



El Colegio de la Frontera Sur

Métodos de inoculación y patogenicidad de *Beauveria bassiana*
(Balsamo) Vuillemin sobre *Pachycoris torridus* (Hemiptera:
Scutelleridae).

TESIS

presentada como requisito parcial para optar al grado de
Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural

por

Brenda Yaneth Chávez Guzmán

2015

A Dios por fortalecerme y por llevar a buen fin este proyecto.

A mis padres y hermanas por todo lo recibido, porque no sabría que hacer sin sus consejos, enseñanzas y apoyo. Gracias por estar siempre conmigo en los momentos buenos y difíciles de la vida. Gracias por haber recorrido conmigo esta experiencia.

A mi Tatito por tus risas que han llenado de alegría mi vida.

Los amo sin fronteras.

AGRADECIMIENTOS

A EL Colegio de la Frontera Sur Unidad Tapachula, por la oportunidad para realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de maestría otorgada.

Al Dr. Jaime Gómez Ruiz, por su amistad, por sus enseñanzas, por su paciencia y apoyo brindado durante la realización de esta investigación.

Al Dr. Julio Cesar Rojas y al Dr. Juan F. Barrera por sus comentarios y sugerencias tanto en el trabajo de laboratorio y en el escrito durante las evaluaciones.

Al M. en C. Francisco Javier Valle Mora por su asesoría y apoyo en la parte estadística.

Al Dr. José Pablo Liedo, M.C. Juan Cisneros y al Dr. Alfredo Castillo por sus comentarios y sugerencias para la mejora del trabajo.

A mis compañeros de generación por los momentos que compartimos en nuestro primer año de maestría.

A Leysver de la Rosa por su apoyo en la colecta de las chinches.

INDICE

Página

Introducción.....1

Manuscrito sometido a publicación.....3

Conclusiones.....28

Literatura citada.....29

Introducción

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae) es un arbusto perenne originario del Sur de México y Centroamérica, que actualmente se cultiva en América Latina, Asia y África (Brittaine y Litaladio, 2010; Heller, 1996), para extraer de sus semillas aceite empleado en la producción de biodiesel.

Entre las plagas del cultivo de *J. curcas* destacan las chinches del género *Pachycoris* (Hemiptera: Scutelleridae). Existen dos especies que se alimentan de los frutos y semillas de *J. curcas*: *P. torridus* (Scopoli) y *P. klugii* Burmeister (Borges et al. 2013; Tepole-García et al. 2012). En Brazil, México, Nicaragua y Perú, *P. torridus* es considerada una plaga potencial de esta planta, ya que provoca el amarillamiento prematuro, necrosamiento, caída, reducción de tamaño y peso de los frutos (Borges et al. 2013; Broglio-Micheletti et al. 2010; Gallo et al. 2002; Grimm y Führer, 1998; Grimm y Maes, 1997; INIA, 2009; López-Guillén et al. 2013; Rodrigues et al. 2011; Soto y Nakano, 2002; Saturnino et al. 2005; Tominaga et al. 2007). Otros daños ocasionados por este insecto son la malformación de las semillas y disminución de hasta el 99% de contenido de aceite (Alonso y Lezcano, 2014).

El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* Balsamo Vuillemin se vislumbra como un agente potencial para regular las poblaciones de muchos insectos plaga bajo un sistema de manejo integrado (Ali et al. 2012; Inglis et al. 2001; Vega et al. 2012). Uno de los pocos estudios disponibles del efecto de este entomopatógeno sobre *P. klugii* reportó que la aplicación de *B. bassiana* en condiciones de laboratorio (24 ± 1 °C y 73% H. R.) causó una mortalidad hasta del 36% sobre adultos de esta chinche cuando fueron sumergidos durante 3 s en una solución del hongo a una concentración de 1×10^7 conidias/ml (Grimm y Guharay, 1998).

Existen algunos factores que influyen en la efectividad de los hongos entomopatógenos, entre ellos podemos citar el modo de aplicación de las conidias, ya que éste puede afectar el porcentaje de mortalidad del insecto (Alatorre-Rosas, 2007; Cañedo y Ames, 2004; Fargues et al. 1997). Al respecto, Liu et al. (2002) ensayaron cinco métodos de inoculación para evaluar la patogenicidad de *B. bassiana* sobre ninfas de segundo estadio de *Lygus lineolaris* (Palisot de Beavouis) (Hemiptera: Miridae), y determinaron que la inmersión directa de los insectos en una suspensión de hongo fue el método de inoculación más efectivo. Por el contrario, Fernández et al. (2001) encontraron un mayor porcentaje de mortalidad cuando larvas de segundo estadio de *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) fueron directamente asperjadas con *B. bassiana* comparado con otros dos métodos de inoculación.

Dada esta diferencia de resultados, se planteó el siguiente estudio con el objetivo de evaluar la patogenicidad y el Tiempo Letal Medio (TL₅₀) de *B. bassiana* sobre adultos de *P. torridus* mediante los métodos de inoculación de inmersión y aspersion en condiciones de laboratorio.

Evaluación de la patogenicidad y Tiempo Letal Medio (TL₅₀) de *Beauveria bassiana* sobre *Pachycoris torridus*¹ mediante dos métodos de inoculación en laboratorio

Brenda Y. Chávez, Julio C. Rojas, Juan F. Barrera y Jaime Gómez²

El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Grupo de Ecología de Artrópodos y Manejo de Plagas, Carretera Antiguo Aeropuerto km 2.5, Tapachula, 30700 Chiapas, México

Resumen. *Pachycoris torridus* (Scopoli) (Hemiptera: Scutelleridae) es considerado un insecto plaga de los frutos de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). El uso de hongos entomopatógenos para el control de esta chinche puede ser una alternativa de control más amigable con el medio ambiente comparado con los insecticidas, por lo cual se planteó el presente estudio con el objetivo de evaluar la patogenicidad de varios aislados de *B. bassiana* sobre adultos de *P. torridus* mediante dos métodos de inoculación en condiciones de laboratorio. Los resultados mostraron que el método de inoculación por aspersion de conidias sobre adultos fue mejor que la técnica por inmersión. Con el método de aspersion, se encontró que tres aislados de *B. bassiana* (Bb19, Bb15 y Bbrhy) y un producto comercial (GHA BotaniGard® 22 WP) a la concentración 1×10^8 conidias/ml fueron igualmente patogénicos contra adultos de *P. torridus*, con mortalidades observadas de 52.94% a 70.58% y TL₅₀ de 7 a 13 días. Se considera que el aislado Bbrhy fue el más virulento porque tuvo el menor TL₅₀. Este estudio es el primer reporte de patogenicidad de *B. bassiana* sobre *P. torridus*.

¹ (Hemiptera: Scutelleridae)

² Autor para correspondencia

Abstract. *Pachycoris torridus* (Scopoli) (Hemiptera: Scutelleridae) is considered a potential insect pest of the fruits of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). The entomopathogenic fungi used is considered an alternative of insect control more environmental friendly than chemical use. In the present study, we investigated the pathogenicity of several isolates of *B. bassiana* on *P. torridus* adults in the laboratory using two inoculation methods. The results showed that the spray inoculation method was better than the immersion method. With the spray method, it was found that three isolates of *B. bassiana* (Bb19, Bb15 and Bbrhy) and a commercial product (GHA BotaniGard® 22 WP) at concentration 1×10^8 conidias/ml were equally pathogenic against *P. torridus*, with mortalities observed from 52.94 to 70.58%, and LT50 for 7-13 days. Our results showed that Bbrhy was the most virulent isolate. This study is the first to report the pathogenicity of *B. bassiana* on *P. torridus*.

Introducción

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae) es un arbusto perenne originario del Sur de México y Centroamérica (Brittaine y Litaladio 2010) cuyo cultivo se está impulsando con la finalidad de aprovechar el aceite de sus semillas para la producción de biodiesel.

Entre los problemas que pueden limitar la producción de semillas de *J. curcas* destacan las plagas y enfermedades. Los insectos que atacan los frutos son de particular importancia, ya que sus daños disminuyen el rendimiento de la cosecha de semillas y por ende, afectan la producción de aceite para producir biodiesel. Existen dos especies de chinches del género *Pachycoris* (Hemiptera: Scutelleridae) que se alimentan de los frutos y semillas de *J. curcas*: *P. torridus* (Scopoli) y *P. klugii* Burmeister (Borges et al. 2013; Tepole-García et al. 2012). Ambas especies están presentes en México, pero *P. torridus* predomina en el Soconusco, Chiapas (López-Guillén et al. 2013).

En general, el control de insectos que atacan el fruto de *J. curcas* se realiza mediante aplicaciones de insecticidas (Alfonso 2008; González et al. 2011). Dado que la aplicación excesiva de plaguicidas tiene un efecto negativo en la salud humana, en insectos no blancos, como enemigos naturales y polinizadores, y contribuye a la emisión y acumulación de gases de efecto invernadero (Ali et al. 2012; Inglis et al. 2001; Vega et al. 2012), el uso de entomopatógenos para el control biológico de plagas se vislumbra como una opción ambientalmente amigable dentro de un sistema de manejo integrado de plagas.

Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin es un entomopatógeno que afecta una gran variedad de insectos, principalmente de los órdenes Coleoptera, Lepidoptera, Diptera y

Hemiptera (Storey y Gardner 1986). Sin embargo, la información disponible con respecto a su patogenicidad sobre las chinches del género *Pachycoris* es muy escasa.

Cabe señalar que existen algunos factores que afectan la patogenicidad de los entomopatógenos. Al respecto, la literatura menciona que el modo de aplicación de las conidias de los hongos entomopatógenos puede afectar el porcentaje de mortalidad del insecto blanco (Alatorre-Rosas 2007; Cañedo y Ames 2004; Fargues et al. 1997).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la patogenicidad y el Tiempo Letal Medio (TL₅₀) de varios aislados de *B. bassiana* sobre adultos de *P. torridus* mediante los métodos de inoculación por inmersión y aspersión en condiciones de laboratorio.

Materiales y Métodos

Los bioensayos se realizaron en los laboratorios de Control Biológico de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), ubicado en la Ciudad de Tapachula, Chiapas, México. Las condiciones ambientales del laboratorio fueron 27 ± 2 °C de temperatura, $80 \pm 5\%$ de humedad relativa (HR) y 12:12 h Luz: Oscuridad (L: O).

Procedencia de *P. torridus*. Huevos, ninfas y adultos de *P. torridus* se colectaron en plantas de *J. curcas* usadas como cercas vivas en potreros localizados en los municipios de Huehuetán y Tapachula, Chiapas, durante los meses de mayo a octubre 2014. Las chinches se mantuvieron en jaulas (44 cm de largo x 44 cm de ancho x 89 cm de altura), y se alimentaron con hojas y frutos de *J. curcas* cada cinco días. Solamente adultos fueron utilizados en los bioensayos.

Procedencia de *B. bassiana*. Para evaluar la patogenicidad de *B. bassiana* sobre adultos *P. torridus* bajo los métodos de inoculación se usaron nueve aislados de *B. bassiana* que forman parte de la Colección de Hongos Entomopatógenos del Laboratorio de Control Biológico de ECOSUR (Cuadro 1), mientras que en la determinación del Tiempo Letal Medio (TL₅₀) de *B. bassiana* sobre adultos de *P. torridus* se seleccionaron tres de los aislados utilizados en la prueba anterior, y se incluyó el producto GHA BotaniGard® 22WP (Agropecuaria El Éxito, Guatemala, Guatemala, C.A.) con la finalidad de comparar la agresividad de los aislados con una cepa comercial, un producto que está al alcance del productor para controlar *P. torridus* si resulta más agresivo que los aislados. Cabe indicar, que la cepa comercial no se incluyó en el primer experimento porque no se contaba con el producto.

Producción, viabilidad y concentración de los aislados. En la reactivación de los aislados de *B. bassiana* se utilizaron adultos de *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae) por dos razones, la primera porque no existía evidencia que *B. bassiana* fuera patogénica para *P. torridus* para reactivarla sobre este insecto y así conservar sus propiedades patogénicas y su virulencia, la segunda razón, hay reportes de que *B. bassiana* es patogénica para *A. obliqua* con una TL₅₀ de 5.3 días a 6.4 días (Díaz-Ordaz et al. 2010), además de la susceptibilidad de la mosca a los hongos, es un insecto grande de donde se puede obtener bastante micelio, esta información nos permitió utilizar esta especie de mosca de la fruta para obtener en menor tiempo los conidios para los experimentos.

Posteriormente los aislados reactivados se reprodujeron en medio sólido de agar dextrosa sabouraud (ADS) y se incubaron por 25 días en laboratorio. Un día antes de

realizar cada prueba, los conidios se cosecharon y se colocaron en un frasco de vidrio que contenía 10 ml de agua destilada estéril más tween 80 (Sigma Chemical CO. San Louis Missouri, EUA) al 0.01%. Esta mezcla se agitó en un vortex por 5 min para determinar la viabilidad de las conidias de cada uno de los aislados por medio del método de microcultivos hechos con ADS (Jiménez 1992), y la concentración de conidias utilizando una cámara de Neubauer. Se consideró como aislado viable para los bioensayos aquel donde se observó más del 90% de conidios germinados (Muñoz et al. 2009). Este procedimiento se realizó para cada uno de los aislados en las pruebas de patogenicidad de *B. bassiana* sobre *P. torridus* bajo las dos técnicas de inoculación y en la determinación del Tiempo Letal Medio (TL₅₀).

Cuadro 1. Aislados de *B. bassiana* evaluados contra adultos de *P. torridus* a 27 ± 2 °C; $80 \pm 5\%$ de H. R. y 12:12 h L: O.

Table 1. Isolates of *B. bassiana* evaluated against adults of *P. torridus* at 27 ± 2 °C; $80 \pm 5\%$ R.H. and 12:12 h L: D.

Clave del aislado	Hospedero de origen		País de colecta	Concentración (conidias/ml)
	Especie	Orden		
Bb15	<i>Chalcodermus aeneus</i>	Coleoptera	Brasil	2.65×10^8
Bb18	desconocida	Lepidoptera	México	2.31×10^8
Bb19	desconocida	Lepidoptera	México	1.55×10^8
Bb2	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera	México	3.04×10^8
Bb4	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera	Ecuador	8.24×10^8
BbDc	<i>Diaphorina citri</i>	Hemiptera	México	1.66×10^8
Bbhy	<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera	México	2.24×10^8
Bbrhy	<i>Rhyssomatus nigerrimus</i>	Coleoptera	México	2.19×10^8
Bb13	desconocida	desconocido	Rusia	2.85×10^8

Determinación de la patogenicidad de *B. bassiana* sobre *P. torridus* bajo dos técnicas de inoculación. Los aislados usados en este bioensayo se evaluaron a concentraciones de 1.55×10^8 a 8.24×10^8 conidias/ml bajo las técnicas de inoculación de aspersión e inmersión (Tabla 1). En las dos técnicas se utilizaron grupos de 10 chinches por cada aislado de *B. bassiana*. En la técnica de inmersión, las chinches se sumergieron en 10 ml de las soluciones preparadas de *B. bassiana* durante 6 s, mientras que en la técnica de aspersión se colocaron los adultos de *P. torridus* en el interior de pequeñas jaulas cubiertas con malla, a través de las cuales se aplicó con un atomizador 10 ml de la solución de *B. bassiana* sobre los insectos. El testigo en ambas técnicas de inoculación consistió en agua destilada estéril + tween 80 al 0.01%.

Después de la inoculación de *B. bassiana* sobre los adultos de *P. torridus*, estos se colocaron durante dos horas en una caja Petri que contenía papel filtro estéril, para evitar que las chinches permanecieran con el exceso de la solución aplicada. Los adultos inoculados se introdujeron en frascos de plástico de un litro de capacidad (15.6 cm de largo x 9.5 cm de ancho) dentro de los cuales se colocaron previamente tres frutos y una hoja de *J. curcas* como alimento. Los frascos se cubrieron con tela organza para permitir la aireación y evitar que las chinches escaparan. Después de la aplicación del hongo sobre *P. torridus* la mortalidad se registró por 22 días. Las chinches muertas se colocaron en cámaras húmedas (caja Petri + portaobjeto + algodón húmedo) para promover el crecimiento del micelio y con ello confirmar que la muerte del insecto ocurrió por efecto del hongo.

Tiempo Letal Medio (TL₅₀) de *B. bassiana* sobre adultos de *P. torridus*. Para este bioensayo se utilizaron tres aislados de *B. bassiana* del experimento anterior y el producto comercial GHA BotaniGard® 22WP. Los aislados se seleccionaron bajo los siguientes criterios tomando como referencia la mediana de las funciones de sobrevivencia de cada tratamiento: El aislado Bb15, donde se estimó una mediana de 0.4 en las pruebas de inmersión pero una mediana de 0.6 en las pruebas de aspersión; el aislado Bb19 donde se estimó una mediana de 0.9 en las pruebas de inmersión y una mediana de 0.2 en las pruebas de aspersión; y el aislado Bbrhy que registró una mediana entre 0.5 a 0.6 en las dos pruebas de inoculación.

Se prepararon soluciones de los hongos a una concentración de 1×10^8 conidias/ml. Previamente se determinó la viabilidad de los conidios de cada aislado y del producto comercial siguiendo la metodología de microcultivos hechos con ADS (Jiménez 1992).

Las chinches liberan un líquido a través de sus glándulas metatóricas cuando son perturbadas (Cervantes, 2002) y puede ser tóxico para otras chinches de la misma especie, factor que puede influir en el bioensayo (Comunicación personal), por ello veinticuatro horas antes de aplicar los tratamientos se colocaron grupos de ocho chinches por cada aislado de *B. bassiana* más otro grupo para el testigo en jaulas (22 cm de largo x 27 cm de ancho x 23.5 cm de altura). Transcurrido ese tiempo se aplicaron a cada grupo de chinches 10 ml de la solución de *B. bassiana* con un atomizador. El testigo consistió en la aplicación de agua destilada estéril + tween 80 al 0.01%. En cada tratamiento (o aislado) se utilizaron un total de 40 chinches. Los adultos de *P. torridus* se mantuvieron en las jaulas con frutos y hojas de *J. curcas* que se cambiaron cada cinco días. Después de la aplicación del hongo sobre *P. torridus* la mortalidad se registró por 16 días. Las chinches muertas se colocaron en cámara

húmeda (caja Petri + portaobjeto + algodón húmedo) para promover el crecimiento del micelio y con ello confirmar que la muerte fue causada por el hongo.

Análisis estadístico. Para determinar la patogenicidad de los aislados de *B. bassiana* sobre *P. torridus* a través de la técnica de inoculación, se aplicó el Modelo de Riesgos Proporcionales de Cox a los datos de supervivencia de los adultos de *P. torridus* en cada aislado. Se verificó la significancia del modelo de Cox a través del método razón de verosimilitud ($P < 0.05$). Se realizaron comparaciones múltiples de las medias utilizando contrastes ortogonales para conocer las diferencias estadísticas entre las funciones de supervivencia de *P. torridus* cuando fueron inoculados con los aislados de *B. bassiana*.

Para estimar las curvas o funciones de supervivencia y el Tiempo Letal Medio (TL₅₀) de las chinches en los diferentes tratamientos se usó el método de Kaplan-Meier y el percentil 0.5 respectivamente. Asimismo, se utilizó la fórmula de Abbot (1925) para estimar la mortalidad corregida. Los datos se analizaron con el programa de cómputo estadístico R (R Core Team 2015).

Resultados y Discusión

Determinación de la patogenicidad de *B. bassiana* sobre *P. torridus* bajo dos técnicas de inoculación. Los resultados obtenidos en cada técnica de inoculación mostraron la patogenicidad de los aislados de *B. bassiana* sobre *P. torridus*, y su efecto sobre el tratamiento testigo.

En la técnica de inmersión los aislados utilizados difirieron en su patogenicidad sobre esta especie de chinche (Likelihood ratio test = 17.7; $gl = 9$; $P = 0.038$). Las diferencias en la sobrevivencia de *P. torridus* se presentó entre las cepas Bb15 y Bb19 ($P = 0.018$) y entre el testigo y Bb19 ($P = 0.015$). De acuerdo con lo anterior, las chinches tratadas con el aislado Bb15 registraron una sobrevivencia baja (la mediana fue de 0.4), mientras que en el caso de las chinches tratadas con Bb19 la sobrevivencia fue alta (la mediana fue de 0.9) (Fig. 1). Esto significa que el aislado Bb15 fue el más patogénico y el Bb19 el menos patogénico cuando las chinches se trataron con el hongo *B. bassiana* bajo la técnica de inmersión. Sin embargo, como la mortalidad también fue mayor en el testigo (el 80%) no es posible asegurar que el hongo *B. bassiana* sea patogénico sobre *P. torridus* cuando las chinches son sumergidas en la solución, lo que indica que el método de inoculación por sí mismo afectó a los insectos experimentales. Este resultado coincide con lo expresado por otros autores quienes señalan que el modo de aplicación puede afectar la mortalidad del insecto tratado (Alatorre-Rosas 2007; Cañedo y Ames 2004; Fargues et al. 1997). Al estudiar el efecto del modo de exposición de *B. bassiana* sobre *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), Fernandes et al (1985) confirmaron que el método de inoculación de *B. bassiana* influye en los resultados obtenidos en los bioensayos, ya que reportaron 52% de mortalidad en adultos de *H.*

hampei cuando fueron inoculados por el método de inmersión y 66% de mortalidad en el testigo. Por lo tanto, la mortalidad en el testigo debe ser minimizada para asegurar que el deceso de los insectos experimentales sea realmente por efecto del entomopatógeno evaluado (Liu et al. 2003).

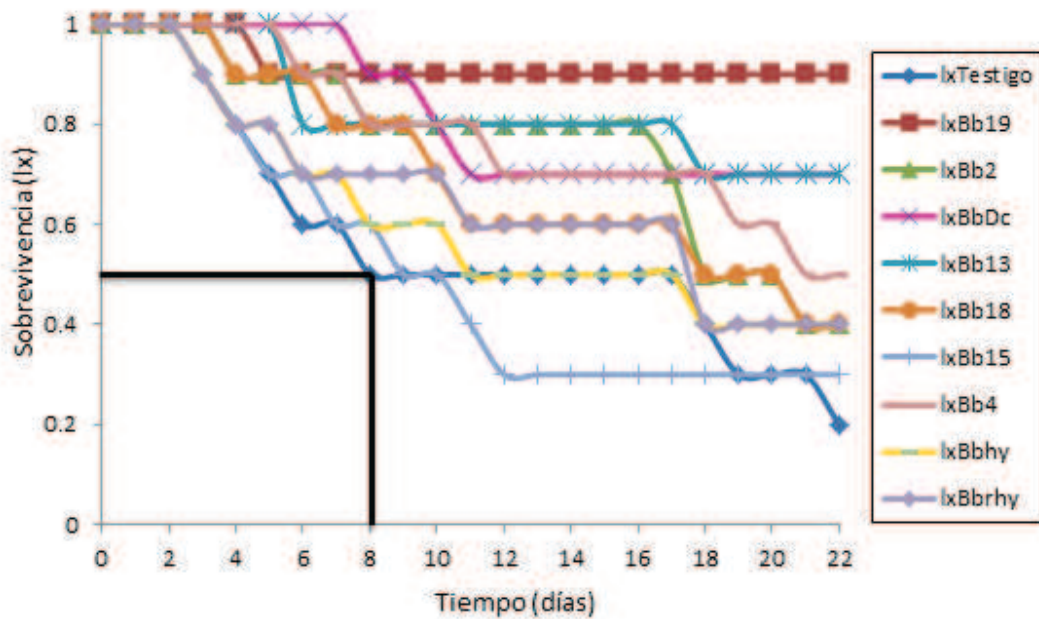


Fig. 1. Curvas de sobrevivencia (Kaplan-Meier) de adultos de *P. torridus* tratadas con *B. bassiana* en concentraciones de 1.55×10^8 a 8.24×10^8 conidias/ml por la técnica de inmersión y 22 días de observación bajo condiciones de laboratorio a 27 ± 2 °C; $80 \pm 5\%$ de H. R. y 12:12 h L: O

Fig. 1. Survival Curves (Kaplan-Meier) of *P. torridus* adults treated with *B. bassiana* at concentrations 1.55×10^8 a 8.24×10^8 conidias/ml by the immersion technique and 22 days of observation under laboratory conditions at 27 ± 2 °C; $80 \pm 5\%$ RH and 12:12 h L: D

En la técnica de aspersión los diferentes aislados evaluados de *B. bassiana* también variaron en su patogenicidad sobre *P. torridus* (Likelihood ratio test = 32.5; gl = 9; $P = 0.0001$). La diferencia se registró entre Bb19 con respecto a los aislados BbDc, Bbhy y el testigo ($P \leq 0.008$); Bb2 con respecto a BbDc, Bbhy y el testigo ($P \leq 0.004$); y entre el aislado Bb4 y el testigo ($P = 0.009$).

Por lo tanto, los aislados Bb2 y Bb19 fueron los más patogénicos por registrar funciones de sobrevivencia bajas (la mediana fue de 0.2 para ambos tratamientos), mientras que los aislados BbDc y Bbhy fueron los menos patogénicos porque se estimaron funciones de sobrevivencia altas (la mediana fue de 0.8 para los dos tratamientos) contra *P. torridus* cuando fueron tratados con el hongo *B. bassiana* por el método de aspersión (Fig. 2). Estos resultados indican que *P. torridus* fue más susceptible a enfermarse y morir cuando los insectos experimentales fueron infectados con los aislados Bb2 y Bb19, en comparación con los otros aislados bajo la técnica de aspersión. Además, con este método de inoculación las chinches del tratamiento testigo tuvieron un 10% de mortalidad, porcentaje bajo comparado con la mortalidad de las chinches tratadas con los aislados del hongo *B. bassiana*, y considerado adecuado para el tratamiento testigo cuando se trata de bioensayos en laboratorio (Cañedo y Ames 2004; Hernández et al. 2010).

En efecto el método de inoculación por aspersión minimizó cualquier impacto adverso sobre el insecto (Inglis et al. 2012) ya que con el método de inmersión la mortalidad fue igual para un insecto experimental no tratado (testigo) y tratado con *B. bassiana*.

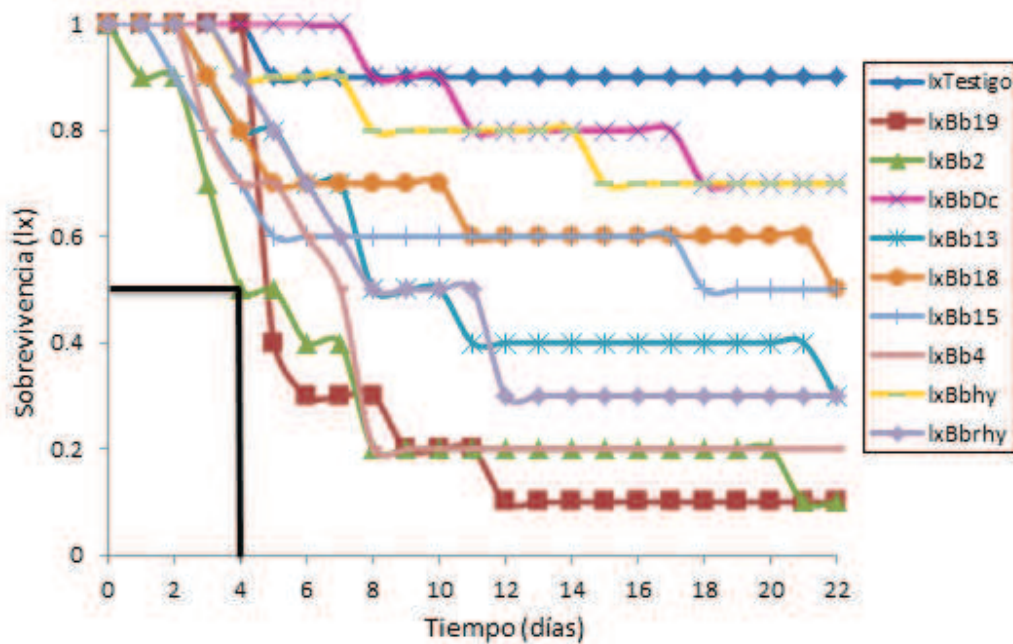


Fig. 2. Curvas de sobrevivencia (Kaplan-Meier) de adultos de *P. torridus* tratadas con *B. bassiana* en concentraciones de 1.55×10^8 a 8.24×10^8 conidias/ml por la técnica de aspersión y 22 días de observación bajo condiciones de laboratorio a 27 ± 2 °C; $80 \pm 5\%$ de H. R. y 12:12 h L: O

Fig. 2. Survival Curves (Kaplan-Meier) of *P. torridus* adults treated with *B. bassiana* at concentrations 1.55×10^8 a 8.24×10^8 conidias/ml by the spraying technique and 22 days of observation under laboratory conditions at 27 ± 2 °C; $80 \pm 5\%$ RH and 12:12 h L: D

Por otro parte, nuestros resultados también indican que el método de inoculación influyó significativamente en la respuesta del tipo de aislado. Por ejemplo, el aislado Bb19 fue menos patogénico cuando se inoculó bajo la técnica de inmersión, ya que se

registró 10% de mortalidad real en las chinches, pero resultó ser más patogénico, con el 90% de mortalidad real cuando se inoculó con la técnica de aspersión. Esta diferencia puede atribuirse a la velocidad de la germinación de las conidias de *B. bassiana* para provocar rápido o lento la muerte del insecto. Según, Fernández et al. (2001) señalan que la velocidad de germinación de las conidias de *B. bassiana* es mayor cuando los insectos son infectados por aspersión que por inmersión, porque las conidias logran introducirse en los pliegues o poros de la cutícula del insecto por la presión que ejerce el método de aspersión, hecho que facilita la germinación y penetración de *B. bassiana* en la cavidad hemocélica del insecto. No obstante, Santoro et al (2007) mencionan que en ambos métodos de inoculación, inmersión y aspersión una gran cantidad de conidios entran en contacto con el insecto con la posibilidad de germinar y penetrar en la hemocele.

En este estudio se ha demostrado que el porcentaje de infección o mortalidad resultante está ampliamente relacionado con el método de aplicación que va depender de la naturaleza del inóculo, del nicho del insecto plaga (Alatorre-Rosas, 2007; Santoro et al. 2007), del tamaño y tipo de hospedero y la cantidad de insectos a infectar con el hongo entomopatógeno (Inglis et al. 2012).

Tiempo Letal Medio (TL₅₀) de *B. bassiana* sobre adultos de *P. torridus*. En este bioensayo, las funciones de sobrevivencia de los aislados de *B. bassiana* sobre los adultos de *P. torridus* fue altamente significativo (Likelihood ratio test = 40.8; gl = 4; $P < 0.0001$) (Fig. 3).

El porcentaje de mortalidad corregida fueron las siguientes: testigo con 15%; aislados de *B. bassiana* Bb19 con 52.94%, Bb15 con 55.88% y Bbrhy con 70.58%; y el producto

comercial GHA BotaniGard® 22WP con 67.64% utilizando la técnica de aspersión. Cabe mencionar que al momento de la muerte las chinches tratadas no estaban micosadas pero al ponerlas en cámaras húmedas el hongo esporuló de los cadáveres, confirmado que éstas murieron por causa de la infección de *B. bassiana* (Cuadro 2). En los insectos experimentales muertos donde fue imposible observar el crecimiento del micelio del hongo, puede deberse a la presencia de los lípidos cuticulares y a las quinonas presentes en el cuerpo de las chinches (Borges et al. 1993; James et al. 2003; Marmaras et al. 1996) o bien a las bacterias saprofitas que compiten con *B. bassiana*, ya que al morir el insecto se marca el final de la fase parasitaria de *B. bassiana* para crecer saprofiticamente en los tejidos (Leucona et al. 1996).

El tiempo letal medio (TL₅₀) para los adultos de *P. torridus* infectados con *B. bassiana* fue de 7, 9, 10.1 y 12.2 días para los asilados Bbrhy, Bb15, producto comercial GHA BotaniGard® 22WP y Bb19, respectivamente. La diferencia en los TL₅₀ se puede deber a las características genéticas, biológicas y origen de los aislados (Augustyniuk-Kram y Kram 2012; Wang et al. 2005). En efecto, algunos estudios consideran que las diferencias en la TL₅₀ está dado por el hospedero de donde fue aislado el patógeno, de la edad y del sexo del hospedero en que se está evaluando (Hajek y Leger 1994; Maniania y Ondulaja 1998). No obstante, la patogenicidad de *B. bassiana* no siempre está relacionado con el hospedero o región geográfica de origen (Todorova et al. 2002), tal como se muestra en este estudio donde Bbrhy, Bb15 y Bb19 fueron aislados de hospederos del orden Coleoptera y Lepidoptera (Cuadro 1), y también fueron patogénicos contra *P. torridus*, insecto del orden Hemiptera.

Cuadro 2. Micosis de adultos de *P. torridus* infectadas previamente con el hongo *B. bassiana* usando el método de inoculación por aspersión. Se utilizaron 40 chinches por cada aislado (tratamiento).

Table 2. Mycosis of *P. torridus* adults previously infected with the fungus *B. bassiana* using spraying inoculation method. Used 40 bugs for each isolated (treatment).

Aislado	Número de chinches muertas.	Chinches micosadas (%)
Bb15	25	92
Bb19	24	79.16
Bbrhy	30	100
Cepa comercial	29	100
Testigo	6	-

Dado que los aislados más virulento son aquellos que matan a su hospedero en el menor TL_{50} (De la Rosa et al. 2002), de acuerdo con nuestros resultados, el aislado Bbrhy fue el más agresivo sobre *P. torridus* en condiciones de laboratorio.

Aunque la patogenicidad de *B. bassiana* se ha evaluado en otras especies de chinches que se alimentan de los frutos de *J. curcas* como *P. klugii* y *Leptoglossus zonatus* (Dallas) (Heteroptera: Coreidae), esta es la primera vez que se reporta la patogenicidad de este entomopatógeno sobre *P. torridus*. Grimm y Guharay (1998) aplicaron varios aislados de *B. bassiana* mediante la técnica de inmersión a una

concentración de 1×10^7 conidios/ml, y encontraron un TL_{50} para *P. klugii* de 22 a 23 días y para *L. zonatus* de 13 a 16 días, tiempos letales mayores que los obtenidos en el presente trabajo, aunque hay que mencionar que los aislados y concentraciones usados por estos autores fueron diferentes a los de nuestro estudio.

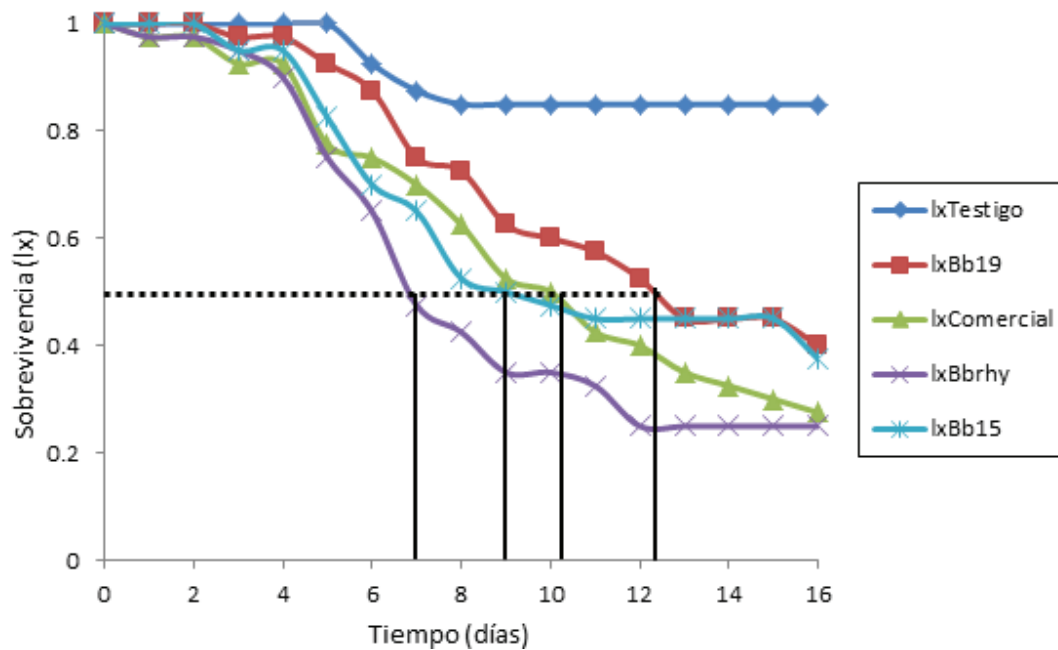


Fig. 3. Curvas de sobrevivencia (Kaplan-Meier) de adultos de *P. torridus* tratadas con *B. bassiana* a la concentración 1×10^8 conidios/ml por la técnica de aspersión, 24 h después de colocarlos en las jaulas y 16 días de observación bajo condiciones de laboratorio a 27 ± 2 °C; $80 \pm 5\%$ de H. R. y 12:12 h L: O

Fig. 3. Survival Curves (Kaplan-Meier) of *P. torridus* adults treated with *B. bassiana* at concentration 1×10^8 conidios/ml by the spraying technique, 24 h after placing in cages and 16 days of observation under laboratory conditions at 27 ± 2 °C; $80 \pm 5\%$ RH and 12:12 h L: D

En conclusión, la técnica de aspersión fue el mejor método de inoculación de adultos de *P. torridus* con el hongo entomopatógeno *B. bassiana*; dicha técnica tiene la ventaja de ser el medio más común de aplicar un plaguicida convencional en campo. Por otra parte, se concluye que el aislado Bbrhy tuvo el mayor potencial como agente de control biológico de adultos de *P. torridus* en condiciones de laboratorio, por lo que se propone realizar más estudios tanto de laboratorio como de campo para confirmar este resultado.

Agradecimientos

Se agradece a Javier F. Valle Mora por los análisis estadísticos realizados en este estudio y a Leysver de la Rosa por la colecta de las chinches en campo. B. Y. Chávez agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca 413957/288347 otorgada para realizar sus estudios de Maestría.

Referencias Citadas

- Abbot, W. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- Alatorre-Rosas, R. 2007. Hongos entomopatógenos, pp. 127-143. En: Rodríguez del Bosque, L. A. y H.C. Arredondo-Bernal (eds.). Teoría y aplicación del control biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México.
- Alfonso, J. A., 2008. Manual para el cultivo del piñón (*Jatropha curcas*) en Honduras. La Lima, Honduras: AGERATEC-DAJOLHA-STRO-IEEA-HIVOSFHIA-IIEP.
- Ali, S. A., A. R. Qayyum, A. Bakhsh, y T. Husnain. 2012. Entomopathogenic fungi as biological controllers new insights into their virulence and pathogenicity. Arch. Biol. Sci., Belgrade. 64: 21-42.
- Augustyniuk-Kram, A. y K. J. Kram. 2012. Entomopathogenic fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forests (Review). pp. 265-295. En: Blanco, J.A. (Ed.). Forest ecosystems more than just trees. INTECH Open Access Publisher. Rijeka, Croatia. ISBN: 978-953-51-0202-1
- Borges, M., S. C. M. Leal, M. S. Tigano-Milani, y M. C. C. Valadares. 1993. Efeito do feromônio de alarme do percevejo verde, *Nezara viridula* (L.) (Hem., Pentatomidae), sobre o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. An. Soc. Entomol. Brasil. 22: 505-511.

- Brittaine, R. y N. B. Lutaladio. 2010. *Jatropha*: A smallholder bioenergy crop. The potential for pro-poor development. *Integrated Crop Management*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 8: 1-96.
- Cañedo, V. y T. Ames. 2004. *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Lima, Perú. Centro Internacional de la Papa (CIP).
- Cervantes, P. L. 2002. Description, biology, and maternal care of *Pachycoris klugii* (Heteroptera: Scutelleridae). *Florida Entomol.* 85(3): 464-473.
- De la Rosa, W., F. L. López y P. Liedo. 2002. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican fruit fly (Dipt., Tephritidae) under laboratory conditions. *J. Econ. Entomol.* 95: 36-43.
- Díaz-Ordaz, H. N., N. Pérez y J. Toledo. 2010. Patogenicidad de tres cepas de hongos entomopatógenos a adultos de *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae) en condiciones de laboratorio. *Acta Zool. Mex.* 26(3): 481-494.
- Fargues, J., A. Ouedraogo, M. S. Goettel, y Ch. L. Lomer. 1997. Effects of temperature, humidity and inoculation method on susceptibility of *Schistocerca gregaria* to *Metarhizium flavoviride*. *Biocontrol Sci. Tech.* 7: 345-356.
- Fernández, S., E. Groden, J. D. Vandenberg, y M. J. Furlong. 2001. The effect of mode of exposure to *Beauveria bassiana* on conidia acquisition and host mortality of Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*, *J. Invertebr. Pathol.* 77: 217-226.

- Fernandes, P. M., R. E. Leucona, S. B. Alves. 1985. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. à broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae). *Ecossistema*. 10: 176-181
- Grimm, C. y F. Guharay. 1998. Control of leaf-footed bug *Leptoglossus zonatus* and shield-backed bug *Pachycoris klugii* with entomopathogenic fungi. *Biocontrol Sci. Tech.* 8: 365-376.
- González, Á. A., M. K. P. García, G. M. A. Hernández, O. R. Teniente, B. J. L. Solís, y C. A. Zamarripa. 2011. Guía para cultivar Piñón Mexicano (*Jatropha curcas* L.) en Jalisco. Folleto Técnico Núm. 6 INIFAP-CIRPAC Campo Experimental Centro Altos de Jalisco. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México.
- Hajek, A. E. y R. J. St. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 293-322.
- Hernández, D. O., N. Pérez, y J. Toledo. 2010. Patogenicidad de tres cepas de hongos entomopatógenos a adultos de *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Dipt., Tephritidae) en condiciones de laboratorio. *Acta Zool. Mex.* 26: 481-494.
- Inglis, D. G., J. Enkerli, y M. S. Goettel. 2012. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales, Chapter VII. pp. 189 – 253. En: Lacey, L.A. (ed.). *Manual of techniques in invertebrate pathology*, 2nd Edition. Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Inglis, D. G., M. S. Goettel, T. M. Butt, y H. Strasser. 2001. pp. 23-69. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. En: Butt, T. M., C. Jackson, y

- N. Magan (eds.). Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. CAB International, Wallingford, UK.
- James, R. R., S. J. Buckner, y P. T. Freeman. 2003. Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. J. Invertebr. Pathol. 84: 67-74.
- Jiménez, J. A. 1992. Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. Cenicafé. 43: 84-98.
- Leucona, R. E. 1996. Micoorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Buenos Aires, Argentina. 143-150.
- Liu, H., M. Skinner, y B. L. Parker. 2003. Bioassay method for assessing the virulence of *Beauveria bassiana* against tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hem., Miridae). J. Appl. Ent. 127: 299-304.
- López-Guillén, G., J. Gómez-Ruiz, J. F. Barrera, E. Herrera-Parra, M. Hernández-Arenas, E. Bravo-Mosqueda, y A. Zamarripa-Colmenero. 2013. Artrópodos asociados a piñón (*Jatropha curcas* L.) en el sur de México. SAGARPA-INIFAP-CIRPAS. Campo Experimental Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Chiapas, México. Folleto Técnico Núm. 29.
- Maniana, N. K. y A. Ondulaja. 1998. Effect of species, age and sex of tsetse fly on response to infection by *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol. 43: 311–383.

- Marmaras, V. J., D. K. Charalambidis, y G. C. Zervas. 1996. Immune response in insects the role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 31: 119-133.
- Muñoz, J. A., W. de la Rosa, y J. Toledo. 2009. Mortalidad en *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Dipt., Tephritidae) por diversas cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, en condiciones de laboratorio. *Acta Zool. Mex.* 25: 609-624.
- R Core Team. 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Santoro, P. H., P. M. O. J. Neves., T. M. Alexandre, y L. F. A. Alves. 2007. Interferência da metodologia nos resultados de bioensaios de seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de insectos. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília. 42(4): 483-489.
- Storey, G. K. y W. A. Gardner. 1986. Sensitivity of the entomogenous fungus *Beauveria bassiana* to selected plant growth regulators and spray additives. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 1-3.
- Tepole-García, R. E., S. Pineda-Guillermo, J. Martínez-Herrera, y V. R. Castrejón-Gómez. 2012. Records of two pest species, *Leptoglossus zonatus* (Heteroptera: Coreidae) and *Pachycoris klugii* (Heteroptera: Scutelleridae), feeding on the physic nut, *Jatropha curcas*, in Mexico. *Florida Entomol.* 95(1): 208-210.

- Todorova, S. I., C. Cloutier, J. C. Côte, y D. Coderre. 2002. Pathogenicity of six isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina, Hyphomycetes) to *Perillus bioculatus* (F) (Hem., Pentatomidae). J. Appl. Ent. 126: 182-185.
- Vega, F. E., N. V. Meyling, J. J. Luangsaard, y M. Blackwell. 2012. Fungal entomopathogens. Chapter 6. Insect Pathology. Academic Press Elsevier Inc. San Diego, EUA.
- Wang, S., X. Miao, W. Zhao, B. Huang, M. Fan, Z. Li, y Y. Huang. 2005. Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). Mycol. Res. 109: 1364-1372.

Conclusiones

De acuerdo con el objetivo del presente trabajo que consistió en evaluar la patogenicidad de varios aislados de *B. bassiana* sobre adultos de *P. torridus* mediante dos métodos de inoculación en condiciones de laboratorio, se concluye lo siguiente:

1. Se determinó que el mejor método de inoculación fue por aspersión de conidias de *B. bassiana* sobre adultos de *P. torridus* en comparación con la técnica por inmersión.
2. La técnica de inmersión no fue adecuada pues se evidenció que el manejo de los adultos de *P. torridus* por este método causó alta mortalidad en el testigo.
3. Los tres aislados Bb19, Bb15 y Bbrhy como el producto comercial GHA BotaniGard® 22 WP a la concentración 1×10^8 conidias/ml fueron igualmente patogénicos contra adultos de *P. torridus*, con mortalidades observadas de 52.94%, 55.88%, 70.58% y 67.64%, respectivamente. No obstante el aislado Bbrhy fue el más agresivo porque tuvo el menor TL_{50} con 7 días comparado con Bb15, comercial y el Bb19 con 9, 10.1 y 12.2 días, respectivamente.
4. El aislado Bb19 fue más patogénico (90% de mortalidad real) en la técnica por aspersión pero menos patogénico (10% de mortalidad real) en la técnica por inmersión, por lo que se dedujo que el método de inoculación pudo influir en la respuesta del tipo de aislado de *B. bassiana*.
5. Este estudio es el primer reporte de patogenicidad de *B. bassiana* sobre *P. torridus*.

Literatura citada

- Alatorre-Rosas, R., 2007. Hongos entomopatógenos, pp. 127-143. En: Rodríguez del Bosque, L. A. y H.C. Arredondo-Bernal (eds.). Teoría y aplicación del control biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. p. 303.
- Ali, S. A., Qayyum, A. R., Bakhsh, A. y Husnain, T., 2012. Entomopathogenic fungi as biological controllers new insights into their virulence and pathogenicity. *Archives of Biology and Science*, Belgrade, 64(1), pp. 21-42.
- Alonso, O. y Lezcano, J. C., 2014. Artrópodos asociados a *Jatropha curcas* Linnaeus. Funciones y estrategia para su manejo. *Pastos y Forrajes*, 37(1), pp. 3-16.
- Borges, F. R. D., Pratisoli, D., Edson, N. D., García, M. F., Lourenco, G. A., Dos Anjos, E. S. D. y Polanczyk. R. A., 2013. Development of *Pachycoris torridus* (Hem., Scutelleridae) on *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae), *Psidium cattleianum* (Myrtaceae) and *Aleurites fordii* (Euphorbiaceae). *Florida Entomologist*, 96(3), pp. 1149-1157.
- Brittaine, R. y Litaladio, N.B., 2010. *Jatropha*: A smallholder bioenergy crop. The potential for pro-poor development. Integrated Crop Management. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 8. pp: 1-96.
- Broglio-Micheletti, S. M. F., Endres, L., Valente, E. C. N., Souza, L. A., Santos, C. M. y Dias, N. S., 2010. Primeiro registro de *Pachycoris torridus* em pinhão-mansô (Euphorbiaceae) em Alagoas, Brasil. *Ciência e Agrotecnologia*, 34, pp. 1654-1657.

- Cañedo, V. y Ames, T., 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Lima, Perú. Centro Internacional de la Papa (CIP). p. 62.
- Fargues, J., Ouedraogo, A., Goettel, M. S. y Lomer, Ch. L., 1997. Effects of temperatura, humidity and inoculation method on susceptibility of *Schistocerca gregaria* to *Metarhizium flavoviride*. *Biocontrol Science and Technology*, 7, pp. 345-356.
- Fernández, S., Groden, E., Vandenberg, J. D. y Furlong. M. J., 2001. The effect of mode of exposure to *Beauveria bassiana* on conidia acquisition and host mortality of Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 77, pp. 217-226.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira, N. S., Carvalho, R. P. L., Berti, G. C., Batista, F. E., Parra, J. R. P., Zucchi, R. A., Alves, S. B., Vendramim, J. D., Marchini, L. C., Lopes, R. S. L. y Omoto, C., 2002. Entomologia Agrícola. FEALQ, Piracicaba, Brazil. p. 920.
- Grimm, C. y Führer, E., 1998. Population dynamics of the true bugs (Heterop.) in physic nut (*Jatropha curcas*) plantations in Nicaragua. *Journal of Applied Entomology*, 122, pp. 515-521.
- Grimm, C. y Guharay, F., 1998. Control of leaf-footed bug *Leptoglossus zonatus* and shield-backed bug *Pachycoris klugii* with entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology*, 8, pp. 365-376.

- Grimm, C., y Maes. J. M., 1997. Insectos asociados al cultivo de tempate (*Jatropha curcas* L.) (Euphorbiaceae) en el pacifico de Nicaragua. I. Scutelleridae (Heteroptera). *Revista Nicarangüense de Entomología*, 39, pp. 13-26.
- Heller, J., 1996. Physicnut *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilization and neglected crops. I. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. p. 66.
- Inglis, D. G., Goettel, M. S., Butt, T. M. y Strasser. H., 2001. pp. 23-69. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. En: Butt, T. M., C. Jackson, y N. Magan (eds.). *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. CAB International, Wallingford, UK.
- Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). 2009. Monitoreo e identificación de plagas y controladores biológicas en piñón blanco (*Jatropha curcas* L.). Estación Experimental Agraria INIA, Tarapoto, Perú, Boletín, pp. 1-13.
- Liu, H., Skinner, M., Parker, B. L. y Brownbridge. M., 2002. Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), and other entomopathogenic fungi against *Lygus lineolaris* (Hem., Miridae), *Journal of Economic Entomology*, 95(4), pp. 675-681.
- López-Guillén, G., Gómez-Ruiz, J., Barrera-Gaytan, J. F., Zamarripa-Colmenero, A., Herrera-Parra, E., Hernández-Arenas, M., Bravo-Mosqueda, E. 2013. Artrópodos asociados a piñón (*Jatropha curcas* L.) en el sur de México

SAGARPA-INIFAP-CIRPAS. Campo Experimental Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Chiapas, México. Folleto Técnico, 29, pp. 70.

Rodrigues, S. R., De Oliveira, H. N., Dos Santos, W. T. y Abot, A. R., 2011. Aspectos biológicos e danos de *Pachycoris torridus* em pinhão-mansão. *Bragantia, Campinas*, 70 (2), pp. 356-360.

Saturnino, H. M., Pacheco, D. D., Kashida, J., Tominaga, N. y Goncalves, N. P., 2005. Cultura do pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.). *Informe Agropecuário, Belo Horizonte*, 26 (229), pp. 44-78.

Soto, S. S. y Nakano, O., 2002. Ocorrência de *Pachycoris torridus* (Scopoli) (Hem., Scutelleridae) em Acerola (*Malpighia glabra* L.) no Brasil, *Neotropical Entomology*, 31, pp. 481-482.

Tepole-García, R. E., Pineda-Guillermo, S., Martínez-Herrera, J. y Castrejón-Gómez, V. R., 2012. Records of two pest species, *Leptoglossus zonatus* (Heteroptera: Coreidae) and *Pachycoris klugii* (Heteroptera: Scutelleridae), feeding on the physic nut, *Jatropha curcas*, in Mexico. *The Florida Entomologist*, 95(1), pp. 208-210.

Tominaga, N., Kakida, J., Yasuda, E. K., 2007. Cultivo do pinhão-mansão para produção de biodiesel. Viçosa: Centro de Produções Técnicas. *Série Agroindústria*. p. 130-133.

Vega, F. E., N. V. Meyling, J. J. Luangsaard, y M. Blackwell., 2012. Fungal entomopathogens. Chapter 6. Insect Pathology. Academic Press Elsevier Inc. San Diego, EUA. p. 171-220.