



DISTRIBUTION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI IN SOILS OF CATTLE FARMS AND FACTORS ASSOCIATED WITH THEIR PRESENCE IN THE MEXICAN TROPICS †

[DISTRIBUCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN SUELOS DE UNIDADES DE PRODUCCIÓN BOVINA Y FACTORES ASOCIADOS A SU PRESENCIA EN EL TRÓPICO MEXICANO]

Agustín Fernández-Salas¹, Rogelio Alejandro Alonso-Morales²
and Miguel Ángel Alonso-Díaz^{1*}

¹Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Km. 5.5 Carretera Federal Tlapacoyan-Martínez de la Torre, C.P. 93600, Martínez de la Torre, Veracruz, México. Emails. mvz_salasuv@hotmail.com, alonsodma@hotmail.com*

²Departamento de Genética y Bioestadística, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad #3000. C.U. Coyoacán, C. P. 04510, CDMX, México. Email. ralonsom@unam.com.mx

*Corresponding author

SUMMARY

Background. Ticks are one of the main threats that affect cattle production in Mexico. In the ecosystems, these parasites are naturally regulated by microorganisms such as entomopathogenic fungi (EPF) and bacteria, which are capable of causing them disease and death. However, some studies mention that the effects of climate change and wrong practices in the management of grasslands, trees and animals affect the distribution of these beneficial organisms in the livestock areas of Mexican tropic. **Objectives.** 1) To determine the distribution of EPF in cattle farm soils from the Mexican Tropics, 2) to identify the sites within the cattle farms with greatest presence and richness of EPF and 3) to identify factors associated with their presence. **Methodology.** Soil samples of seventy-two cattle farms from twelve municipalities of Veracruz, México, with high prevalence of ectoparasites, were collected. *Galleria mellonella* larvae were used as bait in order to isolate EPF from soils; then, fungi were identified by molecular methods. **Results.** Four genera of EPF were isolated and *M. anisopliae* was the most prevalent. Live fences soils showed the greatest EPF richness. The mountainous region (OR=2.25), cattle farm altitude (401-600 meters above sea level) (OR=3.81) and cattle farms where they do not use herbicides (OR=3.66) are factors associated to the presence of EPF in cattle farms soils ($P < 0.05$). **Implications.** Information about distribution and diversity of EPF, as well as the knowledge of factors that may affect them, will help to understand their importance as natural regulators of pests in cattle farms, to regulate agronomic activities to optimize their survival and help to design strategies for isolation of native EPF with potential bio-regulatory effects of ectoparasites. **Conclusions.** The isolation and richness of EPF in soils destined for the production of grazing cattle where *Metarhizium anisopliae* was the most isolated is reported for the first time in Mexico. The live fences soils presented the greatest wealth of EPF and some management and geographic characteristics were identified as factors associated with the fungal presence. **Keywords:** bio-regulators; *Metarhizium*; *Beauveria*; *Isaria*; *Purpureocillium*; ticks; ectoparasites; grassland.

RESUMEN

Antecedentes. La producción de bovinos es una de las actividades económicas más importantes que se realizan en México; sin embargo, parásitos como las garrapatas la afectan de forma significativa. Estos parásitos son regulados de forma natural, en los ecosistemas donde cohabitan, por microorganismos como los hongos entomopatógenos (HE) y bacterias que son capaces de causarles enfermedades y provocarles la muerte. Sin embargo, algunos estudios mencionan que los efectos del cambio climático, las malas prácticas en el manejo de los pastizales, de los árboles y de los animales, están afectando la distribución de estos organismos benéficos en las zonas ganaderas del país. **Objetivos.** 1) Determinar la distribución de hongos entomopatógenos en suelos de unidades de producción bovina (UPB) en el trópico mexicano, 2) identificar los sitios dentro de las UPB con mayor presencia y riqueza de HE e 3) identificar los factores asociados a su presencia. **Metodología.** Se colectaron muestras de suelo en 72 UPB de 12 municipios de Veracruz, México, con alta prevalencia de ectoparásitos. Para el aislamiento de HE se utilizó la técnica de cebo con larvas de *Galleria mellonella*, y después se identificaron molecularmente. **Resultados.** Se

† Submitted April 20, 2020 – Accepted July 25, 2020. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License.
ISSN: 1870-0462.

aislaron cuatro géneros de HE, siendo *M. anisopliae* el más prevalente y donde los suelos de los cercos vivos mostraron la mayor riqueza fúngica. La región montañosa (OR=2.25), la altitud de la UPB (401-600 msnm (OR=3.81) y las UPB que no se usan herbicidas (OR=3.66) son factores asociados a la presencia de HE en los suelos de las UPB ($P < 0.05$). **Implicaciones.** La información sobre la distribución y diversidad de los HE, así como el conocimiento de los factores asociados a su presencia, puede ayudar a comprender su importancia como reguladores naturales de plagas en las UPB, a regular actividades para optimizar su sobrevivencia y ayudar a diseñar estrategias de aislamientos de HE nativos con potencial efecto bio-regulador de ectoparásitos. **Conclusiones.** Se reporta por primera vez en México el aislamiento y la riqueza de HE en suelos destinados a la producción de bovinos en pastoreo donde *Metarhizium anisopliae* fue el HE más aislado. Los suelos de cercos vivos presentaron la mayor riqueza de HE y se identificaron algunas características geográficas y de manejo como factores asociados a la presencia fúngica.

Palabras clave: bio-reguladores; *Metarhizium*; *Beauveria*; *Isaria*; *Purpureocillium*; garrapatas; ectoparásitos, pastizales.

INTRODUCCIÓN

La producción de ganado bovino en México es una actividad económicamente importante que se realiza a través de todo el territorio nacional, ocupando más de 110 millones de hectáreas con 1.1 millones de UPB (SADER, 2018). La ganadería bovina se basa principalmente en el pastoreo directo en sistemas extensivos de producción (Castillo-Gallegos *et al.*, 2005). Esta amplia superficie del territorio nacional dedicada a la ganadería tiene un impacto en el uso natural de los recursos y puede afectar la calidad y la preservación de los ecosistemas (González-Padilla *et al.*, 2019). Actualmente, con las nuevas reformas de protección a los hábitats (flora y fauna), así como a la regulación y optimización del uso de químicos en los suelos dedicados a la producción agropecuaria (Mendoza-Cantú e Ize-Lezama, 2017), es importante conocer los aspectos ecológicos de los enemigos naturales que pueden ayudar a mantener las poblaciones plaga en niveles que afecten lo menos posible a las plantas y a los animales.

Las regiones ganaderas tropicales de México se caracterizan por presentar una gran variación climática, destacando las elevadas temperaturas y los altos porcentajes de humedad ambiental, situación viable para el desarrollo de diversos agentes patógenos causantes de afectaciones sanitarias, donde las enfermedades parasitarias representan el 80% de los problemas de salud en la región (García-Gutiérrez, 2004). Entre los parásitos más importantes que afectan al ganado bovino en la UPB, se encuentran los ectoparásitos (garrapatas, ácaros y moscas) que se controlan principalmente mediante el uso de antiparasitarios químicos (Fernández-Salas *et al.*, 2012a). En estos hábitats, existen diversos microorganismos bio-reguladores tales como bacterias, hongos, nematodos, protozoarios y hongos entomopatógenos (HE) con la capacidad de establecerse, desarrollarse y matar ectoparásitos de forma natural. Estos bioreguladores se han evaluado para determinar su potencial como agentes de control biológico (Samish y Rehacek, 1999). A nivel de microhábitat, la regulación natural de plagas por estos

microorganismos con los que conviven, es uno de los factores más importantes de equilibrio en los ecosistemas (Jackson *et al.*, 2000; Keller & Zimmerman, 1989), evitando posiblemente, epizootias importantes. Los HE se han caracterizado como letales contra las garrapatas en diversos estudios (Fernandes and Bittencourt, 2008). Los principales géneros de HE que existen en los suelos y que han probado ser bio-reguladores de un amplio rango de plagas son *Metarhizium spp.*, *Beauveria spp.* e *Isaria spp.* (Domsch *et al.*, 1980). Los hábitats en los que se encuentran estos hongos son variados, y su presencia, distribución y abundancia dependerán del sustrato donde puedan reproducirse y de las condiciones climatológicas para el desarrollo adecuado de su ciclo biológico. Estos organismos ayudan a mantener en equilibrio ecológico a los ectoparásitos y los mantienen dentro de un umbral poblacional estable en los diferentes ecosistemas (Azevedo y Melo, 1998).

Conocer la distribución y diversidad de los HE ayudará a comprender su importancia como reguladores naturales de plagas en los pastizales de las UPB tropicales, así como ayudar a establecer metodologías de control biológico basadas en estas distribuciones. Existen algunos factores geográficos y algunas actividades de manejo en las UPB que pueden influir en la sobrevivencia y presencia de los HE en los suelos, por lo que un enfoque claro de su distribución, puede ayudar a regular algunas actividades para optimizar la subsistencia de estos bio-reguladores. No existen estudios donde se identifique la distribución y presencia de HE en suelos de UPB en zonas tropicales de México. Los objetivos del presente estudio fueron: 1) determinar la distribución de HE en suelos de UPB en el trópico mexicano, 2) identificar los sitios dentro de las UPB con mayor presencia y riqueza de HE, y 3) identificar los factores asociados a su presencia en los suelos de las UPB.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Se realizaron muestreos de suelo en doce municipios de la zona centro-norte del estado de Veracruz, con amplia actividad ganadera bovina y alta prevalencia de garrapatas *Rhipicephalus microplus* y *Amblyomma mixtum* (Fernández -Salas *et al.*, 2012b). En cada municipio se seleccionaron seis UPB por conveniencia de acuerdo a los siguientes criterios de

inclusión: distancia geográfica entre cada UPB igual o mayor a 20 km, con problemas de infestaciones de garrapatas y consentimiento del dueño para realizar los muestreos. En la región se han hecho reportes de poblaciones de garrapatas con resistencia a varias familias de acaricidas y lactonas macrocíclicas utilizadas para su control (Alonso-Díaz *et al.*, 2013a; Fernández-Salas *et al.*, 2012a y 2012b). La localización de los municipios y las características geo-climáticas de las zonas de muestreo se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Características geo-climáticas promedio de los 12 municipios considerados para los muestreos de suelos en las UPB de Veracruz, México.

Mpio	Zona	Coord. (Lat y long)	Msnm	Clima	Temp prom.	Prec. Pluv.	Tipo de suelo	Principal actividad
Atzalan	Montañosa	19°47'N. 97°14'O.	1,660	Templado-húmedo-regular	16.2°C	2245.5 mm	Andosol Feosem Luvisol	Ganadería Agricultura
Colipa	Montañosa	19°55'N. 96°43'O.	200	Cálido-regular	22.4°C	1671 mm	Luvisol	Agricultura Ganadería
Juchique de Ferrer	Montañosa	19°50'N. 96°42'O.	280	Cálido-regular	25°C	999.8 mm	Luvisol	Ganadería Agricultura
Martínez de la Torre	Planicie	20°04'N. 97°04'O.	151	Cálido-húmedo-regular	23.7°C	1293.6 mm	Luvisol	Agricultura Ganadería
Misantla	Montañosa	19°56'N. 96°51'O.	300	Cálido-húmedo-regular	22.7°C	2036.4 mm	Luvisol Vertisol	Agricultura Ganadería
Nautla	Costera-Planicie	20°12'N. 96°46'O.	10	Cálido-húmedo	22.5°C	1338 mm	Gleysol Aluvial Coluvial	Ganadería Agricultura
San Rafael	Planicie	20°11'N. 96°51'O.	30	Trópico-húmedo	30°C	1330 mm		Agricultura Ganadería
Tlapacoyan	Planicie y Montañosa	19°58'N. 97°13'O.	430	Cálido-húmedo-regular	18°C	1500 mm	Luvisol	Agricultura Ganadería
Vega de Alatorre	Costera-Planicie	20°02'N. 96°57'O.	10	Cálido-regular.	23.9°C	1368.7 mm	Coluvial	Ganadería Agricultura
Yecuatla	Montañosa	19°52'N. 96°47'O.	420	Cálido-regular	22.5°C	1764.1 mm	Andosol	Agricultura Ganadería
Tecolutla	Costera	20°29'N. 97°00'O.	10	Cálido-regular.	23.6°C	1494.0 mm	Regesol	Ganadería Agricultura
Alto Lucero	Montañosa	19°45'N. 96°49'O.	2040	Templado-regular.	25.2°C	1105.6 mm	Feosem	Ganadería Agricultura

Mpio: municipio; Msnm: metros sobre el nivel del mar; N: Norte; O: Oeste; mm: milímetros. Información obtenida de INEGI. Carta topográfica, 2013 y Gobierno del Estado de Veracruz, anuario estadístico, 2012.

Muestreos de suelos

Las UPB fueron visitadas para su muestreo durante el periodo enero - noviembre del 2015 y de cada una se tomaron tres muestras de suelo de tres diferentes zonas: a) potrero: donde los bovinos pastan la mayor parte del tiempo y donde la presencia de garrapatas (larvas, ninfas y adultas) tiende a ser elevada, b) cercos vivos: donde los bovinos buscan sombra para descansar y refugiarse del sol y donde las condiciones de humedad son propicias para el mantenimiento de los hongos y el desarrollo de ectoparásitos, y c) corrales: donde los animales son reunidos todos los días para su manejo (ordeña, amamantamiento, alimentación y/o tratamientos médicos) y donde las garrapatas pueden desprenderse y desarrollarse en gran proporción (Alonso-Díaz *et al.*, 2013b). De cada zona se tomaron cinco sub-muestras de suelo de 150 a 200 g, aproximadamente, en bolsas de polietileno limpias y nuevas (INTA, 2000). El sistema de muestreos en cada zona fue sistemático y se realizó de acuerdo a los siguientes protocolos:

Potrero: el muestreo se realizó en forma de cinco de oros (SENASICA, 2012) a una distancia de 50 m entre cada punto. El potrero a muestrear fue seleccionado de forma aleatoria y de acuerdo al número de potreros en el rancho (ninguno de los potreros sobrepasó las 10 hectáreas de superficie) (Rendón, 1994).

Cercos vivos: se eligieron por conveniencia de acuerdo a la accesibilidad, donde se marcó un transecto y cada 25 metros se tomó una submuestra hasta cubrir 100 metros (Cámara y Díaz, 2013).

Corrales: las sub-muestras fueron tomadas al azar en forma de zig-zag cada 30 pasos de distancia hasta completar las cinco tomas (INIFAP, 2012).

Las sub-muestras fueron tomadas con la ayuda de un muestreador de suelos tipo barreno (Lord 0225[®]) a una profundidad de 200 mm (INTA, 2000) y 30 mm de diámetro sin considerar la materia orgánica (Buduba, 2004). Las cinco sub-muestras de cada zona fueron mezcladas para su homogenización, se identificaron con los datos de la UPB y se colocaron en hieleras plásticas con refrigerantes para su protección y transporte al Laboratorio de Sanidad Animal del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical de la FMVZ-UNAM en Martínez de la Torre, Veracruz, México, para su procesamiento.

Toma de datos y aplicación de cuestionarios

En cada sitio se recorrió el área considerando las zonas homogéneas en cuanto a tipo de suelo y apariencia física. Se registraron los detalles de las áreas de muestreo como: partes altas o bajas, planas o inclinadas, consistencia del suelo (arenoso o húmedo) y vegetación alta, media o baja. En cada sitio se determinó si la zona era inundable o no inundable, las coordenadas geográficas y la altitud de la UPB (msnm) con ayuda de un GPS (Explorist 500[®], Magellan). A los dueños o encargados de las UPB se les aplicó un cuestionario para conocer las características del manejo de suelos tales como: tiempo de uso para pastoreo de animales, frecuencia de fertilizaciones y aplicación de herbicidas (Tabla 2).

Técnica de aislamiento

Para el aislamiento de HE de las muestras de suelo se utilizó la técnica de cebo con larvas de la polilla mayor de la cera *Galleria mellonella* (Zimmermann, 1986). Este método ha sido ampliamente recomendado para el aislamiento de HE y ha demostrado ser eficaz para este propósito (Meyling, 2007). Brevemente, cada muestra de suelo fue pasada a través de un tamiz con poros de 2mm de apertura con la finalidad de remover piedras, restos de basura y plantas. Si las muestras estaban muy secas, se les aplicó agua destilada estéril para proporcionarle humedad. Del suelo tamizado, se tomaron 300 g y se colocaron en contenedores de 1 kg de capacidad. Posteriormente, a cada contenedor se le colocaron cinco larvas de *G. mellonella* de último estadio como cebo para los HE. Cada muestra fue identificada e incubada a $27 \pm 2^\circ$ C de temperatura durante dos semanas. Cada dos días los contenedores fueron invertidos con la finalidad de que las larvas entraran en contacto con la mayor cantidad de suelo. Se realizaron evaluaciones de las larvas a los días 3, 5, 7 y 14 con la finalidad de determinar si existía algún crecimiento de hongos.

Pasados los 14 días, las larvas fueron recuperadas de las muestras de suelo, separadas y desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0.5% durante tres minutos, posteriormente fueron secadas con papel absorbente y enjuagadas con agua destilada estéril tres veces. En seguida, las larvas fueron colocadas individualmente en cajas de Petri (60 x 10 mm) conteniendo papel filtro Whatman # 1 esterilizado y humedecido con agua destilada estéril. Las cajas con las larvas fueron identificadas e incubadas en una estufa de cultivo durante 10 días a $27 \pm 2^\circ$ C de T y 85-95% de humedad. Las larvas fueron inspeccionadas de forma diaria para identificar señales de micosis, verificar condiciones de humedad y descartar infecciones por bacterias. Las larvas que mudaron a pupa durante la incubación fueron desechadas.

Tabla 2. Variables consideradas como posibles factores asociados a la presencia de los hongos entomopatógenos en unidades de producción bovina de Veracruz, México.

Variables	Descripción	Término
Uso de herbicidas	Utilización de químicos para el control de malezas en las UPB.	Si No
Altitud	Altura en msnm de la zona de muestreo	0-200 msnm 201-400 msnm 401-600 msnm > 601 msnm
Región	Región geográfica donde se encuentra la UPB	Costera Planicie Montañosa
Tiempo de pastoreo	Años que el suelo ha sido dedicado a la producción de bovinos.	10-20 años 21-30 años >31 años
Cobertura vegetal	Altura de la vegetación presente en la zona muestreada	Baja Media Alta
Uso de fertilizantes	Aplicación de fertilizantes para pastos	Si No
Zona de muestreo	Posición dentro de la UPB	Alta Baja
Superficie	Relieve de la superficie muestreada	Inclinada Plana
Agua en la zona	Zonas que pueden presentar inundaciones en diferentes épocas del año.	Inundable No inundable
Consistencia del suelo	Presencia de humedad en la muestra de suelo	Arenoso Pesado
Tipo de vegetación	Tipo de vegetación presente en la zona	Nada Maleza Pasto Árboles

Identificación taxonómica de los hongos aislados

Cuando se observó crecimiento de hongos en *G. mellonella*, posteriormente a la esporulación de éstos, se procedió a su identificación valiéndose de claves taxonómicas basadas en las características morfológicas de las estructuras reproductivas, forma y tamaño de sus esporas y las características de crecimiento (Domsch *et al.*, 1980; Nelson *et al.*, 1983; Samson *et al.*, 1987). Larvas infectadas con hongos oportunistas (*Penicillium spp*, *Aspergillus spp* o *Fusarium spp*) se desecharon. Los hongos aislados del mismo rancho, pero de diferente zona (potrero, cerco o corral), fueron consideradas cepas diferentes cuando la distancia entre cada muestreo era de más de 1 km. A cada cepa se le asignó una clave de identificación con las iniciales del género y especie del hongo, la inicial del estado de aislamiento (Veracruz) y un número consecutivo de acuerdo al orden de aislamiento.

Almacenamiento de los hongos aislados

Las esporas de los HE se sembraron en agar papa y dextrosa (APD) en placa con la finalidad de obtener cultivos monospóricos de cada uno. Después de 21 días post-siembra, y a partir de los cultivos monospóricos, se procedió a sembrar los HE en forma estriada en APD en tubo inclinado para su purificación (Humber, 2012). Después de 21 días, las conidias se colectaron por raspado en agua destilada estéril con 15 % de glicerol y 1 ml fue colectado y depositado en criotubos estériles de 1.5 ml con 10 repeticiones. Los criotubos se almacenaron en un congelador a -80° C para su mantenimiento.

Identificación molecular

Cada cepa de la colección se descongeló (un tubo) y se sembraron 100 µl en APD en placa para posteriormente ser incubados a 28°C. El tiempo de incubación duró hasta que se observó desarrollo de micelio en el medio de cultivo.

Obtención de ADN

El ADN de los HE se obtuvo del micelio de acuerdo a la técnica descrita por Hoffman y Winston (1987) y Galán-Franco *et al.* (2011). Brevemente, se colectó el micelio y congeló a -120°C durante una hora en paquetes de papel aluminio. Posteriormente, los paquetes se colocaron en nitrógeno líquido por 20 segundos, se recuperó el micelio y este se maceró. Se tomaron 500 mg de micelio macerado y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml, al cual se le agregaron 600 μl de una solución Buffer-UREA (Urea 7 Molar; NaCl 0.35 Molar; TrisHCl 0.05 Molar, pH 8.0; EDTA 0.02 Molar y Sarcosina 1%). Los tubos se homogenizaron durante dos minutos y reposaron por 30 minutos a temperatura ambiente. Después se agregaron 600 μl de fenol-cloroformo (1:1), se homogenizaron durante cinco minutos y se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 minutos a 4°C . El sobrenadante fue recuperado y transferido a un tubo nuevo para agregarle 600 μl de fenol-cloroformo nuevamente. Se utilizó la misma metodología, arriba descrita, hasta obtener un nuevo sobrenadante. A continuación, cinco μl de ARNasa (Sigma, St. Louis, MO), diluidos en 150 μl de agua ultra-purificada, fueron adheridos al sobrenadante y la mezcla fue incubada a 37°C durante diez minutos. Nuevamente se agregaron 600 μl de fenol-cloroformo y se siguió la misma metodología hasta obtener otro sobrenadante. Éste se transfirió a un nuevo tubo donde se agregaron diez volúmenes de acetato de sodio (3 M) (1:10), y dos volúmenes de Isopropanol (1:2), con la finalidad de precipitar los ácidos nucleicos, y en seguida se incubaron por una hora a -20°C . Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante diez minutos a 13,000 rpm, se recuperó el botón de ADN, se lavó con 1 ml de etanol al 70 % y se centrifugó por cinco minutos a 13,000 rpm. A continuación, el ADN se re-suspendió en 30 μl de agua estéril ultra-purificada. La concentración de ADN se cuantificó utilizando un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA), y se almacenó a 4°C hasta su requerimiento.

Amplificación del ADN

Para la identificación molecular se amplificaron las secuencias de los espaciadores transcritos internos ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (ITS; por sus siglas en inglés) (White *et al.*, 1990), los cuales amplifican un fragmento de 550 pares de bases incluyendo: una secuencia parcial de la subunidad 18S, el ITS1, la subunidad 5.8S, el ITS2 y una secuencia parcial de la subunidad 28S del ADN de genes ribosomales. Se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) mediante un termociclador Bio-Rad T 100 JB Lab. Las mezclas para las reacciones de PCR se

compusieron de 0.25 μl de cada primer (Sigma-Aldrich®), 0.625 μl de MgCl_2 , 0.2 μl de dNTPs (Invitrogen™), 0.15 μl de Taq polimerasa (Amplificasa®, BioTecomol, México), 1.25 μl de 10X de buffer de reacción PCR, 1 μl de ADN y 8.77 μl de agua destilada estéril. Los ciclos térmicos se diseñaron de acuerdo al siguiente esquema: un ciclo inicial de desnaturalización de 94°C por cinco minutos, después 38 ciclos (desnaturalización: 94°C por 30 segundos; alineamiento: 56°C por 30 segundos; extensión: 72°C por un minuto) y un ciclo de extensión final a 72°C por cinco minutos. Los productos PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1 % en 1X TAE. Un marcador de 100 pb (GelPilot®) fue utilizado y los geles se tiñeron con bromuro de etidio ($0.1\ \mu\text{g mL}^{-1}$) y se visualizaron en un fotodocumentador. Los productos PCR fueron purificados con un Kit de purificación QIAquick (QIAGEN®, GmbH, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. La región amplificada se secuenció en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del CINVESTAV, Irapuato, Guanajuato, México mediante el método Sanger y la tecnología de capilares con sistemas AB13730 X1.

Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva para determinar las frecuencias de aislamiento en cada municipio y entre cada zona dentro de la UPB. La abundancia de cada género de HE se calculó al dividir el total de hongos de un mismo género aislado entre el número total de los hongos aislados (Magurran, 2004). La asociación de los posibles factores relacionados a la presencia de HE con los resultados de aislamiento de hongos fue analizada mediante un análisis de regresión logística binomial (análisis multivariado) usando Statgraphics 15.2.06. Se obtuvieron estimaciones exactas de regresión, intervalos de confianza al 95% (IC95%), odds ratio (OR) y valores de P . Un valor de $P < 0.05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total se aislaron 68 cepas de HE, de las cuales 59 fueron de *Metarhizium anisopliae*, seis de *Beauveria bassiana*, dos de *Isaria (Paecilomyces) fumosorosea* y una de *Purpureocillium lillacinum* (Tabla 3). Este hallazgo es similar a lo reportado por Sun *et al.* (2008) en suelos de cultivos agrícolas y por Bruck (2004) en suelos de viveros, quienes mencionan que *M. anisopliae* es el HE más común, seguido por *B. bassiana* y *Paecilomyces spp.* D'Alessandro *et al.* (2012) mencionan que *M. anisopliae* junto con *P. lillacinum* fueron los únicos HE aislados en muestras de suelos de pastizales altamente infestados por garrapatas *A. mixtum*. Por otro lado, Asensio *et al.* (2003) en suelos agrícolas, bosques y matorrales, así

como Hernández-Velázquez *et al.* (2011) en suelos de cultivo de maíz, mencionan que *B. bassiana* es el hongo con mayor presencia, seguido por *M. anisopliae* y *L. lecanii* o *Paecilomyces* sp. Algunas características como la región, el uso de los suelos y la época del año, pueden influir sobre la presencia y el aislamiento de los HE. En este estudio, los HE *Metarhizium* y *Beauveria* tuvieron mayor presencia en los suelos de las UPB. Esto puede ser explicado por la alta gama de hospederos y sustratos que *Metarhizium* y *Beauveria* pueden utilizar para su reproducción, y así favorecer su sobrevivencia y distribución. La mayoría de los suelos usados en este estudio provienen de ecosistemas con alta cantidad de insectos, garrapatas y materia orgánica, lo cual favorece la disponibilidad de nutrientes para los HE (Fernández-Salas, 2017). Otro factor que pudo influir sobre la mayor presencia de *M. anisopliae* es la capacidad de este hongo para desarrollarse a temperaturas altas y a una mayor humedad (Hernández-Velázquez *et al.*, 2011), características que predominan en la región de estudio. *M. anisopliae* se adapta mejor que los demás HE a 25 - 30° C de temperatura y 100 % de HR (Vannien, 1996). Además, la amplia variedad de sub-especies y variedades de *M. anisopliae* aumentan la presencia y adaptación de este hongo a diversos ecosistemas, incluyendo los tropicales.

Los requerimientos ambientales y de hábitat de cada género, especie o variedad de HE son diferentes y de esto depende su presencia, ausencia, riqueza y distribución. En el presente estudio, la mayor cantidad de cepas de *M. anisopliae* se aislaron en la zona de corrales (40.7 %), y en menor cantidad en potreros (32.2%) y cercos (27.1 %). En el caso de *B. bassiana*, tres de las seis cepas aisladas (50 %) se obtuvieron de los suelos de los cercos vivos, dos de potreros (33.3 %) y una de un corral (16.7 %). Las dos cepas de *I. fumosorosea* y la cepa de *P. lillacinum* se aislaron de los suelos de los cercos vivos (Tabla 3). La mayor riqueza de HE se encontró en los suelos de los cercos vivos, donde se presentaron los cuatro géneros reportados (Tabla 3).

Asencio *et al.* (2003) mencionan que *B. bassiana* se presenta con mayor frecuencia en bosques y matorrales, es decir, en zonas con más sombra, materia orgánica y humedad, lo cual coincide con este estudio. Además, Quesada-Moraga *et al.* (2007) mencionan que la ocurrencia para cada género de HE está influenciada por la especie del hongo y el tipo de hábitat y que, en particular *B. bassiana* se presenta con mayor intensidad en suelos de hábitats naturales (sin actividad agrícola o pecuaria), y *M. anisopliae* en suelos cultivables (Sun *et al.*, 2008). Lo anterior puede ayudar a explicar los resultados reportados en este estudio, donde en los suelos de las UPB que tienen una actividad pecuaria elevada, hubo una

mayor presencia de *M. anisopliae*, mientras que los suelos en los cercos vivos fueron propicios para el desarrollo de *B. bassiana*. Es probable que además de la baja actividad pecuaria en los suelos de cercos vivos, haya otros factores como una mayor humedad, sombra, sustratos como materia orgánica y amplia variedad de insectos y arácnidos que favorecen la mayor presencia de *B. bassiana*. Estas mismas causas propician la mayor riqueza de HE, razón por la cual los cuatro géneros reportados se aislaron en estas zonas.

Tabla 3. Número y porcentaje de hongos entomopatógenos aislados en las tres diferentes zonas de muestreo de las unidades de producción bovina.

Hongo entomopatógeno	Cepas aisladas de suelos en cada zona dentro de los ranchos [No (%)]			
	Potrero	Cerco vivo	Corral	Total
<i>M. anisopliae</i>	19 (32.2)	16 (27.1)	24 (40.7)	59 (100)
<i>B. bassiana</i>	2 (33.3)	3 (50.0)	1 (16.7)	6 (100)
<i>I. fumosorosea</i>	-	2 (100)	-	2 (100)
<i>P. lillacinum</i>	-	1 (100)	-	1 (100)
Total de cepas	21	22	25	68 (100)

No: número.

En cuanto a la región, la mayor abundancia y riqueza de HE se encontró en la región plano-montañosa (Juchique de Ferrer, Colipa y Yecuatla) y en menor proporción en la zona costera (Figura 1).

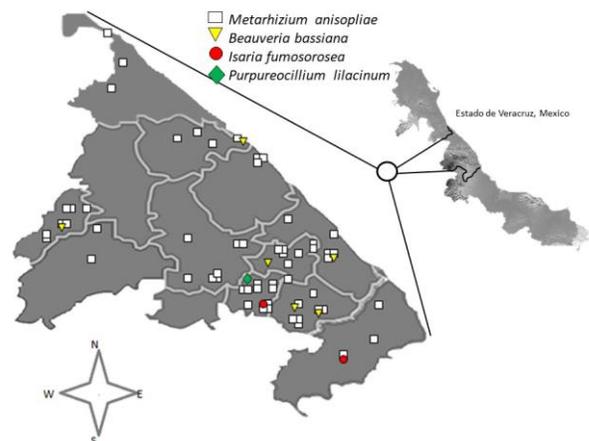


Figura 1. Distribución de hongos entomopatógenos en unidades de producción bovina en 12 municipios de la zona centro-norte de Veracruz, México.

Este hallazgo se puede explicar debido a las diferencias en las características nutricionales de los suelos, tales como los componentes químicos, materia orgánica, salinidad y pH (Garrido-Jurado *et al.*, 2011). Al ser hongos saprófitos, su sobrevivencia también está influenciada por diversos factores como las propiedades físico-químicas de los suelos, hidrofobicidad de los sustratos y las interacciones electrostáticas (Wollum y Cassel, 1978; Storey y Gardner, 1987). Los suelos de las regiones costeras tienden a ser arenosos, y las condiciones óptimas para la sobrevivencia de las conidias de los HE tienden a ser inferiores debido a una menor retención de estas en ese tipo de suelos, sobre todo para *B. bassiana* (Garrido-Jurado *et al.*, 2011). Además, la alta salinidad en suelos (como en las regiones costeras y algunas partes de planicies) puede ser un factor relacionado con la baja abundancia y baja diversidad relativa de los microorganismos (Arenz y Blanchette, 2011). Al respecto, Quesada-Moraga *et al.* (2007) mencionan que suelos arenosos alcalinos provocan ausencia de los HE, incluyendo los más importantes. En contraparte, en las regiones montañosas las condiciones ambientales y de sombra, humedad de suelos, materia orgánica y nutrición de los suelos tiende a ser óptimos para el crecimiento de los HE (Jarillo-Rodríguez, comunicación personal).

Con relación a los factores asociados a la presencia de HE, se encontró que las UPB de las regiones montañosas (OR = 2.25, IC de 95 % = 1.02 - 4.92, P = 0.04), las UPB en altitudes entre 401 y 600 msnm (OR = 3.81, IC de 95 % = 1.35 - 10.67, P = 0.007) y las UPB donde no se utilizan herbicidas para el control de malezas (OR = 3.66, IC de 95 % = 1.79 - 7.54, P = 0.00016) son factores asociados a la mayor presencia de HE y probabilidades más altas de aislarlos en sus suelos (Tabla 4).

Aunque los HE son cosmopolitas y, básicamente, se ha reportado su presencia en casi todas las regiones (Augustyniuk-Kram y Kram, 2012), la altura puede jugar un papel determinante en la supervivencia, presencia y riqueza de los HE debido a factores como la temperatura. Por ejemplo, en las zonas tropicales, a menor altura, las temperaturas tienden a ser superiores a las que prevalecen en las zonas más altas y en el presente estudio, se encontró mayor presencia de HE conforme los aislamientos se realizaban en zonas con mayor altura (401-600 msnm). Se ha reportado que el frío extremo o el calor ambiental son dos factores abióticos muy importantes en la permanencia y desarrollo de la mayoría de los HE (Fernandes *et al.*, 2008). Además, en la región de estudio, la estructura de los suelos tiende a ser diferente en las zonas bajas en comparación con las zonas altas. En las zonas más bajas y más arenosas, la red de poros del suelo tiende a ser menos densa, por lo tanto, los componentes nutricionales son menores.

Esto implica que los patrones de obtención de nutrientes para los HE sean más extensos, provocando una mayor necesidad de energía (Ritz y Young, 2004) y disminuyendo, de cierta forma, su sobrevivencia. Caso contrario, a mayor densidad de la red de poros pequeños en el suelo, los microbios tienden a establecerse mejor, debido a una mayor disponibilidad nutricional (Harris *et al.*, 2003). Esta misma característica tiene que ver con la distribución de agua, necesaria para la sobrevivencia de los HE, donde la misma densidad mayor en la red de poros, permitiría mejor retención de agua y, por ende, una mayor humedad y mejores oportunidades de sobrevivencia (Ritz y Young, 2004).

Al respecto, y coincidiendo con este trabajo, Wakil *et al.* (2013) mencionan que la altitud puede influenciar la ocurrencia de HE en insectos y reporta que en su estudio se aislaron más cepas de HE a partir de 400 msnm de altura, y que a menor altitud los aislados tienden a disminuir. De la misma manera, Samson *et al.* (2013) refuerzan nuestros resultados al reportar que hongos como los entomofthorales demuestran mayor presencia en poblaciones de insectos forestales en los hábitats de mayor altitud con climas subtropicales a templados. Además, Quesada-Moraga *et al.* (2007) sugieren un rango de altitud de 400 a 700 msnm óptimo para el crecimiento y la diversidad de los HE, coincidiendo con el presente estudio, donde las probabilidades de aislar más HE se presentaron en alturas entre 401 y 600 msnm. Es importante mencionar que algunos autores sugieren que, hasta los 1608 msnm, en condiciones sub-tropicales y tropicales, hay condiciones favorables para el desarrollo de los HE, siendo afectados a altitudes superiores a 5200 msnm (Sun y Liu, 2008). En cuanto al uso de agroquímicos, los enemigos naturales de plagas han mostrado ser sensibles a los pesticidas químicos en general (Havron *et al.*, 1987). Se conoce que la aplicación regular de herbicidas puede causar cambios en los componentes biológicos de los hábitats, a través de la alteración de ciertas uniones en la cadena de las inter-relaciones biocenóticas (Poprawski y Majchrowicz, 1995). En el presente estudio se reporta que no utilizar herbicidas para el control de malezas en las UPB es un factor asociado a la presencia de HE en los suelos y las probabilidades de aislarlos aumentan. De los pocos estudios al respecto, Poprawski y Majchrowicz (1995), mencionan que los agroquímicos tienen efectos fungicidas y fungistáticos sobre HE como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces farinosus* y *Verticillium lecani* y que el crecimiento radial y la germinación de esporas también son factores afectados por los estos. Casely *et al.* (1991) demostraron que los herbicidas inhiben el desarrollo de varios hongos fitopatógenos; mientras que Harrison y Gardner (1992) señalaron un efecto fungistático sobre *Beauveria bassiana*.

Recientemente Clifton *et al.* (2015) mencionaron que no encontraron algún efecto de toxicidad de los herbicidas sobre los HE, pero si reportaron ambientes más favorables y mejores para el desarrollo de los hongos en zonas donde no se usan agroquímicos. Estos estudios previamente reportados, concuerdan con lo hallado en este estudio y, aunque los herbicidas juegan un papel fundamental en el control de malezas dañinas para los pastizales, es importante conocer a

nivel de campo los efectos secundarios sobre la biodiversidad, sobre todo en insectos benéficos y enemigos naturales de plagas. Estudios de aplicaciones programadas, microorganismos tolerantes o compatibles y herbicidas menos nocivos para estos, serían necesarios para mantener o mejorar el sinergismo entre ambos componentes de control (Poprawski y Majchrowicz, 1995).

Tabla 4. Análisis de regresión logística para identificar factores asociados a la presencia de hongos entomopatógenos en unidades de producción bovina de Veracruz, México.

Variables	OR	IC (95%)	Chi ²	Valor P
Región				
Costera	1			
Planicie	1.73	0.77-3.86	1.84	0.17
Montañosa	2.25	1.02-4.92	4.18	0.04
Altitud				
0-200	1			
201-400	1.21	0.47-3.10	0.16	0.68
401-600	3.81	1.35-10.67	7.08	0.007
>601	2.05	0.83-5.04	2.51	0.11
Uso de herbicidas				
SI	1			
NO	3.66	1.79-7.54	14.15	0.0001
Tiempo de pastoreo				
10-20	1			
21-30	2.67	0.98-8.05	3.55	0.059
>31	2.00	0.74-5.37	1.92	0.165
Cobertura vegetal				
Baja	1			
Media	0.51	0.24-1.09	3.02	0.08
Alta	1.66	0.68-4.07	1.27	0.26
Uso de fertilizantes				
SI	1			
NO	0.77	0.21-1.49	0.19	0.66
Zona de muestreo				
Alta	1			
Baja	0.57	0.29-1.12	2.52	0.11
Superficie				
Inclinada	1			
Plana	1.34	0.60-2.98	0.33	0.56
Agua en Zona				
Inundable	1			
No inundable	1.77	0.66-4.92	1.03	0.31
Consistencia suelo				
Arenoso	1			
Pesado	0.58	0.25-1.33	1.47	0.22
Tipo de vegetación				
Nada	1			
Maleza	0.72	0.25-2.08	0.35	0.55
Pasto	0.78	0.31-1.95	0.27	0.60
Árboles	0.54	0.16-1.79	1.00	0.31

OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza.

CONCLUSIONES

Se reporta por primera vez en México el aislamiento y presencia de hongos entomopatógenos en suelos destinados a la alimentación de bovinos en pastoreo. El hongo *M. anisopliae* fue el más aislado, principalmente de los corrales donde se manejan los animales. Los suelos de los cercos vivos presentaron la mayor riqueza de HE, aislándose los cuatro géneros reportados. Se reporta que la región montañosa, la altitud de la UPB (401-600 msnm) y no usar herbicidas son factores asociados a la presencia y aislamiento de HE en los suelos de las UPB.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de los estudios de doctorado del primer autor.

Financiamiento. El presente estudio fue sustentado financieramente mediante el proyecto “Aislamiento, identificación y efecto acaricida de hongos entomopatógenos nativos de suelos ganaderos en el trópico de México” de Fundación Produce Veracruz.

Conflicto de interés. Los autores declaran que no existe conflicto de intereses relacionados con esta publicación.

Cumplimiento de estándares de ética. Los autores declaran haber cumplido con las normas nacionales para el manejo de hongos y el consentimiento de los productores para la aplicación de entrevistas y el manejo confidencial de la información obtenida.

Disponibilidad de datos. Los datos están disponibles mediante el autor de correspondencia con previa solicitud.

REFERENCIAS

- Alonso-Díaz, M.A., Fernández-Salas, A., Martínez-Ibáñez, F., Osorio-Miranda, J. 2013a. *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) tick populations susceptible or resistant to acaricides in the Mexican Tropics. *Veterinary Parasitology*, 197, 326-331. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.06.004>
- Alonso-Díaz, M.A., Fernández-Salas, A. y Basurto, C.H. 2013b. *Manual Técnico: La Garrapata Rhipicephalus (Boophilus) microplus: su comportamiento, control y resistencia a los acaricidas en el Trópico Mexicano: 21º día del ganadero* (ed. by B. Valles & H. Basurto), pp. 19–30. COFUPRO - FUNPROVER - UNAM., Martínez de la Torre, Veracruz, México.
- Arenz, B.E. y Blanchette, R.A. 2011. Distribution and abundance of soil fungi in Antarctica at sites on the Peninsula, Ross Sea Region and McMurdo Dry Valleys. *Soil Biology and Biochemistry*, 43, 308-315. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.10.016>
- Asencio, L., Carbonell, T., López-Jiménez, J.A., Lopez-Llorca, L.V. 2003. Entomopathogenic fungi in soils from Alicante province. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1, 37-45. 10.5424/sjar/2003013-33
- Augustyniuk-Kram, A. y Kram, K.J. 2012. Entomopathogenic fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forest (Review). In Juan A. Blanco (Ed). *Forest Ecosystems – More Than Just Trees*. In Tech Rijeka. 265-294.
- Azevedo, J.L. y Melo, I.S. 1998. Controle microbiano de insectos - pragas e seu melhoramento genético. *Controle Biológico*, 1, 69-93.
- Bruck, D.J. 2004. Natural occurrence of entomopathogens in Pacific Northwest nursery soils and their virulence to the black vine weevil, *Otiorynchus sulcatus* (F.) (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*, 33, 1335-1343. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-33.5.1335>
- Buduba, C. 2004. Muestreo de suelos. Criterios básicos. *Patagonia Forestal*, 1, 9-12.
- Cámara, R.C. y Díaz, O.F. 2013. Transect sampling of vegetation formations of phanerophytes and chamaephytes (I): methodological fundamentals. *Estudios Geográficos*, 274, 67-88. 10.3989/estgeogr.201303
- Casely, J.C., Atkin, R.K., Cussans, C.W. 1991. *Herbicide Resistance in Weeds and Crops*. Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford. Reed International Books.
- Castillo-Gallegos, E., de la Mora, B.V., Mannetje, L.T., Schunemann, A.A. 2005. Efecto de introducir *Arachis pintoi* sobre variables del suelo de pasturas de grama nativa del trópico húmedo mexicano. *Técnica Pecuaria en México*, 43, 287-295. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61343214>
- Clifton, E.H., Jaronski, S.T., Hodgson, E.W., Gassmann, A.J. 2015. Abundance of soil-borne entomopathogenic fungi in organic and conventional fields in the midwestern USA with an emphasis on the effect of herbicides and fungicides on fungal persistence. *PLoS ONE*, 10, 17 pp. 10.1371/journal.pone.0133613
- D'Alessandro, W.B., Humber, R.A., Luza, C. 2012. Occurrence of pathogenic fungi to *Amblyomma cajennense* in a rural area of Central Brazil and their activities against vectors of Rocky Mountain spotted fever.

- Veterinary Parasitology*, 188, 156–159. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.02.016>
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H. 1980. *Compendium of Soil Fungi*. London, Great Britain. Academic Press.
- Fernandes, E.K.K., Rangel, D.E.N., Moraes, A.M.L., Bittencourt, V.R.E.P., Roberts, D.W. 2008. Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.10.011>
- Fernandes, E.K.K., Bittencourt, V.R.E.P. 2008. Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Experimental Applied Acarology*, 46, 71-93. 10.1007/s10493-008-9161-y
- Fernández-Salas, A., Rodríguez-Vivas, R.I., Alonso-Díaz, M.A. 2012a. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 183, 338-342. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.028>
- Fernández-Salas, A., Rodríguez-Vivas, R.I., Alonso-Díaz, M.A. 2012b. Resistance of *Rhipicephalus microplus* to amitraz and cypermethrin in tropical cattle farms in Veracruz, Mexico. *Journal of Parasitology*, 98, 1010-1015. <https://doi.org/10.1645/GE-3074.1>
- Fernández-Salas, A. 2017. Aislamiento de suelos, identificación molecular y efecto acaricida in vitro de hongos entomopatógenos nativos del trópico mexicano contra la garrapata *Rhipicephalus microplus*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. CDMX, México. 178 páginas.
- Galán-Franco, L.A., Morales-Loredo, A., Álvarez-Ojeda, G., López-Arroyo, J.I., Arévalo-Niño, K., Sandoval-Coronado, C., Quintero-Zapata, I. 2011. Isolation and characterization of entomopathogenic fungi obtained from citrus-growing areas of Mexico. *Southwestern Entomologist*, 36, 443-450. <https://doi.org/10.3958/059.036.0406>
- García-Gutierrez, J. 2004. Technological changes in animal health area on a technology transfer program in Veracruz State. M.S. Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 82 p.
- Garrido-Jurado, I., Torrent, J., Barrón, V., Corpas, A., Quesada-Moraga, E. 2011. Soil properties affect the availability, movement, and virulence of entomopathogenic fungi conidia against puparia of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Biological Control*, 58, 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.05.017>
- González-Padilla, E., Lassala, A., Pedernera, M., Gutierrez, C.G. 2019. Cow-calf management practices in Mexico: Farm organization and infrastructure. *Veterinaria México*, 6, 1-17. <http://dx.doi.org/10.22201/fmvz.24486760e.2019.3.677>
- Harris, K., Young, I.M., Gilligan, C.A., Otten, W., Ritz, K. 2003. Effect of bulk density on the spatial organization of the fungus *Rhizoctonia solani* in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 44, 45-56. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01089.x>
- Harrison, R.D., Gardner, W.A. 1992. Fungistasis of *Beauveria bassiana* by selected herbicides in soil. *Journal of Entomological Science*, 27, 233-238. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-27.3.233>
- Havron, A., Rosen, D., Riessler, Y. 1987. A test for pesticide tolerance in minute parasitic Hymenoptera. *Entomophaga*, 32, 83-95.
- Hernández-Velázquez, V.M., Cervantes-Espíndola, Z., Villalobos, F.J., García, L.L., Peña-Chora, G. 2011. Aislamiento de hongos entomopatógenos en suelo y sobre gallinas ciegas (coleóptera: melolonthidae) en agroecosistemas de maíz. *Acta Zoológica Mexicana*, 27, 591-599. <https://www.researchgate.net/publication/262653334>
- Hoffman, C.S., Winston, F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57, 267–272. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90131-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90131-4)
- Humber, R.A. 2012. Preservation of entomopathogenic fungal cultures. En: Lacey L.A. (Ed.). *Manual of techniques in insect pathology*. Yakim, Washington, USA. Academic Press. Pp. 317-328.
- INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias). 2012. Muestreo de suelos y preparación de muestras. Folleto Técnico 23. <http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/935.pdf>. (Consultado el 29 de marzo de 2020).
- INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). 2000. Técnicas de toma y remisión de muestras de suelos. https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmptnicas_de_toma_y_remisin_de_muestras_de_suelos.pdf. (Consultado el 29 de marzo de 2020).
- Jackson, T.A., Alves, S.B., Pereira, R.M. 2000. Success in biological control of soil-dwelling insects by pathogens and nematodes. En: Gurr G, Wratten S (eds). *Biological control:*

- measures of success. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic, 271–296.
- Keller, S. y Zimmerman, G. 1989. Mycopathogens of soil insects. En: Wilding, N., Collins, N.M., Hammond, P.M. and Webber, P. *Insect-Fungus Interactions*. London, Academic Press, 240–320.
- Magurran, A.E. 2004. *Measuring Biological Diversity*. Oxford, U.K. Blackwell Publishing.
- Mendoza-Cantú, A., Ize-Lezama, I.A.R. 2017. Las sustancias químicas en México; perspectivas para un manejo adecuado. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33, 719-745. <http://dx.doi.org/10.20937/rica.2017.33.04.15>
- Meyling, N.V. 2007. Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment. <http://www.orgprints.org/11200>, 1-18. (Consultado el 29 de marzo de 2020).
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A, Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium Species: an Illustrated Manual for Identification*. University Park and London. Pennsylvania State University Press.
- Poprawski, T., Majchrowicz, I. 1995. Effects of herbicides on in vitro vegetative growth and sporulation of entomopathogenic fungi. *Crop Protection*, 14, X1-87.
- Quesada-Moraga, E., Navas-Cortés, J.A., Maranhao, E.A.A., Ortiz-Urquiza, A., Santiago-Álvarez, C. 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological Research*, 111, 947–966. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.06.006>
- Rendón, S.G. 1994. Muestreo. Aplicación en la estimación simultánea de varios parámetros. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. 246 p.
- Ritz, K., Young, I.M. 2004. Interactions between soil structure and fungi. *Mycologist*, 18, 52-59. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0269915X04002010>
- SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural). 2018. Feria Mexico-Alimentaria Food Show. SADER Chiapas Blog. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/agricultura%7Cchiapas/articulos/expo-ganadera-pecuaria-se-consolida-como-la-mejor-en-su-tipo-en-america-latina-171744>. (Consultado el 29 de marzo de 2020).
- Samish, M., Rehacek, J. 1999. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annual Review of Entomology*, 44, 159-182. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.159>
- Samson, R.A., Evans, H.C., Latge, J.P. 2013. *An atlas of entomopathogenic fungi*. Berlin, Germany. Springer.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2012. *Manual técnico para muestreo de productos agrícolas*. www.senasica.gob.mx. (Consultado el 29 de marzo de 2020).
- Storey, G.K., Gardner, W.A. 1987. Vertical movement of commercially formulated *Beauveria bassiana* conidia through 4 Georgia soil types. *Environmental Entomology*, 16, 178–181. <https://doi.org/10.1093/ee/16.1.178>
- Sun, B.D., Liu, X.Z. 2008. Occurrence and diversity of insect-associated fungi in natural soils in China. *Applied Soil Ecology*, 39, 100-108. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.12.001>
- Sun, B.D., Yu, H.Y., Chen, A.J., Liu, X.Z. 2008. Insect-associated fungi in soils of field crops and orchards. *Crop Protection*, 27, 1421–1426. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.07.010>
- Vannien, I. 1996. Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: Effect of geographical location, habitat type and soil type. *Mycological Research*, 100, 93-101. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80106-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80106-7)
- Wakil, W., Ghazanfar, M.U., Riasat, T., Kwon, Y.J., Qayyum, M.A., Yasin, M. 2013. Occurrence and diversity of entomopathogenic fungi in cultivated and uncultivated soils in Pakistan. *Entomology Research*, 43, 70-78. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12003>
- White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (eds.) *PCR protocols: A guide to methods and applications*. New York, New York, Academic Press, p. 315–322.
- Wollum, A.G., Cassel, D.K. 1978. Transport of microorganisms in sand columns. *Soil Science Society of America Journal*, 42, 72–76. <https://doi.org/10.2136/sssaj1978.03615995004200010016x>
- Zimmermann, G. 1986. The ‘Galleria bait method’ for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of applied Entomology*, 102, 213-215. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1986.tb00912.x>