

RELACIÓN ENTRE EL ESTRÉS Y LAS BACTERIAS ENTOMOPATÓGENAS *Pantoea (Erwinia) agglomerans (herbicola)* Y *Bacillus cereus* EN JOBOTOS (Col: Melolonthidae) (*Phyllophaga* spp., *Anomala* spp. Y *Cyclocephala* spp.), EN COSTA RICA¹

Edgar Vargas², Giselle Abarca³

RESUMEN

Relación entre el estrés y las bacterias entomopatógenas *Pantoea (Erwinia) agglomerans (herbicola)* y *Bacillus cereus* en jobotos (Col: Melolonthidae) (*Phyllophaga* spp., *Anomala* spp. y *Cyclocephala* spp.), en Costa Rica. Se determinaron las concentraciones de las unidades formadoras de colonias (UFC) de las bacterias entomopatógenas *Pantoea agglomerans* y *Bacillus cereus*, en los estados de huevo, larvas, pupa y adulto, de algunas especies de jobotos (*Phyllophaga* y *Cyclocephala*), de importancia agrícola, colectadas en cinco agroecosistemas de Costa Rica. Las larvas L₃ y L₂ de *Phyllophaga elenans*, colectadas en las regiones geográficas estudiadas, fueron portadoras en alto grado de *Pantoea agglomerans* y de *Bacillus cereus*. Los estadios L₃ y L₂ de *Phyllophaga obsoleta*, *Phyllophaga menetriesi*, *Cyclocephala sanguinicollis* y *Cyclocephala castaniella*, procedentes del Valle Central y Pacífico Central, fueron portadoras de *Pantoea agglomerans* y *Bacillus cereus*. Entre un 60% y 90% de las larvas, en todas las especies de jobotos estudiadas, *Pantoea agglomerans* presentó las mayores concentraciones de UFC, mientras que *Bacillus cereus* presentó las más bajas concentraciones. En los estados de huevo, pupa y adulto *Phyllophaga* presentó una mortalidad ocasionada por la infección *Pantoea agglomerans* en un 62%, 80% y 22,5% respectivamente. Se discute además, la posible interacción antagónica entre *Pantoea agglomerans* y *Bacillus cereus*. En general, en este estudio se observó que factores como la luz y manipulación de los instares larvales fueron los principales causantes de estrés en estos escarábidos.

ABSTRACT

Relationship between stress and development of entomopathogenic bacteria *Pantoea (Erwinia) agglomerans (herbicola)*, and *Bacillus cereus* in several species of the white grub complex (Col: Melolonthidae) (*Phyllophaga* spp., *Anomala* spp. and *Cyclocephala* spp.) in Costa Rica. Concentrations of Colony Forming Units (CFU) were determined for two entomopathogenic bacteria (*Pantoea agglomerans* and *Bacillus cereus*), at the egg, larval, pupal, and adult stages of agriculturally important *Phyllophaga* and *Cyclocephala* white grubs, which were collected in five agroecosystems in Costa Rica. L₂ and L₃ larvae of *Phyllophaga elenans* collected in all regions where the study was conducted were extensive carriers of *Pantoea agglomerans* and *Bacillus cereus*. L₂ and L₃ larvae of *Phyllophaga obsoleta*, *Phyllophaga menetriesi*, *Cyclocephala sanguinicollis* and *Cyclocephala castaniella* found in the Central Valley and Central Pacific regions were carriers of *Pantoea agglomerans* and *Bacillus cereus* bacteria. In 60% to 90% of larvae in all white grub varieties studied, *Pantoea agglomerans* showed greater concentrations of CFU than *Bacillus cereus*, which showed the lowest CFU concentration. Egg, pupal, and adult mortality in all *Phyllophaga* species was due to *Pantoea agglomerans* in 62%, 80% and 22.5% of the cases, respectively. A possible antagonistic interaction between *Pantoea agglomerans* and *Bacillus cereus* is also discussed. In general, it was noted that light and larval manipulation were the main stress factors affecting these scarabids.



INTRODUCCION

Las larvas de algunas especies de escarábidos que pertenecen a los géneros *Phyllophaga*, *Anomala* y *Cyclo-*

cephala, se han convertido en el centro de atención de muchos productores e investigadores, debido a que estos insectos les han ocasionado reducciones económicas en los rendimientos a una amplia gama de cultivos.

¹ Trabajo financiado por el CIPROC, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

² Laboratorio de Fitopatología, Escuela de Fitotecnia, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica.

³ Laboratorio de Entomología, Escuela de Fitotecnia, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica.

En la naturaleza se ha observado que los jobotos sufren enfermedades ocasionadas por otros organismos, desde hace muchas décadas. Entre estos organismos se han mencionado a las bacterias, las que han sido agrupadas en formadoras y no formadoras de esporas (Tanada, 1963).

Se ha informado sobre la capacidad limitada de sobrevivencia de bacterias no formadoras de esporas fuera de su hospedero, ya que rápidamente son destruidas por un efecto de desecación o por la luz solar (Tanada, 1963). Sin embargo, se ha indicado que pueden sobrevivir por periodos largos bajo ciertas condiciones, tales como suelos húmedos, cadáveres y heces. También se ha señalado que estas bacterias entomopatógenas son transmitidas a sus hospederos generalmente porque los mismos se alimentan de material contaminado con el entomopatógeno, o a través de canibalismo.

Isakova, 1954, citado por Tanada (1963) observó que cuando fueron multiplicadas al mismo tiempo tres especies de bacterias en un medio líquido, éstas resultaron más patogénicas a insectos que cuando fueron reproducidas individualmente.

Steinhaus, 1958, 59, citado por Tanada (1963), señaló que las infecciones bacterianas de insectos o infecciones latentes, frecuentemente han sido causadas por las mismas especies que habitan en el tracto digestivo de los insectos sanos, y que estas infecciones fueron manifestadas cuando un estrés provocó algún desorden en el mecanismo homeostático, lo que condujo a la multiplicación anormal de las bacterias en el tracto digestivo; aunado a esto se incrementó el estrés y permitió que las bacterias invadieran el hemocelo, provocando la septicemia en la larva (Bucher, 1981, citado por Shannon, 1994).

El estrés ha sido referido como el estado manifestado en un síndrome o cambios corporales causado por alguna fuerza, condición o circunstancia en o sobre un insecto, o sobre uno de los sistemas fisiológicos o anatómicos, que predisponen al insecto para que se le desarrolle una enfermedad infecciosa latente. El estresor es cualquier estímulo o sucesión de estímulos, que tiendan a romper la homeostasis de las larvas, dependiendo de las circunstancias y del nivel de intensidad (Steinhaus, 1958a, 1960b, citado por Tanada, 1963).

Vargas y Abarca (1991), informaron por primera vez sobre la patogenicidad de *Erwinia* y *Bacillus cereus* en algunas especies de *Phyllophaga*, en Costa Rica. Ambas bacterias fueron identificadas posteriormente en el Laboratorio de Fitopatología, de la Universidad de Wisconsin; en el caso de *Erwinia* como *E. agglomerans*, la cual ha sido recientemente reclasificada como *Pantoea agglomerans* por Baird *et al.*, pero para una ra-

za patógena en algodón (Graham y Hodgkiss, 1967; Baird, R.E. y Gitaitis, R.D., 1997).

Debido al potencial de los entomopatógenos latentes como medida de combate biológico promisorio para estos escarábidos, y a la carencia de información sobre la distribución de estos organismos en los agroecosistemas, y el grado en que estos patógenos son portados por las especies de jobotos, se decidió estudiar en algunas especies de importancia agrícola del complejo de jobotos de Costa Rica, a los entomopatógenos nativos de estos insectos en agroecosistemas diferentes, y determinar el grado en que estos organismos son portados por las especies de jobotos, así como establecer las relaciones entre las epizootias causadas por estos patógenos y los estados del ciclo de vida de estos coleópteros.

MATERIALES Y MÉTODOS

En los sitios ubicados en: Fraijanes, Santa Eulalia, San Isidro (Alajuela); Potrero Cerrado (Cartago); Fildelfia (Guanacaste); Miramar (Puntarenas) y Pérez Zeledón (San José); fueron colectadas larvas del complejo de jobotos en los estadios L₁, L₂ y L₃, colocadas en envases plásticos individualmente y trasladadas al laboratorio para los estudios correspondientes. Se utilizaron un promedio de 150 larvas por muestreo, por cada sitio de estudio. El recuento de larvas vivas se efectuó al ingreso de estas poblaciones al laboratorio y después cada 24 horas, durante todo el periodo larval, así como en los periodos de pupas y adultos.

Una parte de las larvas L₃ de las poblaciones colectadas en las zonas de estudio, fueron preservadas en KAAD (etanol, ácido acético glacial, dioxano y kerosene en una proporción 7:2:2:1, respectivamente) durante ocho horas. Luego, fueron colocadas en etanol al 70% v/v, para su posterior identificación. El raster y las estructuras taxonómicas observadas en el estadio L₃ de las larvas y propuestas por King (1985) y Morón (1986, 1988) fueron la base para la identificación al nivel de género y especie. En las poblaciones L₁, L₂ y la otra parte de las larvas L₃ fueron estudiados los organismos patógenos de estos estadios, así como en las pupas y adultos que fueron criados en el laboratorio.

Aislamientos de bacterias

Las larvas de estos insectos fueron colectadas y colocadas con precaución en bandejas plásticas divididas en celdas de 4,8 mm X 3 mm X 3,5 mm, con el fin de disminuir al máximo los efectos adversos que ocasionan estrés a estos escarábidos como son el manipuleo y la luz. Las larvas L₂ y L₃ fueron sumergidas en un recipiente de vidrio con agua a punto de ebullición

durante un minuto, luego fueron flameadas en alcohol de 95% v/v, con el fin de finalizar la limpieza, posteriormente con la ayuda de un bisturí esterilizado fue separada la cabeza del cuerpo, luego éste último (tórax y abdomen) fue macerado en 5 ml de agua destilada estéril, en un mortero previamente esterilizado. Del líquido obtenido se rayaron platos con medio de cultivo, basado en agar, papa, dextrosa (PDA), y se incubaron a 26°C durante 72 horas. Se emplearon cuatro repeticiones de platos por larva.

La identificación de las bacterias en cada plato petri, se basó en las características morfológicas de las colonias, y con la ayuda de un estereoscopio con luz transmitida por abajo, fue observada la refringencia y comparada con aislamientos identificados previamente. La población de unidades formadoras de colonias (U.F.C.) fue estimada mediante una escala visual que indicaron las concentraciones bajas (1-10 U.F.C.), medias (10-50 U.F.C.) y altas (+50 U.F.C.) por plato petri, las cuales fueron determinadas en estudios realizados por Vargas y Abarca (1991).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la zona de Fraijanes, los jobotos fueron identificados como *Phyllophaga obsoleta*, *Phyllophaga menetriesi*, *Anomala granulipyga*, *Cyclocephala castaniella* y *Cyclocephala sanguinicollis*. Estas especies se encontraron ocasionando pérdidas económicas principalmente en fresa (*Fragaria anannas*) y pasto kikuyo (*Pennisetum purpureum*) (Abarca y Quesada, 1997).

Las larvas en los estadios L₂ y L₃ de las especies de jobotos en esta zona de estudio, fueron altamente portadoras de la bacteria *P. agglomerans* cuyo porcentaje de concentración de bacteria por larva varió entre 60% y 75%, mientras que los mayores porcentajes de *B. cereus* fueron bajos en concentración por larva (variaron entre 13% y 24%). Sin embargo, las larvas fueron portadoras de las dos bacterias como se observa en el Cuadro 1.

En Potrero Cerrado, las larvas L₃ de las especies de *Phyllophaga*, fueron altamente portadoras de *P. agglomerans*, principalmente en bajas y altas concentraciones, mientras que *B. cereus* se presentó en bajas concentraciones (Cuadro 1).

Los jobotos asociados a la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) pertenecen a la especie predominante *P. elenans* en las zonas de Filadelfia, Miramar y Pérez Zeledón, de las Provincias de Guanacaste, Puntarenas y San José respectivamente (Cuadro 2). En Miramar la incidencia de otras especies de estos escarabidos fueron observadas en el siguiente orden descendiente: *P. menetriesi*, *Anomala spp.*, *P. hondura* y *P. dasypoda*; entre tanto en Pérez Zeledón se encontró únicamente *Anomala spp.* (Cuadro 2).

Las larvas de *P. elenans* en el estadio L₃, procedentes de la zonas de estudio, en general fueron portadoras en alto grado de *P. agglomerans*, donde los mayores porcentajes ocurrieron en las concentraciones de bajas a medias, en cambio, *B. cereus* mostró los mayores porcentajes en las concentraciones bajas (Cuadro 2).

Cuadro 1. Especies L₃ del complejo de jobotos (Col: Scarabaeidae) (*Phyllophaga*, *Anomala* y *Cyclocephala*) portadoras de *Pantoea agglomerans* y *Bacillus cereus*, según la concentración de UFC, en dos cultivos en Alajuela y Cartago, Costa Rica.

Localidad	Cultivo	Género y especie	Larvas L ₃ portadoras (%)					
			<i>P. agglomerans</i>			<i>Bacillus cereus</i>		
			A	M	B	A	M	B
Fraijanes	<i>Fragaria anannas</i>	<i>Phyllophaga obsoleta</i>	17,5	51,7	10,8	4,1	12,7	24,3
		<i>Phyllophaga menetriesi</i>						
	<i>Pennisetum clandestinum</i>	<i>Cyclocephala sanguinicollis</i>	7,4	51,8	6,9	0,0	0,0	13,7
		<i>Cyclocephala castaniella</i>						
Potrero Cerrado	<i>Pennisetum clandestinum</i>	<i>Phyllophaga obsoleta</i>	33,3	11,1	44,4	0,0	0,0	100
		<i>Phyllophaga menetriesi</i>						

A= Concentración alta de colonias por larvas.

M= Concentración media de colonias por larva.

B= Concentración baja de colonias por larva.

UFC= Unidades Formadoras de Colonias.

Cuadro 2. Larvas L₃ y L₂ del complejo de jobotos (Col: *Scarabaeidae*) (*Phyllophaga*, *Anomola* y *Cyclocephala*) portadoras de *Pantoea* (*Erwinia*) *agglomerans* y *Bacillus cereus*, según la concentración de U.F.C. en caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), en algunas provincias de Costa Rica.

Localidad	Género y especies	Larvas L ₃ y L ₂ portadoras (%)					
		<i>P. agglomerans</i>			<i>Bacillus cereus</i>		
		A	M	B	A	M	B
Filadelfia, Guanacaste	<i>Phyllophaga elenans</i>	5,0	10,0	85,9	0	10	90
		38,0	28,6	28,6	0	5	95
		16,6	8,3	70,8	0	10	90
		35,0	20,0	40,0	0	0	100
Miramar, Puntarenas	<i>Phyllophaga elenans</i>	23,3	53,3	13,3	0	0	100
		12,5	20,8	58,3	0	10	90
		17,7	29,4	52,6	0	0	100
		12,5	0,0	81,3	0	0	100
Buenos Aires, San José	<i>Phyllophaga elenans</i>	41,2	29,4	17,6	0	0	100
		20,0	40,0	35,0	0	0	100
		9,0	9,0	45,0	0	0	100
Atenas, Alajuela	<i>Phyllophaga menetriesi</i>	62,5	0,0	25,0	0	0	100
San Ramón, Alajuela	<i>Cyclocephala lunulata</i>	49,3	7,3	33,7	0	0	100
Carrizal, Puntarenas	<i>Phyllophaga obsoleta</i>	7,2	61,8	8,3	0	0	22,5

A= Concentración alta de colonias por larvas.

B= Concentración baja de colonias por larvas.

M= Concentración media de colonias por larvas.

UFC= Unidades Formadoras de Colonias.

En otras regiones cañeras como Carrizal de Esparza (Puntarenas) y San Ramón, Santa Eulalia, Atenas (Alajuela), las larvas en el estadio L₃ fueron identificadas como *P. obsoleta*, *C. lunulata* y *P. menetriesi* respectivamente (Cuadro 2).

Las larvas de *P. obsoleta*, *C. lunulata* y *P. menetriesi* resultaron altamente portadoras de *P. agglomerans* cuyos mayores porcentajes fueron observados en altas y bajas concentraciones de bacteria por larva; entre tanto el *B. cereus* fue encontrado en mayor porcentaje a bajas concentraciones (Cuadro 2).

En este estudio, las larvas del complejo de jobotos mostraron que aún en apariencia sana, fueron altamente portadoras de *P. agglomerans* y *B. cereus* las cuales coexistieron dentro de la larva; esta asociación de bacterias fue constante para todas las especies estudiadas, donde *P. agglomerans* presentó los mayores porcentajes de bacteria por larva comparado con *B. cereus* (Cuadros 1 y 2). También se observó que la concentración de *P. agglomerans* en las larvas varió entre las localidades y los cultivos, pero no entre géneros o especies. Esto podría estar relacionado con las concentraciones más altas de la bacteria en la rizosfera

y con mayor ingestión por la larva al alimentarse de las raíces o de materia orgánica. Además, los datos obtenidos revelaron una relación estrecha entre estas bacterias y algunas especies rizófagas de *Phyllophaga*, *Anomala* y *Cyclocephala* en los estadios L₂ y L₃. De hecho, esta relación y el grado de patogenicidad de *P. agglomerans* y *B. cereus* sobre larvas de *Phyllophaga*, fue informado por primera vez por Vargas y Abarca (1991).

La concentración de *P. agglomerans* en las larvas, varió entre la localidad y cultivo pero no entre géneros o especies.

Otro aspecto observado fue que cuando los jobotos fueron sometidos a condiciones de estrés tales como exposición a la luz, manipuleo y confinados a espacios reducidos, manifestaron los síntomas de enegrecimiento de los últimos segmentos abdominales, parálisis de la parte posterior del abdomen y pérdida de apetito, ocasionados por la enfermedad causada por *P. agglomerans* con la consecuente muerte de los mismos (Figura 1). Así, las larvas procedentes de Filadelfia mostraron una mortalidad de 20,7%, 24% y 24% en las larvas L₁, L₂ y L₃, respectivamente; las de Miramar, presentaron un 21,5%, 13,5% y 22,4% de mortalidad en

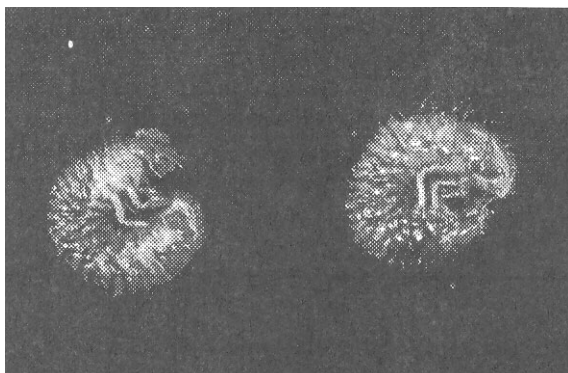


Figura 1. Síntomas de la enfermedad ocasionada por *P. agglomerans* en larvas de jobotos del género *Phyllophaga* spp. (Col: Melolonthidae).

los estadios L₁, L₂ y L₃, respectivamente y en las de Pérez Zeledón se observó una mortalidad de 51 %, 16% y 16% en los estadios L₁, L₂ y L₃, respectivamente (Cuadro 3).

También, fue evidente el dominio de la enfermedad causada por esta bacteria cuando se comparó con el *Bacillus*. Todo pareciera indicar que al someter ese alto porcentaje de larvas portadoras de las bacterias a condiciones de estrés, el proceso de la enfermedad fue desarrollado por *P. agglomerans* debido a un posible efecto antagónico de esta bacteria sobre el bacilus. Esto podría ser respaldado con lo afirmado por Isakova, 1954 y citado por Tanada (1963), cuando ha indicado que la virulencia e infectividad de las bacterias de la entomofauna, ha sido asociado con las relaciones sinérgicas o antagónicas que ocurren entre ellas.

P. agglomerans no produce esporas, no obstante es un habitante común del suelo, por esta razón ha sido aislada de larvas de jobotos que se han encontrado en

clases de suelo tales como Melanudands, Ustropets y Haplustands (Quesada y Abarca, 1997).

Es posible que las especies de jobotos en los agroecosistemas estudiados adquirieron a estas bacterias por ingestión, ya que en los primeros instares las larvas se alimentaron del suelo, el cual es probable que halla estado contaminado por cadáveres o heces de otras larvas que murieron infectadas por esta bacteria. Esto ha sido reafirmado por Tanada (1963) cuando citó los estudios realizados por White, 1923b, con respecto a las posibles formas de transmisión y permanencia de estas bacterias en el suelo. Aunado a esto, es probable que las bacterias estudiadas fueron parte de la flora microbiana en la rizosfera, de donde fueron adquiridas por las larvas a través del suelo o de las raíces.

Por otro lado, los huevos no escaparon a las enfermedades ocasionadas por bacterias y hongos. En condiciones de laboratorio, los huevos de *P. obsoleta* y *A. cupricollis* murieron por la enfermedad causada por *P. agglomerans*, para un 62% y 61 %, del total de huevos respectivamente (Cuadro 4). Además, *Metarrhizium anisoplae* provocó la muerte a huevos de *P. obsoleta* en un 3% del total de éstos (Cuadro 4). La transmisión de la bacteria a los huevos es posible que fue dada por materia fecal o cadáveres que contaminaron el muscílago externamente, como lo ha informado d'Herelle, 1914, citado por Tanada (1963).

Los estados de pupas también fueron afectados por la enfermedad, así en *P. obsoleta* fue encontrado un 100% de mortalidad de un total de 15 pupas; mientras que en *P. elenans* fue obtenido un 80 % de mortalidad, de un total de 15 pupas, bajo condiciones controladas. Los síntomas observados fueron un enegrecimiento del cuerpo, que se inició en la parte posterior del abdomen, posteriormente esa coloración oscura avanzó hacia el tórax y luego se presentó la muerte.

Cuadro 3. Relación entre la patogenicidad *Pantoea (Erwinia) agglomerans* y el estrés por manipuleo en larvas L₁, L₂ y L₃ de *Phyllophaga elenans*.

Localidad	Larvas L1				Larvas L2				Larvas L3						
	Total	Enfermas	(%)	Muer-tas	Total	Enfermas	(%)	Muer-tas	Total	Enfermas	(%)	Muer-tas			
Filadelfia, Guanacaste	121	1	0,8	17	14	145	1	0,7	24	19,8	312	1	3,2	51	16,3
Miramar, Puntarenas	28	2	7,0	4	14	78	2	2,6	9	11,5	565	18	3,2	90	16,0
Buenos Aires, San José	82	0	0,0	35	43	57	0	0,0	7	12,3	72	1	1,4	10	13,9

Cuadro 4. Patogenicidad de *P. agglomerans* y *Metarrhizum* sp. sobre huevos de *Phyllophaga obsoleta* y *Anomala cupricollis*, en condiciones de campo.

Género y especie	N° Total de huevos	N° Total de huevos muertos		Huevos muertos (%)	
		<i>P. agglomerans</i>	<i>Metarrhizum</i> sp	<i>P. agglomerans</i>	<i>Metarrhizum</i> sp
<i>Phyllophaga obsoleta</i>	264	164	8	62%	3%
<i>Anomala cupricollis</i>	44	27	0	61%	---

Los adultos también presentaron la muerte ocasionada por *P. agglomerans* en un 22,5% de un total de 40 individuos. Los síntomas observados fueron ennegrecimiento de la parte posterior del abdomen y los élitros mal formados, con la muerte como resultado final.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a Rafael Mata y Elizabeth Carazo (Escuela de Fitotecnia, Universidad de Costa Rica) por la revisión de este manuscrito. A la Vicerrectoría de Investigación, de la Universidad de Costa Rica por la cooperación en el desarrollo de este estudio. A Carlos Sáenz y al personal técnico de la Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar por su colaboración en el suministro de larvas.

LITERATURA CITADA

- ABARCA, G.; QUESADA, M.A. 1997. Especies del complejo de jobotos (*Phyllophaga* spp., *Anomala* spp. y *Cyclocephala* spp.), en el Valle Central y Pacífico Seco de Costa Rica. *Agronomía Mesoamerica* 8(2): 44-53.
- ARUGA, H. 1963. Induction of virus infections. *In* Insect Pathology. An Advanced Treatise. 1970. Ed. Steinhaus, E.A. V.I. Academic Press. New York and London. 2: 519-522.
- BAIRD, R.E.; GITAITIS, R.D. 1997. First report of cotton lint rot by *Pantoea agglomerans* in Georgia (Abtr). *Plant Disease* 81: 551.
- GRAHAM, D.e.; HODGKISS, W. 1967. Identify og Gram negative, yellow pigmented, fermentative bacteria isolated from plants and animals. *Journal Applied Bacteriology*. 30: 175-189.
- KING, A.B.S. 1984. Biology and identification of white grubs (*Phyllophaga*) of economic importance in Central America. *Tropical Pest Management* 30(1): 36-50
- KLEIN, M.G.; JACKSON, T.A. Bacterial Diseases of Scarabs. *In*: Use of Pathogens in Scarab Pest Management. 1992. Ed. Glare y Jackson. Hampshire, England. 43-61 pp.
- MORON, M.A. 1988. Las especies de *Phyllophaga* (Col: Melolonthidae) con mayor importancia agrícola en México. *In* III Mesa redonda sobre plagas del suelo. Michoacán, México. 81-102 p.
- SHANNON, P.J. 1994. Control microbiano de *Phyllophaga* spp. (Col: Melolonthidae). *In* Seminario-Taller Centroamericano sobre la Biología y Control de *Phyllophaga* spp. CATIE, Turrialba, Costa Rica. Memorias. pp. 80-93.
- TANADA, Y. 1963. Epizootiology of Infections Diseases. *In* Insect Pathology and advanced Treatise. 1963. Ed. E. Steinhaus. Academic Press. New York and London. 2: 423-475.
- VILLANI, M.G.; KRUEGER, S.R.; NYROP, J.P. 1992. A case study of the impact of the soil environment on Insect pathogens interactions. *In* Use of pathogens in scarab pest management. Ed. Glare y Jakson. Hampshire, England.
- VARGAS, E.; ABARCA, G. 1991. Patogenicidad de *Bacillus cereus* y *Erwinia* spp. sobre jobotos del género *Phyllophaga* spp. (Col: Scarabaeidae). *Agronomía Costarricense* 15(1/2): 157-162.