	2
<b>Ingestión oral</b>			
Tipo 1	10	2	4
Tipo 2	10	0	4
Tipo 3	10	0	3
Testigo	10	0	2

EL = Enfermedad lechosa.

Con respecto a las larvas a las que se administró las bacterias por vía oral, dos de las que ingirieron la bacteria "Tipo 1" (posiblemente *B. p. subsp. popilliae*), desarrollaron la enfermedad; la sintomatología fue observada a los 10 y 15 días después del tratamiento. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Schwartz y Sharpe (1970) en larvas de *P. japonica* que ingirieron esporas de la raza NRRLB-2309M desarrolladas en medio de cultivo.

La mortalidad debida a otras causas (cuadro 4), es similar en los dos tipos de administración de bacterias (intrahemocélica y por ingestión), o sea que no es un factor que influyera en la prueba. El porcentaje de mortalidad obtenido debido a enfermedad lechosa (6,67%) por vía oral, es igual al que se encontró en larvas de *P. obsoleta* inyectadas pero sin utilizar bacterias de medios de cultivo.

Cabe anotar que las pruebas con suspensiones de esporas utilizadas como inóculo, no han dado resultados uniformes (Dutky, 1963). En algunos ensayos se manifestó un alto grado de infección, mientras en otros ninguna infección fue obtenida.

Con base en los resultados obtenidos en este experimento se puede decir que los productos evaluados no serían eficaces para el control de *P. menetriesi* y *P. obsoleta* en condiciones de campo, ya que éstas posiblemente no son susceptibles a la cepa comercial de *B. popilliae*.

Se debe mencionar además, que se desarrolló una metodología de cría de larvas de ambas especies que garantiza la obtención y el mantenimiento de números elevados de larvas para la elaboración de cualquier tipo de bioensayo.

## V. CONCLUSIONES

Se logró infectar individuos de las dos especies evaluadas (*P. menetriesi* y *P. obsoleta*) con la enfermedad lechosa, aunque los porcentajes de infección fueron muy bajos.

Los resultados obtenidos fueron muy erráticos ya que las larvas de *P. menetriesi* criadas en el laboratorio se infectaron solo por inyección intrahemocélica de esporas, mientras que las recolectadas en el campo lo hicieron por inyección y por exposición a suelo inoculado, aunque en este último caso existe la probabilidad de que hayan venido infectadas del campo. En cuanto a *P. obsoleta*, las larvas se infectaron por inyección intrahemocélica, pero no por ingestión oral de esporas. No obstante, se produjo la enfermedad lechosa cuando se administraron por vía oral bacterias obtenidas en medio artificial.

No existe una explicación obvia para la obtención de resultados tan desuniformes, a menos que los individuos de las dos especies utilizadas fueran muy variables en su capacidad de respuesta a este patógeno.

Posiblemente *P. menetriesi* y *P. obsoleta* no sean susceptibles a la cepa comercial de *B. popilliae*, a través de las vías normales de infección.

## VI RECOMENDACIONES

Para estudios posteriores, se recomienda realizar la siguiente secuencia de pruebas: inyección intrahemocélica o parenteral, por ingestión y por exposición a suelo inoculado.

Hacer un estudio similar a este, pero utilizando cepas locales (ya conocidas para *P. menetriesi* y *P. obsoleta*), dada la mayor potencialidad que ofrecen estos organismos nativos.

Para futuras investigaciones y para cualquier especie que se evalúe, realizar las pruebas de respuesta en el primero y segundo estadios larvales.

Se recomienda no utilizar los productos evaluados para el control de *P. menetriesi* y *P. obsoleta* en el campo, ya que se perdería tiempo y dinero, puesto que posiblemente estas especies no son susceptibles a *B. popilliae*, al menos por las rutas normales de infección.

## VII. REFERENCIAS

- ADAMS, J. A. 1949a. The Oriental beetle as a turf pest associated with the Japanese beetle en New York. J. Econ. Entomol. 42(2): 366-371.
- ADAMS, J. A. 1949b. *Cyclocephala borealis* as a turf pest associated with the Japanese beetle in New York. J. Econ. Entomol. 42(4): 626-628.
- ADAMS, J. A.; WHEELER, E. H. 1946. Rate of development of milky disease in Japanese beetle populations. J. Econ. Entomol. 39(2): 248-254.
- ANDERSON, R. M.; MAY, R. M. 1981. The population dynamics of microparasites and their invertebrate hosts. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 291: 451-524.
- Citado por: Hanula J. L.; Andreadis, T. G. 1988. Parasitic Microorganisms of Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) and associated scarab larvae in Connecticut soils. Environ. Entomol. 17(4): 714.
- ANDREWS, K. 1984. El manejo integrado de plagas invertebradas en cultivos agronómicos, hortícolas y frutales en la Escuela Agrícola Panamericana. E.A.P. Honduras. 27 p.
- BEARD, R. L. 1944. Susceptibility of Japanese beetle larvae to *Bacillus popilliae*. J. Econ. Entomol. 37(5): 702-708.
- BEARD, R. L. 1945. Studies on the milky disease of Japanese beetle larvae. Conn. Agr. Expt. Sta. Bull. 491: 505-583.

- Citado por: St. Julian, G.; Hall, H. H. 1967. Infection of *Popillia japonica* larvae with heat-activated spores of *Bacillus popilliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 10: 49.
- BEARD, R. L. 1946. Competition between two entomogenous bacteria. *Science.* 103: 371-372.
- BEARD, R. L. 1956. Two milky diseases of Australian Scarabaeidae. *Can. Entomol.* 88: 640-647.
- BEEGLE, C. 1986. Possibilities for Manipulating Epizootics and Enzootics of Entomopathogenic Bacteria. In Sanson, R., Vlak J. & Peters, D. (eds.). *Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology.* 4th I.C.I.P. Wageningen, The Netherlands. pp. 572-575.
- BENNETT, G. A.; SHOTWELL, O. L. 1972. Haemolymph lipids of healthy and diseased Japanese beetle larvae. *J. Insect Physiol.* 18: 53-62.
- BENNETT, G. A.; SHOTWELL, O. L.; HALL H. H.; HEARN, W. R. 1968. Hemolymph proteins of healthy and diseased larvae of the Japanese beetle, *Popillia japonica*. *J. Invertebr. Pathol.* 11: 112-118.
- BHUMIRATANA, A.; ANDERSON, R. L.; COSTILOW, R. N. 1974. Trehalose metabolism by *Bacillus popilliae*. *J. Bacteriol.* 119(2): 484-493.
- BLACK, S. H. 1968a. Cytology of milky disease bacteria I. Morphogenesis of *Bacillus popilliae* *in vivo*. *J. Invertebr. Pathol.* 12: 148-157.

BLACK, S. H. 1968b. Citology of milky disease bacteria II. Morphogenesis of *Bacillus popilliae* *in vitro*. J. Invertebr. Pathol. 12: 158-167.

BONNEFOI, A.; TOUCAS, M.; CHAUMONT, H. 1959. Essais de thermorésistance de l'organisme responsable de la maladie laiteuse de la larve du Hanneton (*Melolontha melolontha*). Entomophaga 4: 227-231.

Citado por: Benz, G. 1987. Environment. In: Fuxa, J.; Tanada, Y. (eds.), Epizootiology of Insect Diseases. John Wiley & Sons, New York. p. 186.

BOUCIAS, D. G.; CHERRY, R. H.; ANDERSON, D. L. 1986. Incidence of *Bacillus popilliae* in *Ligyris subtropicus* and *Cyclocephala parallela* (Coleoptera: Scarabaeidae) in Florida sugarcane fields. Environ. Entomol. 15(3): 703-706.

BRIGGS, J. D. 1963. Commercial production of insect pathogens. V. 2. In E. A. Steinhaus (ed.) Insect Pathology, An Advanced Treatise. Academic Press, New York. pp. 519-548.

BUCHANAN, R. E. 1951. Bacteriology. 5th ed. The Macmillan Company, New York. 678 p.

BULLA, L. A.; ST. JULIAN, G. 1972. Biochemistry of milky disease: Radiorespirometry of pyruvate, acetate, succinate, and glutamate oxidation by healthy and diseased Japanese beetle larvae. J. Invertebr. Pathol. 19: 120-124.

- BURGES, H. D. 1980. Risk analysis in the registration of pesticidal bacteria: Pathogenicity and toxicological aspects. In Lundholm, B. & Stackerud, M. (eds.). Environmental Protection and Biological Forms of Control of Pest Organisms. Ecol. Bull. (Stockholm) 31: 81-90.
- BURGES, H. D.; DAOUST, R. A. 1986. Current status of the use of bacteria as biocontrol agents. In Sanson, R.; Vlak, J. & Peters, D. (eds.). Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology. ICIP. Wageningen, The Netherlands. pp. 514-517.
- CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA. 1985. Inventario de plagas y enfermedades de Costa Rica. Proyecto Manejo Integrado de Plagas. Turrialba, Costa Rica. s.p.
- CONTRERAS, S. E.; LEON, S. A. 1974. Efectividad de los tratamientos de suelo para el control de *Phyllophaga* spp. en café. Rev. SIADES (El Salvador) 3(4): 123-130.
- DUMBAR, D. M.; BEARD, R. L. 1975. Present status of milky disease of Japanese and Oriental beetles in Connecticut. J. Econ. Entomol. 68: 453-457.
- DUMBLETON, L. J. 1945. Bacterial and nematode parasites of soil insects. N. Z. J. Sci. Tech. 27: 76-81.
- DUTKY, S.R. 1940. Two new spore-forming bacteria causing milky disease of Japanese beetle larvae. J. Agric. Res. 61: 57-68.
- DUTKY, S. R. 1941a. Susceptibility of certain scarabaeid larvae to infection by Type A milky disease. J. Econ. Entomol. 34(2): 215-216.

- DUTKY, S. R. 1941b. Testing the possible value of milky diseases for control of soil-inhabiting larvae. J. Econ. Entomol. 34(2): 217-218.
- DUTKY, S. R. 1963. The milky diseases. In Steinhaus, E. A. (ed.), Insect Pathology, An Advanced Treatise. Vol. 2. Academic Press, New York. pp. 75-115.
- EASTER, S. S. 1947. Control of Japanese beetles at second army posts. J. Econ. Entomol. 40(5): 632-634.
- FARM CHEMICAL HANDBOOK. 1991. Muster Publishing Co. Ohio, USA. pp. 205-206.
- FERRON, P.; HURPIN, B.; ROBERT, P. H. 1969. Sensibilisation des larves de *Melolontha melolontha* L. a la mycose a *Beauveria tenella* par une infection préalable a *Bacillus popilliae*. Entomophaga 14(4): 429-437.
- FLEMING, W. E. 1968. Biological control of the Japanese beetle. U.S.D.A. Tech. Bull. No. 1383. 78 p.
- FOWLER, M. 1974. Milky disease (*Bacillus* spp.) occurrence and experimental infection in larvae of *Costelytra zealandica* and other Scarabaeidae. N. Z. J. Zool. 1(1): 97-109.
- FOX, H.; LUDWIG, D. 1937. Methods of breeding and rearing Scarabaeidae. In Needham, J. F. (ed.), Culture Methods for Invertebrate Animals. Comstock Publishing Co. Ithaca, New York. pp. 468-473.

- Citado por: Funes, R. 1990. Monitoreo con trampa de luz de Scarabaeidae en Turrialba, Costa Rica y contribuciones al desarrollo de metodologías de crianza para *Anomala cincta* (Say.), *Cyclocephala amazona* L. y *Anomala discoidalis* B. (Coleoptera: Scarabaeidae). Tesis M Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. p. 38
- FUNES, R. 1990. Monitoreo con trampas de luz de Scarabaeidae en Turrialba, Costa Rica y contribuciones al desarrollo de metodologías de crianza para *Anomala cincta* (Say), *Cyclocephala discoidalis* B. (Coleoptera: Scarabaeidae). Tesis M Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 125 p.
- FUXA, J. R. 1987. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. *Ann. Rev. Entomol.* 32: 225-251.
- FUXA, J. R.; TANADA, Y. 1987. Epizootiology of insect diseases. John Wiley & Sons, New York. 555 p.
- GOONEWARDENE, H. F.; MCKAY, J. E. 1969. An artificial diet for the adult Japanese beetle. *J. Econ. Entomol.* 62(4): 964.
- GOONEWARDENE, H. F.; ZEPP, D. B. 1969. Feeding larvae of the Japanese beetle in the laboratory. *J. Econ. Entomol.* 62(2): 514-515.
- GOONEWARDENE, H. F.; ZEPP, D. B. 1970. Rearing the immature feeding stages of the Japanese beetle in pans. *J. Econ. Entomol.* 63(3): 859-860.
- GUPPY, J. C.; HARCOURT, D. G. 1970. Spatial pattern of the immature stages and teneral adults of *Phyllophaga* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae) in a permanent meadow. *Can. Entomol.* 102: 1354-1359.

- HALL, H. H.; ST. JULIAN, G.; ADANS, G. L. 1968. Observations on the infection of Japanese beetle larvae with *Bacillus popilliae*. J. Econ. Entomol. 61(3): 840-843.
- HANULA, J. L.; ANDREADIS, T. G. 1988. Parasitic microorganisms of Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) and associated scarab larvae in Connecticut soils. Environ. Entomol. 17(4): 709-714.
- HARRIS, E. D. 1959. Observations on the occurrence of a milky disease among larvae of the northern masked chafer, *Cyclocephala borealis* Arrow. Fla. Entomol. 42(2): 81-83.
- HAYNES, W. C.; ST. JULIAN, G.; SHEKLETON, M. G.; HALL H. H.; TASHIRO, H. 1961. Preservation of infectious milky disease bacteria by lyophilization. J. Insect Pathol. 3:55-61.
- HAYNES, W. C.; WEIH, L. J. 1972. Sporulation of *Bacillus popilliae* in liquid cultures. J. Invertebr. Pathol. 19: 125-130.
- HEIMPEL, A. M.; HRUBANT, G. G. 1973. Medical examination of humans exposed to *Bacillus popilliae* and *Popillia japonica* during production of commercial milky disease spore dust. Environ. Entomol. 2: 793-795.
- HILJE, L.; CARTIN, V.; MARCH, E. 1989. El combate de plagas agrícolas dentro del contexto histórico costarricense. Manejo Integrado de Plagas (C.R.) 14: 68-86.

- HILJE, L.; CARTIN, V. 1990. Diagnóstico acerca del combate químico de las polillas de la papa (Lepidoptera: Gelechiidae) en Cartago, Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas (C.R.) 17: 27-33.
- HILJE, L.; ARAYA, C.; SCORZA, F. 1991. Plagas y enfermedades forestales en América Central. Guía de campo. Serie Técnica. Manual Técnico No. 3. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 187 p.
- HOLDRIDGE, L. 1978. Ecología basada en zonas de vida. Traducido de la 1a. ed. inglesa por Humberto Jiménez Saa. San José, Costa Rica, IICA. 216 p.
- HRUBANT, G. R.; RHODES, R. L. 1968. Agglutinability of sporeforming insect pathogens with antiglobulins to milky disease bacteria. J. Invertebr. Pathol. 11: 371-376.
- HURPIN, B. 1959. Etude de diverses souches de maladie laiteuse sur les larves de *Melolontha melolontha* et sur celles de quelques espèces voisines. Entomophaga 4: 233-248.
- Citado por: Hurpin, B. 1968. The influence of temperature and larval stage on certain disease of *Melolontha melolontha*. J. Invertebr. Pathol. 10: 260.
- HURPIN, B. 1967. Recherches épizootiologiques sur la maladie laiteuse a *Bacillus popilliae* "*Melolontha*". Ann. Epiphyties 18: 127-173.
- HURPIN, B. 1968. The influence of temperature and larval stage on certain disease of *Melolontha melolontha*. J. Invertebr. Pathol. 10: 252-262.

- HURPIN, B.; ROBERT P. H. 1972. Comparison of the activity of certain pathogens of the cockchafer *Melolontha melolontha* in plots of natural meadowland. J. Invertebr. Pathol. 19: 291-298.
- HUTTON, P. O.; BURBUTIS, P. P. 1974. Milky disease and Japanese beetle in Delaware. J. Econ. Entomol. 67(2): 247-248.
- IGNOFFO, C. M. 1973. Effects of entomopathogens on vertebrates. Ann. N. Y. Acad. Sc. 217: 141-172.
- INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION AGRICOLA. 1977. Evaluación de insecticidas para el control de plagas del suelo en maíz de Teloloapan, Gro. Informe Anual Depto. Entomología. México. pp. 336-339.
- JARVIS, J. L. 1966. Studies of *Phyllophaga anxia* (Coleoptera: Scarabaeidae) in the sandhills area of Nebraska. J. Kans. Entomol. Soc. 39: 401-409.
- KAWANISHI, C. Y.; SPLITTSTOESSER, C. M.; TASHIRO, H.; K. H. 1974. *Ataenius spretulus*, a potentially important turf pest, and its associated milky disease bacterium. Environ. Entomol. 3: 177-180.
- Citado por: Obenchain, F. D.; Ellis B-J. 1991. Safety considerations in the use of *Bacillus popilliae*, the milky disease pathogen of Scarabaeidae. In M. Laird, L. A. Lacey, E. W. Davidson (eds.), Safety of Microbial Insecticides. CRC Press Inc., Boca Raton, Fla. pp. 189-201.
- KING, A. 1980a. Cropping Systems Entomology, Costa Rica. Progress Report, June 1977-June 1978. ODA/CATIE, Centre for Overseas Pest Research, London. 70 p.

- KING, A. 1980b. Cropping Systems Entomology, Costa Rica. Progress Report, June 1978-June 1979. ODA/CATIE, Centre for Overseas Pest Research, London. 56 p.
- KING, A. 1981. Cropping Systems Entomology, Costa Rica. Progress Report, June 1979-October 1980. ODA/CATIE, Centre for Overseas Pest Research, London. 70 p.
- KING, A. 1982. Cropping Systems Entomology, Costa Rica. Final Report (unpublished). ODA/CATIE. Centre for Overseas Pest Research, London. s. p.
- KING, A. 1984. Biology and identification of white grubs (*Phyllophaga* spp.) of economic importance in Central America. *Tropical Pest Management* 30(1): 36-50.
- KING, A. 1985. Factors affecting infestation by larvae of *Phyllophaga* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae) in Costa Rica. *Bull. Ent. Res.* 75: 417-427.
- KING, A.; SAUNDERS, J. 1979. El control de la gallina ciega (*Phyllophaga* spp.) en maíz con insecticidas aplicados con métodos sencillos. *Turrialba (C.R.)* 29(1): 17-19.
- KING, A.; SAUNDERS, J. 1984. Las plagas invertebradas de los cultivos anuales de América Central. Overseas Development Administration. London, England. 182 p.
- KLEIN, M. G. 1981. Advances in the use of *Bacillus popilliae* for pest control. In Burges, H. D. (ed.). *Microbial Control of Pest and Plant diseases 1970-1980*. Academic Press, London. pp. 183-192.

- KLEIN, M. G. 1986. *Bacillus popilliae* - Prospects and Problems. In Sanson, R.; Vlak, J. & Peters, D. (eds.). Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology. 4th I.C.I.P. Wageningen, The Netherlands. pp. 534-537.
- KLEIN, M. G. 1988. Pest management of soil-inhabiting insects with microorganisms. Agriculture, Ecosystems and Environment 24: 337-349.
- KRIEG, A. 1987. Diseases caused by bacteria and other prokaryotes. In Fuxa, R.; Tanada, Y. (eds.). Epizootiology of insect diseases. John Wiley & Sons, New York. pp. 232-255.
- LADD, T. L.; McCABE, P. J. 1967. Persistence of spores of *Bacillus popilliae*, the causal organism of type A milky disease of Japanese beetle larvae, in New Jersey soils. J. Econ. Entomol. 60(2): 493-495.
- LANGFORD, G. S.; VINCENT, R. H.; CORY, E. N. 1942. The adult Japanese beetle as host and disseminator of type A milky disease. J. Econ. Entomol. 35(2): 165-169.
- LIPA, J. J. 1975. An outline of insect pathology. Translated from Polish by Halina Markiewicz. U.S.D.A. Washington D.C., U.S.A. 269 p.
- LUNDHOLM, B.; STACKERUD, M. 1980. Environmental protection and biological forms of control of pest organisms. Ecol. Bull. (Stockholm) No. 31. 171 p.
- LUTHY, P.; WYSS, C.; ETTLINGER, L. 1970. Behavior of milky organisms in a tissue culture system. J. Invertebr. Pathol. 16: 325-330.

- MILNER, R. J. 1974. A new variety of milky disease, *Bacillus popilliae* var. *rhopaea* from *Rhopaea verreauxi*. Aust. J. Biol. Sci. 27: 235-247.
- MILNER, R. J. 1976. A laboratory evaluation of the pathogenicity of *Bacillus popilliae* var *rhopaea*, the agent of milky disease in *Rhopaea verreauxi* (Coleoptera: Scarabaeidae). J. Invertebr. Pathol. 28(2): 185-190.
- MORALES, E. 1966. Combate de plagas del café. Costa Rica, MAG. Boletín Divulgativo No. 41. 32 p.
- MORON, M. A. 1986. El género *Phyllophaga* en México. Instituto de Ecología. México, D. F., México. 341 p.
- OBENCHAIN, F. D.; ELLIS B-J. 1991. Safety considerations in the use of *Bacillus popilliae*, the milky disease pathogen of Scarabaeidae. In M. Laird, L. A. Lacey, E. W. Davidson (eds.) Safety of Microbial Insecticides. CRC Press Inc., Boca Raton, Fla. pp. 189-201.
- POLIVKA, J. B. 1956. Effectiveness of milky disease in controlling Japanese beetle in Ohio. J. Econ. Entomol. 49(1): 4-6.
- POLTEV, V. I. 1956. Vrozhdennyi i probetennyi immunitet nasecomykh. "(Innate and Acquired Immunity of Insects.). "Infektsionnye i portozeinye bolezni poleznykh i vrednykh nasekomykh". (Infectious and Protozoan Diseases of Useful and Noxious Insects). Moskva, p. 5-19.
- Citado por: Lipa, J. J. 1975. An Outline of Insect Pathology. Translated from polish by Halina Markiewicz. U.S.D.A. Washington D.C., U.S.A. p. 115.

- POTTER, D. A.; BRAMAN, S. K. 1991. Ecology and management of turfgrass insects. *Annu. Rev. Entomol.* 36: 383-406.
- RAO, A. S.; VEERESH, G. K. 1988. Influence of substrates on the infectivity of milky disease to *Holotrichia serrata* Florida Entomol. 13(3-4): 303-305.
- Tomado de: Review of Applied Entomology (Serie A) (G.B.)  
78(1): 106. 1990
- REUTER LABORATORIES, INC. 1989. *In vitro* method for producing infective bacterial spores and spore-containing insecticidal compositions. US Patent No. 4,824,671.
- Citado por: Potter, D. A.; Braman, S. K. 1991. Ecology and management of turfgrass insects. *Annu. Rev. Entomol.* 36: 383-406.
- RHODES, R. A. 1965. Symposium on Microbial Insecticides. II. Milky disease of the Japanese beetle. *Bacteriol. Rev.* 29(3): 373-381.
- RIOS, F.; ROMERO, S. 1982. Importancia de los daños al maíz por insectos del suelo en el Estado de Jalisco, México (Coleoptera). *Folia Entomológica Mexicana* 52: 41-60.
- ROMERO, P.; RIOS, R. F. 1978. Ensayo para el control de plagas en maíz. BAYER S.A. México. s.p.
- SALT, G. 1970. The cellular defence reactions of insects. Cambridge University Press. London, England. 118 p.

- SCHWARTZ, P. H.; SHARPE, E. 1970. Infectivity of spores of *Bacillus popilliae* produced on a laboratory medium. *J. Invertebr. Pathol.* 15: 126-128.
- SHARPE, E. S.; ST. JULIAN, G.; CROWELL, C. 1970. Characteristics of a new strain of *Bacillus popilliae* sporogenic *in vitro*. *Appl. Microbiol.* 19: 681-685.
- Citado por: Obenchain, F. D.; Ellis B-J. 1991. Safety considerations in the use of *Bacillus popilliae*, the milky disease pathogen of Scarabaeidae. In M. Laird, L. A. Lacey, E. W. Davidson (eds.), *Safety of Microbial Insecticides*. CRC Press Inc., Boca Raton, Fla. pp. 189-201.
- SHARPE, E. S.; DETROY, R. W. 1979. Susceptibility of Japanese beetle larvae to *Bacillus thuringiensis* : Associated effects of diapause, midgut pH, and milky disease. *J. Invertebr. Pathol.* 34: 90-94.
- SHETLAR, D. J.; SULEMAN, P. E.; GEORGIS, R. 1988. Irrigation and use of entomogenous nematodes, *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis heliothidis* (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae), for control of Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) grubs in turfgrass. *J. Econ. Entomol.* 81(5): 1318-1322.
- SPLITTSTOESSER, C. M.; TASHIRO, H.; LIN, S. L.; STEINKRAUS, K. H.; FIORI, B. J. 1973. Histopathology of the European chafer, *Amphimallon majalis*, infected with *Bacillus popilliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 22: 161-167.
- ST. JULIAN, G.; HALL, H. H. 1968. Infection of *Popillia japonica* larvae with heat-activated spores of *Bacillus popilliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 10: 48-53.

- ST. JULIAN, G.; SHARPE, E.; RHODES, R. A. 1970. Growth pattern of *Bacillus popilliae* in Japanese beetle larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 15: 240-246.
- ST. JULIAN, G.; BULLA, L. A.; ADAMS, G. L. 1972. Milky disease development in field-infected Japanese beetle larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 20: 109-113.
- ST. JULIAN, L.; BULLA, L. A.; SHARPE, E. S.; GORDON, L. A. 1973. Bacteria, Spirochetes, and *Rickettsia* as Insecticides. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 217: 65-75.
- ST. JULIAN, G.; BULLA, L. A.; DETROY, R. W. 1978. Stored *Bacillus popilliae* spores and their infectivity against *Popillia japonica* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 32(3): 258-263.
- STEINHAUS, E. A. 1957. Concerning the harmlessness of insect pathogens and the standardization of microbial control products. *J. Econ. Entomol.* 50(6): 715-720.
- STEINKRAUS, K. H. 1957a. Studies on the milky disease organisms. I. Parasitic growth and sporulation of *Bacillus popilliae*. *J. Bacteriol.* 74: 621-624.
- STEINKRAUS, K. H. 1957b. Studies on the milky disease organisms. II. Saprophytic growth of *Bacillus popilliae*. *J. Bacteriol.* 74: 625-632.
- STEINKRAUS, K. H.; TASHIRO, H. 1955. Production of milky disease spores (*Bacillus popilliae* Dutky and *Bacillus lentimorbus* Dutky) on artificial media. *Science* 121: 873-874.

- TASHIRO, H. 1957. Susceptibility of European chafer and Japanese beetle larvae to different strains of milky disease organisms. *J. Econ. Entomol.* 50(3): 350-352.
- TASHIRO, H.; WHITE, R. T. 1954. Milky diseases of European chafer larvae. *J. Econ. Entomol.* 47(6): 1087-1092.
- TASHIRO, H.; STEINKRAUS, K. H. 1966. Virulence of species and strains of milky disease bacteria in the European chafer, *Amphimallon majalis* (Razoumowsky). *J. Invertebr. Pathol.* 8: 382-389.
- TRAVERS, R. S.; MARTIN, P. A.; REICHELDERFER, C. F. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Appl. and Environ. Microbiol.* 53(6): 1263-1266.
- UPHOLT, W. R.; ENGLER, R. A.; TERBUSH, L. E. 1973. Regulation of microbial pesticides. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 217: 234-237.
- VORA, V. J.; RAMAKRISHNAN, N. 1978. Studies on the milky disease of white-grub, *Holotrichia consanguinea* Blanchard (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Entomol. Res.* 2(2): 136-141.
- Tomado de: Review of Applied Entomology (Serie A) (G.B.) 68(6): 397. 1980.
- VYAS, H. G.; JOSHI, D. P.; PATEL, K. C.; YADAV, D. N.; DODIA, J. F. 1986. Natural incidence of milky disease of white grubs in Gujarat. *Ind. J. Agricult. Sci.* 56(3): 213-214.

- WARREN, G. W.; POTTER, D. A. 1983. Pathogenicity of *Bacillus popilliae* (*Cyclocephala* strain) and other milky disease bacteria in grubs of the Southern Marked Chafer (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Econ. Entomol.* 76(1): 69-73.
- WATTS, J. G.; HATCHER, J. B. 1954. White grub damage to young pine plantations. *J. Econ. Entomol.* 47(4): 710-711.
- WEINER, B. A.; KWOLEK, W. F.; ST. JULIAN, G.; HALL, H. H.; JACKSON, R. W. 1966. Oxygen concentration in larval hemolymph of the Japanese beetle, *Popillia japonica*, infected with *Bacillus popilliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 8: 308-313.
- WEINER, B. A. 1978. Isolation and partial characterization of the parasporal body of *Bacillus popilliae*. *Can. J. Microbiol.* 24: 1557.
- Citado por: Tanada, Y.; Fuxa, J. 1987. The Pathogen Population. In Fuxa, J.; Tanada, Y. (eds.), *Epizootiology of Insects Diseases*. John Wiley & Sons, New York. p. 117.
- WHITE, R. T. 1940. Survival of Type A milky disease of Japanese beetle larvae under adverse field conditions. *J. Econ. Entomol.* 33(2): 303-306.
- WHITE, R. T. 1941. Development of milky disease on Japanese beetle larvae under field conditions. *J. Econ. Entomol.* 34(2): 213-215.
- WHITE, R. T. 1947. Milky disease infecting *Cyclocephala* larvae en the field. *J. Econ. Entomol.* 40(6): 912-913.

WHITE, R. T. 1948. Application of milky disease spore dust with a commercial fertilizer. *J. Econ. Entomol.* 41(1): 912-913.

WHITE, R. T.; DUTKY, S. R. 1940. Effect of the introduction of milky diseases on populations of Japanese beetle larvae. *J. Econ. Entomol.* 33(2): 306-309.

WHITE, R. T.; DUTKY, S. R. 1942. Cooperative distribution of organisms causing milky disease of Japanese beetle grubs. *J. Econ. Entomol.* 35(5): 679-682.

## VIII. ANEXOS

## ANEXO 1A

**Especificaciones del insecticida Doom**

**Composición:** *Bacillus popilliae* Dutky.

**Otros nombres:** Doom, Japidemic.

**Acción/uso:** Insecticida biológico selectivo contra larvas del escarabajo japonés (*Popillia japonica*), el escarabajo oriental (*Anomala orientalis*) y ciertos escarabajos de mayo y junio, incluyendo *Phyllophaga anxia*, *P. congrua*, *P. ephidida*, *P. fraterna* y *P. futilis*.

**Propiedades:** Inerte.

**Toxicidad:** Es considerado inocuo para mamíferos, aves, peces e insectos benéficos. No se conoce que sea tóxico para el hombre. No tiene ningún efecto tóxico en ratas alimentadas con  $50 \times 10^6$  esporas/día, ni en monos Rhesus alimentados con  $250 \times 10^6$  esporas/día.

**Formulación:** Polvo de esporas listo para usar.

**Aplicación:** Controla el estado larval del escarabajo japonés. Solamente una aplicación es necesaria para un control duradero. Mejora con el tiempo (Farm Chemical Handbook, 1991).

## ANEXO 2A

Especificaciones del insecticida Grub Attack.

Composición: *Bacillus popilliae* Dutky.

Otros nombres: Grub Attack.

Acción: Insecticida selectivo.

Uso: Para larvas del escarabajo japonés (*Popillia japonica*), el escarabajo oriental (*Anomala orientalis*) y ciertos escarabajos de mayo y junio.

Toxicidad: Considerado de muy baja toxicidad para el hombre. No tiene efectos tóxicos en ratas alimentadas con  $50 \times 10^6$  esporas/día, ni en monos *Rhesus* alimentados con  $1.250 \times 10^6$  esporas/día.

Formulación: Granulado y en polvo (Farm Chemical Handbook, 1991).