



El Colegio de la Frontera Sur

Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* sobre larvas  
edáficas (Coleoptera: Melolonthidae) en condiciones de  
laboratorio

Tesis

presentada como requisito parcial para optar al grado de Maestro en Ciencias en  
Recursos Naturales y Desarrollo Rural  
Con orientación en Agricultura, Sociedad y Ambiente

Por

Josué Gerardo Morales Santis

2019



# El Colegio de la Frontera Sur

San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, a 22 de noviembre de 2019.

Las personas abajo firmantes, miembros del jurado examinador de: **Josué Gerardo Morales Santis** hacemos constar que hemos revisado y aprobado la tesis titulada: **Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* sobre larvas edáficas (Coleoptera: Melolonthidae) en condiciones de laboratorio** para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural**

	Nombre	Firma
Director:	Dr. José David Álvarez Solís	_____
Asesor:	Dr. Jaime Gómez Ruiz	_____
Asesor:	M. C. Noé Samuel León Martínez	_____
Sinodal adicional	M. C. Benigno Gómez y Gómez	_____
Sinodal adicional	Dra. Lorena Ruiz Montoya	_____
Sinodal suplente	Dr. Hugo Rafael Perales Rivera	_____

## DEDICATORIAS

A María Morales

A Emilia, Javier y Daniel

A mis cuñadas, sobrinas y sobrinos

A mi maestra, Adriana Castro<sup>†</sup>

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca concedida para llevar a cabo mis estudios de posgrado.

A El Colegio de la Frontera Sur, en especial a las unidades Tapachula y San Cristóbal, por las facilidades otorgadas para realizar esta investigación y por contribuir a mi desarrollo profesional.

A la Dra. Adriana Castro<sup>†</sup> por dirigir esta tesis, por sus enseñanzas. Gracias por su paciencia, por confiar y creer en mí.

A la Ing. Conchita Ramírez por su valioso apoyo, principalmente en la recolecta de escarabajos y en la cría de larvas en laboratorio.

Al Dr. David Álvarez por su asesoría y por el apoyo otorgado al asumir la dirección de esta tesis. Gracias por creer en mí.

Al Dr. Jaime Gómez por el apoyo brindado en las asesorías, por sus comentarios y sugerencias para mejorar esta tesis. También por facilitar el hongo del Soconusco.

Al M. en C. Noé León por su asesoría y por su colaboración en la recolecta de escarabajos.

A la Dra. Lorena Ruiz, al M. en C. Benigno Gómez y al Dr. Hugo Perales por sus comentarios y sugerencias que aportaron a la tesis.

Al M. en C. Óscar Martínez por su ayuda en la parte estadística.

Al Dr. Eduardo Velázquez por su apoyo constante durante el desarrollo de esta tesis.

A los Laboratorios Institucionales de ECOSUR; en particular a Lupita Pérez, Juan Morales y Manuel Gutiérrez por facilitar equipo y material de laboratorio.

A Elsa Santiz, Ernesto Colima, Marco Miranda, doña Maricela, don Alfonzo, don Melecio, Berenice Domínguez, Celeny Jiménez y demás personas que apoyaron esta investigación.

A mis familiares por su confianza.

## CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS.....	II
ÍNDICE DE FIGURAS .....	II
RESUMEN.....	IV
I. Introducción .....	1
2.1 Las plagas del suelo .....	4
2.2 El complejo “gallina ciega” .....	4
2.2.1 Distribución, diversidad y abundancia .....	5
2.2.2 Clasificación taxonómica .....	5
2.2.3 Descripción morfológica de melolóntidos .....	6
2.2.4 Descripción de las especies utilizadas en esta investigación .....	7
2.2.5 Hábitos alimenticios.....	8
2.2.6 Ciclo de vida .....	8
2.3 El Manejo Integrado de Plagas (MIP) .....	9
2.3.1 Control biológico como parte del MIP.....	9
2.3.2 Enemigos naturales de la “gallina ciega” .....	10
2.3.2.1 Hongos entomopatógenos (HEP) .....	10
2.3.2.2 <i>Beauveria bassiana</i> .....	10
2.3.2.3 Modo de acción.....	11
2.3.2.4 Síntomas de la enfermedad .....	11
2.3.2.5 Patogenicidad y agresividad .....	11
2.3.2.6 Estudios de <i>B. bassiana</i> contra plagas .....	12
III. Justificación .....	13
IV. Pregunta de investigación .....	14
V. Hipótesis .....	14
VI. Objetivo .....	14
VII. Métodos .....	15
7.1 Procedencia de las larvas de “gallina ciega” .....	15
7.2 Obtención de las cepas de <i>Beauveria bassiana</i> .....	17
7.3 Reproducción de las cepas.....	18
7.4 Concentración y viabilidad (porcentajes de germinación) de conidios.....	18

7.5 Inoculación de las larvas.....	19
7.6 Observaciones.....	19
7.7 Análisis estadístico.....	19
VIII. Resultados.....	21
IX. Discusión.....	25
X. Conclusiones.....	32
XI. Literatura citada.....	33

### ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Proporciones de huevos, larvas de primer estadio (L1) y larvas de segundo estadio (L2) de cada una de las especies de “gallina ciega” en cautiverio.....	16
Tabla 2. Concentración, viabilidad (porcentaje de germinación) de las cepas usadas en el bioensayo. ....	18

### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mortalidad de larvas de la especie <i>P. ravidia</i> tratadas con cepas de <i>B. bassiana</i> , a la concentración de $1 \times 10^8$ conidias/ml, en un mes de observación en laboratorio a $21.2 \pm 1$ °C y $59.1 \pm 6$ % de humedad relativa. ....	21
Figura 2. Mortalidad de larvas de la especie <i>P. obsoleta</i> tratadas con cepas de <i>B. bassiana</i> , a la concentración de $1 \times 10^8$ conidias/ml, por un mes de observación en laboratorio a $21.2 \pm 1$ °C y $59.1 \pm 6$ % de humedad relativa.....	22
Figura 3. Curvas de sobrevivencia (Kaplan-Meier) de larvas de la especie <i>P. ravidia</i> a la concentración de $1 \times 10^8$ conidias/ml, en un mes de observación en laboratorio a $21.2 \pm 1$ °C y $59.1 \pm 6$ % de humedad relativa. ....	22

Figura 4. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de larvas de la especie *P. obsoleta* a la concentración de  $1 \times 10^8$  conidias/ml, en un mes de observación en laboratorio a  $21.2 \pm 1$  °C y  $59.1 \pm 6$  % de humedad relativa. ....23

Figura 5. Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de larvas de la especie *P. tumulosa* a la concentración de  $1 \times 10^8$  conidias/ml, en un mes de observación en laboratorio a  $21.2 \pm 1$  °C y  $59.1 \pm 6$  % de humedad relativa. ....23

## RESUMEN

Las “gallinas ciegas” (Coleoptera: Melolonthidae) son larvas edáficas que se consideran como la principal plaga agrícola del maíz (*Zea mays* L.) en la región Altos Tsotsil-Tseltal de Chiapas. Los productores usan agroquímicos para contrarrestar el daño que les ocasiona esta plaga, lo que genera impactos negativos en el ambiente y la salud humana. Los hongos entomopatógenos pueden ser una alternativa ecológicamente viable para su manejo, por ello, en esta investigación se planteó como objetivo evaluar la patogenicidad y agresividad (TL<sub>50</sub>) de cuatro cepas de *Beauveria bassiana*; dos nativas de la región Altos Tsotsil-Tseltal de Chiapas, una de Brasil (Bb15) y una comercial (BeaTron®), todas a la concentración de 1x10<sup>8</sup> conidias/ml, sobre larvas de segundo estadio de las especies rizófagas estrictas *Phyllophaga ravidata* y *P. obsoleta*, y la rizófaga facultativa *P. tumulosa* en condiciones de laboratorio. Los resultados señalan que para *P. ravidata* las cepas nativas 1 y 2 fueron las más patogénicas con mortalidades observadas de 80 y 64 % y TL<sub>50</sub> de 13.5 y 21 días, respectivamente. Así mismo para *P. obsoleta*, las cepas nativas 1 y 2 presentaron mayor patogenicidad con mortalidades observadas de 60 y 52 % y TL<sub>50</sub> de 21 y 25 días, respectivamente. En tanto que para *P. tumulosa* ninguna de las cepas evaluadas fue patogénica. Este estudio sugiere que es posible utilizar los hongos entomopatógenos nativos dentro de un programa de control biológico.

Palabras clave: plagas del suelo, “gallina ciega”, agroquímicos, hongo entomopatógeno, patogenicidad

## I. Introducción

En México y Centroamérica, las larvas edáficas (Coleoptera: Melolonthidae) se consideran plagas agrícolas de importancia debido a que se alimentan de las raíces de las plantas y provocan pérdidas en cultivos básicos e industriales, hortalizas, flores y frutales (Morón y Rodríguez-del-Bosque 2010). En México, a las larvas subterráneas de melolontidos se les conoce como “gallinas ciegas”, taxonómicamente es un complejo de especies, el cual es distinto entre localidades, años y cultivos (Morón 1986).

De acuerdo con los hábitos alimenticios del complejo larval se separan en rizófagas estrictas (solo comen raíces), rizófagas facultativas (comen raíces en ausencia de materia orgánica) y saprófagas (únicamente se alimentan de materia orgánica en descomposición) (Morón 1986).

La “gallina ciega” se considera la plaga agrícola principal en maíz (*Zea mays* L.) en la región Altos Tsotsil-Tzeltal de Chiapas (CEIEG 2019), dado que las especies rizófagas reducen los rendimientos del grano en casi 500 kg por hectárea (Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez 2000). Lo cual resulta preocupante, porque se trata de productores de temporal que obtienen rendimientos de 1.3 t ha<sup>-1</sup> (SIAP 2017), que destinan la cosecha para la subsistencia de ellos y de sus familias (Castro-Ramírez y Ramírez-Salinas 2010).

Ante esta situación, los productores optan por el uso indiscriminado de agroquímicos para contrarrestar el daño que ocasiona el complejo “gallina ciega” (Bernardino et al. 2017). Sin embargo, con las aplicaciones desmedidas y descontroladas de agroquímicos, la plaga desarrolla resistencia, se destruyen sus enemigos naturales y otra fauna benéfica, se cambia la diversidad microbiana edáfica y se incrementa la contaminación del agua, suelo y aire (Kaur y Gang 2014). Asimismo se pone en riesgo el ambiente y la salud humana (Sarwar 2015; Kim et al. 2017). Además, los agroquímicos son caros para el precio del maíz.

Para controlar efectivamente a las plagas agrícolas, proteger a los cultivos y disminuir el uso de los agroquímicos, se impulsa la transición hacia el Manejo Integrado de Plagas (MIP), el cual consiste en seleccionar y usar, solas o integradas, tácticas de control biológico, cultural, físico-mecánico, legal (medidas cuarentenarias que disminuyen el riesgo de entrada de plagas a zonas libres) y, como última opción, los agroquímicos;

basadas en el contexto socioeconómico de los sistemas agrícolas, el ambiente asociado y la dinámica de población de las plagas (Kogan 1998; Murguido y Elizondo 2007; Barrera et al. 2012; Barzman et al. 2015).

La táctica del control biológico consiste en usar organismos vivos para suprimir o regular la densidad de población o el impacto de una plaga (Eilenberg et al. 2001). Por tanto, requiere del conocimiento preciso sobre la biología-ecología de los insectos plaga, así como de las especies que se usarán para reducir sus poblaciones; la evaluación de los enemigos naturales nativos de las plagas es un aspecto esencial en el quehacer del control biológico (Van Driesche et al. 2007).

A causa de su hábitat subterráneo, las “gallinas ciegas” son infectadas de manera natural por microorganismos propios del suelo (Villani et al. 1992; Jackson 2003); bajo esas condiciones, los hongos entomopatógenos (HEP) *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* sobresalen como los enemigos naturales con mayor potencial para su uso en programas de MIP (Jackson et al. 1997; Hajek y St. Leger 1994; Pell et al. 2010; Hernández et al. 2010; Vega et al. 2012).

En la región Altos Tsotsil-Tzeltal se ha estado investigando el HEP *Beauveria bassiana* nativo como alternativa para el manejo de la “gallina ciega”. Por ello, varias cepas del hongo fueron obtenidas de adultos (escarabajos) y larvas de “gallina ciega” infectadas en campo y se les ha evaluado la patogenicidad y el Tiempo Letal Medio (TL<sub>50</sub>) sobre larvas rizófagas y más abundantes de “gallina ciega” en condiciones de laboratorio, invernadero y semicampo (Flores et al. 2002; Castro-Ramírez 2006; Velázquez-López et al. 2006; Polanco-Mendoza et al. 2010).

En El Colegio de la Frontera Sur-San Cristóbal (ECOSUR-SC), ubicado en la región Altos Tsotsil-Tzeltal, se conservan cepas nativas de *B. bassiana* promisorias obtenidas en las parcelas agrícolas donde se presenta la plaga “gallina ciega”; se guardan con el interés de que no se pierdan para el aprovechamiento por los productores. Así mismo, en la región Soconusco de Chiapas (en ECOSUR-Tapachula) se conservan cepas de *B. bassiana* de esa zona y provenientes de otros estados de la República Mexicana y de otros países, que se han evaluado sobre varias plagas de esa región, particularmente

sobre la broca del café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) (Barrera et al. 2008).

Actualmente, se comercializan productos formulados con cepas de *B. bassiana* de diferente origen para el manejo eficaz de plagas agrícolas, los cuales son elaborados por empresas especializadas en el desarrollo de productos biológicos para la agricultura. Sin embargo, se menciona que utilizar cepas endémicas de hongos colectadas en la misma región donde se presentan las plagas puede ser la estrategia más eficaz para regular sus poblaciones, debido a su adaptación al ambiente, entre otras causas (Monzón 2001; Van Driesche et al. 2007; Vázquez-Martínez et al 2014). Entonces, cabe preguntarse sobre la efectividad de éstos productos comerciales sobre la plaga subterránea “gallina ciega”, así como su establecimiento en el suelo, como componente del mismo (Hernández et al. 2010).

Por lo anterior, surgió el interés de investigar la efectividad de las cepas nativas de *B. bassiana* y las provenientes de otros ambientes sobre tres especies del complejo “gallina ciega” de la región Altos Tsotsil-Tseltal de Chiapas. Así, en un bioensayo se evaluaron la patogenicidad (capacidad para producir y desarrollar una enfermedad) y la agresividad ( $TL_{50}$ ) de dos cepas nativas de la región Altos Tsotsil-Tseltal, una cepa originaria de Brasil (Bb15) y el producto comercial BeaTron® (Plant Health Care® de México) sobre el segundo estadio larval de las especies rizófagas *Phyllophaga ravidia* y *P. obsoleta*, y la especie rizófaga facultativa *P. tumulosa*.

## II. Antecedentes

### 2.1 Las plagas del suelo

En México, desde hace aproximadamente cuatro décadas, el estudio de las plagas del suelo cobró mayor importancia entre la comunidad científica. El caso particular de las pérdidas de maíz en los estados de Jalisco y Tamaulipas fue determinante para que los investigadores fijaran su atención en los organismos subterráneos que causan problemas en varias especies vegetales. Por lo tanto, a partir de 1978 se realizan de manera itinerante Mesas Redondas sobre las plagas del suelo, donde se exponen y discuten temas relacionados con su distribución, diversidad, biología, ecología y manejo; principalmente en cultivos agrícolas (Morón y Rodríguez, 2010).

En las Mesas Redondas y en algunas investigaciones realizadas en el territorio nacional se ha señalado que la “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae) es una de las principales plagas del suelo debido a que causa perjuicios considerables a los cultivos por alimentarse de las raíces de las plantas. El detrimento de las raíces impacta en los productos, rendimientos y calidad de los cultivos. En la producción de hortalizas, frutales, flores, forestales y cultivos agrícolas la “gallina ciega” es un problema serio (Ríos y Romero, 1982; Rodríguez, 1988).

### 2.2 El complejo “gallina ciega”

En la región Altos Tsotsil-Tseltal, el complejo “gallina ciega” puede generar pérdidas de 36 a 42 % de la producción de grano de maíz (aproximadamente 500 kg por hectárea) (Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez 2000; Castro-Ramírez et al. 2006). Por ello, desde hace más de 20 años se estudia a la “gallina ciega” como plaga agrícola del maíz y las estrategias agroecológicas para su manejo. Lo que ha permitido conocer su ciclo de vida anual, su sincronización con el cultivo de maíz, sus hábitos alimenticios, la diversidad de especies y sus enemigos naturales (Castro-Ramírez y Ramírez-Salinas 2010).

Morón (1986) señala que al conjunto de especies que habitan determinada zona agrícola se le denomina complejo “gallina ciega”, el cual es distinto entre localidades, años y cultivos. Incluso entre parcelas de un mismo lugar (Castro-Ramírez, com. pers.).

En las parcelas agrícolas de los Altos Tsotsil-Tseltal se ha identificado un complejo de más de dieciséis especies de “gallina ciega” (Castro-Ramírez et al. 2005). Sin embargo, las responsables de las pérdidas agrícolas son *Phyllophaga obsoleta*, *P. ravidata*, *P. menetriesi*, *P. testaceipennis* y *P. tenuipilis* que tienen larvas que exclusivamente se alimentan de raíces (rizófagas estrictas).

### 2.2.1 Distribución, diversidad y abundancia

La “gallina ciega” se encuentra en todo el territorio de México y se distribuye de acuerdo con la humedad disponible, la temperatura media anual, el tipo de suelo y la vegetación. La mayor diversidad de especies se localiza en áreas con orografías accidentadas, donde la humedad y temperatura son menos estables, y la menor diversidad en zonas con escasa orografía, donde hay suelos y especies vegetales uniformes (Morón 2010).

Actualmente se reportan 1,179 especies de melolontidos, en estado adulto, en el territorio nacional, el mayor número de estas se encuentran en los estados de Chiapas (368), Veracruz (281) y Oaxaca (232). Chiapas alberga 94 especies endémicas (Morón et al. 2014).

En la región Altos Tsotsil-Tseltal de Chiapas se conocen 68 especies en estado adulto asociadas con los cultivos agrícolas, de las cuales únicamente 20 se reportan como larvas y pupas relacionadas con las raíces del maíz, principalmente de los géneros *Phyllophaga* y *Paranomala* (Castro-Ramírez y Ramírez-Salinas 2010).

Méndez y colaboradores (2006) señalan que, en las parcelas agrícolas de la región Altos Tsotsil-Tseltal predominan cinco especies de larvas rizófagas en los sitios con mayor diversidad de especies (trece), mientras que en los de menor diversidad (cinco) predomina al menos una especie con ese hábito de alimentación.

### 2.2.2 Clasificación taxonómica

Se sigue la delimitación por Endrödi (1966), que considera a Melolonthidae Leach, 1819, como familia válida de la superfamilia Scarabaeoidea (Cherman y Morón 2014).

Phyllum: Arthropoda

Subphyllum: Euarthropoda

Superclase: Mandibulata

Clase: Hexapoda

Subclase: Pterygota

Orden: Coleoptera

Suborden: Polyphaga

Superfamilia: Scarabaeoidea o Lamellicornia

Familia: Melolonthidae Leach, 1819, *sensu* Endrödi 1966

Subfamilia: Melolonthinae

Tribu: Melolonthini Leach, 1819

Género: *Phyllophaga* Harris, 1827

Especies (en esta investigación): *Phyllophaga ravid*a (Blanchard, 1850), *P. obsoleta* (Blanchard, 1850) y *P. tumulosa* (Bates, 1888)

### 2.2.3 Descripción morfológica de melolóntidos

Los adultos (ronrones) tienen colores variados, el tamaño del cuerpo varía entre 3 y 170 mm, presentan mandíbulas bien desarrolladas; esclerosadas, con dientes en el borde interno, más o menos ocultas bajo el clípeo. La maza antenal está formada por tres a siete artejos alargados y delgados con forma de lamelas capaces de doblarse y desplegarse como abanico, con superficie brillante y setas dispersas, usualmente son más largas en los machos que en las hembras.

La cabeza es pequeña, el cuerpo ovalado y robusto, pocas veces deprimido o esbelto. El abdomen está compuesto por seis segmentos visibles, los segmentos cuarto y quinto tienen los espiráculos colocados en los extremos laterales de los esternitos. Las patas anteriores son fuertes, en ocasiones esbeltas y más alargadas en los machos. Los tarsos son pentámeros en los tres pares de patas, las uñas tarsales están bien desarrolladas, con formas simples, dentadas, bífidas, usualmente móviles y en pares.

Las alas rígidas y duras (élitros) siempre están desarrolladas, en ocasiones fusionadas entre sí, y las alas metatorácicas (hemiélitros) bien desarrolladas, en pocos casos reducidas o ausentes.

Las larvas son de tipo escarabaeiforme. Los palpos maxilares están formados por cuatro artejos, tienen mandíbulas bien desarrolladas, las antenas con cuatro artejos, el último con forma diferente y provisto con áreas sensoriales de forma variable.

Los tres pares de patas bien desarrolladas, cada una de ellas con cuatro artejos diferenciados y el último con una uña. Tienen un par de espiráculos protorácicos y ocho pares de espiráculos abdominales de tipo cribiforme. El abdomen consta de diez segmentos y la abertura anal usualmente es horizontal (Morón et al. 1997).

2.2.4 Descripción de las especies larvales utilizadas en esta investigación, según Castro y colaboradores (2004).

#### *Phyllophaga ravida*

Son “gallinas ciegas” moderadamente robustas, de color blanco hialino, la longitud del cuerpo es de  $31 \pm 5$  mm, la cabeza es de color café-amarillenta. Habitan en todos los tipos de vegetación natural o inducidos, ubicados entre los 150 y 2100 m de altitud.

#### *Phyllophaga obsoleta*

Se considera una de las “gallinas ciegas” mejor distribuidas en México. Sus larvas son de color blanco cremoso, la longitud del cuerpo es de  $31 \pm 5$  mm, la cabeza es de color café-amarillenta, tiene hábitos alimenticios rizófagos pero pueden causar menos daños a las raíces cuando abunda la materia orgánica en el suelo. Habitan en casi todos los tipos de vegetación, naturales o inducidos, ubicados entre los 800 y 2500 m de altitud.

#### *Phyllophaga tumulosa*

Son “gallinas ciegas” poco robustas, de color blanco cremoso, la longitud del cuerpo es de  $2.7 \pm 3$  mm, el color de la cabeza es café-amarillenta. Esta especie se caracteriza por mantener el cuerpo enroscado, en forma de “C”.

Las descripciones morfológicas de las “gallinas ciegas” se realizaron con sus terceros estadios, cuando las larvas han alcanzado el mayor desarrollo.

#### 2.2.5 Hábitos alimenticios

Morón y colaboradores (1997) proponen tres categorías de clasificación sobre los hábitos alimenticios de las “gallinas ciegas”: rizófagas estrictas, únicamente se alimentan de raíces; rizófagas facultativas, en ausencia de materia orgánica se alimentan de raíces; y saprófagas, solamente ingieren materia orgánica.

En la región Altos Tsotsil-Tseltal, las especies *Phyllophaga ravidata*, *P. obsoleta*, *P. testaceipennis*, *P. tenuipilis* y *P. menetriesi* se consideran rizófagas estrictas, la especie *P. tumulosa* rizófaga facultativa. Las especies del género *Paranomala* pueden ser rizófagas facultativas o saprófagas (Castro et al. 2004).

#### 2.2.6 Ciclo de vida

El ciclo de vida de los melolóntidos puede ser anual, bianual y bienal según la especie y su modelo ambiental. En México, el ciclo de vida anual es el más común en el complejo “gallina ciega” (Morón et al. 2010). En la región Altos Tsotsil-Tseltal la mayoría de las “gallinas ciegas” tienen un ciclo de vida anual, el cual está estrechamente relacionado con la fenología del maíz.

Los adultos emergen del suelo en marzo-abril al caer las primeras lluvias y buscan sus hospederos para alimentarse. Después de la cópula, las hembras ovipositan grupos de huevecillos con arvenses o pastos, nunca en suelos desnudos, en profundidades entre 10 y 20 cm.

A finales del mes de mayo e inicios de junio se observan los primeros estadios larvales (L1), los cuales se alimentan de materia orgánica. En junio-julio se pueden ver los segundos estadios (L2) cerca de las raíces de las plantas de maíz. De agosto a diciembre se ven las larvas de tercer estadio (L3), las cuales son más móviles y voraces, a estas se les atribuyen las pérdidas agrícolas debido a la caída de las plantas de maíz por su débil sistema radical. En el mes de octubre las L3 reducen su alimentación y movilidad, y se

entierran a profundidades entre 25 y 30 cm para pupar. Los adultos en el suelo se observan de febrero a mayo.

## 2.3 El Manejo Integrado de Plagas (MIP)

El MIP consiste en seleccionar y usar, solas o integradas, tácticas de control biológico, cultural, físico-mecánico, legal (medidas cuarentenarias que disminuyen el riesgo de entrada de plagas a zonas libres) y, como última opción, los agroquímicos; basadas en el contexto socioeconómico de los sistemas agrícolas, el ambiente asociado y la dinámica de población de las plagas (Kogan 1998; Murguido y Elizondo 2007; Barrera et al. 2012; Barzman et al. 2015).

### 2.3.1 Control biológico como parte del MIP

El control biológico es una táctica que puede ser ecológicamente segura para el combate de plagas agrícolas. Éste se define como el uso de organismos vivos para suprimir o regular la densidad de población o el impacto de una plaga (Eilenberg et al. 2001). Por tanto, requiere del conocimiento preciso sobre la biología-ecología de los insectos plaga, así como de las especies que se usarán para reducir sus poblaciones; la evaluación de los enemigos naturales nativos de las plagas es un aspecto esencial en el quehacer del control biológico (Van Driesche et al. 2007).

El control biológico de plagas ha contribuido al progreso de la agricultura de México y de muchos países. Actualmente, los productores y la sociedad están más informados y conscientes sobre los impactos negativos que representan las aplicaciones de agroquímicos para el control de plagas agrícolas, y piden estrategias de manejo que no pongan en riesgo el ambiente ni la salud humana (Arredondo y Rodríguez 2008).

El uso de microorganismos en programas de control biológico de plagas ha cobrado mucha importancia a nivel global durante los últimos años (Van Driesche et al. 2007). En este sentido, las bacterias, virus, hongos y nematodos han recibido mayor atención por parte de la comunidad científica, debido a que estos agentes de control se perfilan como una alternativa ecológica viable ante la contaminación ambiental y el desarrollo de la

resistencia de las plagas por las aplicaciones indiscriminadas de agroquímicos (Ibarra et al. 2006).

En Nueva Zelanda se logró regular las poblaciones de la plaga subterránea de los pastizales *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae) mediante aplicaciones de la bacteria entomopatógena nativa *Serratia entomophila* (Jackson 2003). A partir de entonces, esa bacteria se ha evaluado en México sobre larvas de escarabajos. No obstante se requiere de mayor investigación para conocer su acción en plagas del suelo.

### 2.3.2 Enemigos naturales de la “gallina ciega”

Al muestrear los enemigos naturales de las lavas de “gallina ciega” en las parcelas agrícolas de los Altos de Chiapas, se han registrado dos ectoparasitoides del género *Tiphia* (Hymenoptera: Tiphidae), un endoparasitoide (Diptera) y el hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hyphomycetes) (Castro-Ramírez y Ramírez-Salinas 2001; Gómez et al. 2000).

#### 2.3.2.1 Hongos entomopatógenos (HEP)

En México, los microorganismos que han destacado para el control de “gallina ciega” son los HEP, los cuales están de manera natural en el ambiente y son comunes en residuos de cultivos, plantas y suelo. Los HEP se encuentran activamente en muchos organismos y tienen la ventaja de infectar al hospedero por contacto y adhesión de sus estructuras reproductivas al exoesqueleto de los insectos, por lo que no es necesaria su ingestión (Hajek and St. Leger 1994; Pucheta et al. 2006). Se conocen muchos tipos de HEP, sin embargo las especies *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* son las más estudiadas contra “gallina ciega” (Flores et al. 2002; Nájera et al. 2006).

#### 2.3.2.2 *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin

El hongo *B. Bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) habita el suelo de manera natural, está distribuido en áreas templadas y tropicales, se considera un patógeno de insectos del suelo, sin embargo, es posible encontrarlo en la superficie de las hojas y en las raíces de las plantas (Zimmermann 2007).

### 2.3.2.3 Modo de acción

La infección inicia cuando el conidio se adhiere al exoesqueleto del insecto y emite uno o varios tubos germinativos que, a través de procesos enzimáticos, penetran la cutícula. Una vez dentro del cuerpo, prolifera en el hemocele y órganos internos provocando la muerte del insecto, finalmente el hongo emerge para comenzar la formación de conidios (Pucheta et al. 2006).

### 2.3.2.4 Síntomas de la enfermedad

Al inicio de la enfermedad, sobre el cuerpo de los estados inmaduros de los insectos se pueden observar manchas o puntos necróticos de color pardo oscuro o negro, que están asociados al lugar por donde ha penetrado el hongo. Posteriormente el insecto pierde movilidad y deja de alimentarse. En la infección causada por *B. bassiana* es frecuente observar que las larvas cambian de color a tonalidades rosadas, y cuando el insecto muere se cubre con micelio blanco. Finalmente el insecto se momifica sin cambios en su tamaño y forma, no tienen mal olor (Hernández-Velazquez et al. 2010).

### 2.3.2.5 Patogenicidad y agresividad

Por su parte, la patogenicidad es la capacidad de iniciar y desarrollar una enfermedad, mientras que la agresividad se refiere al grado o intensidad con la que se produce sobre un grupo o especie (Shapiro et al. 2005). En los HEP, ambos aspectos determinan la efectividad controladora de plagas (Monzón 2001). Las cepas de *B. bassiana* más agresivas son aquellas que matan a su hospedero en menor tiempo, al cual se le denomina Tiempo Letal Medio (TL<sub>50</sub>) (De la Rosa et al. 2002).

En bioensayos se usa el método “prueba máxima” que consiste en inocular directamente sobre el organismo el inóculo de hongo para estimar su patogenicidad y agresividad (TL<sub>50</sub>). En larvas de “gallina ciega” el inóculo de hongo se coloca en el suelo como sustrato, simulando como se aplicaría el hongo en campo. Sin embargo, se necesita corroborar una “prueba máxima” que estrese menos a las larvas, por su cualidad subterránea.

### 2.3.2.6 Estudios de *B. bassiana* contra plagas

Varios estudios demuestran que al seleccionar y aislar cepas nativas de *B. bassiana* y aplicarlas de manera experimental sobre insectos que se consideran plagas agrícolas, pueden ocasionar mayor patogenicidad y mortalidad en periodos cortos.

Aislamientos de hongos entomopatógenos del occidente de México realizados por Nájera-Rincón et al. (2005), determinaron una regular virulencia del aislado Bb50 que registró 49 % de mortalidad en larvas de tercer estadio de *Phyllophaga crinita* a los 30 días después de la infección con hongos entomopatógenos ( $2 \times 10^8$  con/g).

De Oliveira et al. (2011) aislaron y evaluaron la patogenicidad de diferentes cepas de *B. bassiana* aislados de hemípteros y coleópteros, los bioensayos se realizaron con larvas y adultos de *Alphitobius diaperinus* a una concentración fúngica de  $1 \times 10^9$  conidias/ml, durante un período de diez días, ocasionando una mortalidad de 33 al 93 % para larvas, y entre 5 y 90 % para adultos. El aislado más virulento fue Unioeste-04, con mortalidad de 92 y 90 % para larvas y adultos, respectivamente. Otros trabajos similares reportaron Rohde et al. (2006) al aislar Unioeste-04, además de causar una alta mortalidad confirmada tanto para larvas como para adultos de *A. diaperinus* con mortalidad de 100 y 96.5 %, respectivamente a la concentración más alta.

Keskin y colaboradores (2019), determinaron que los aislamientos de *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae* obtenidos de bosques y campos agrícolas, son eficaces para el control de larvas de *Tenebrio molitor*, cepas de *B. bassiana* YK14, *M. anisopliae* YK38 e YK45 causaron un 100% de mortalidad contra la plaga después 7 días de aplicación, demostrando que los aislamientos nativos son eficaces para el control de insectos plaga que habitan en el suelo.

### III. Justificación

Debido a su hábitat subterráneo, la plaga agrícola “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae) es infectada de manera natural por microorganismos propios del suelo como bacterias, nematodos y hongos. Entre los hongos entomopatógenos que habitan el suelo, destaca la especie *Beauveria bassiana* como el enemigo natural con mayor potencial para el control biológico de la plaga. Por tanto, se propone como alternativa ecológicamente viable para disminuir los impactos negativos generados por el uso indiscriminado de agroquímicos, y contribuir al cuidado del ambiente y al bienestar de los productores.

En la región Altos Tsotsil-Tseltal de Chiapas se han evaluado cepas de *B. bassiana*, nativas de la misma región, sobre larvas de “gallina ciega” en condiciones de laboratorio, invernadero y semicampo, con resultados promisorios. Sin embargo, no se ha evaluado la efectividad de las cepas de *B. bassiana* provenientes de otros lugares, así como tampoco de las formulaciones de productos comerciales.

En esta investigación se propuso aportar conocimiento acerca de la patogenicidad (capacidad para producir y desarrollar una enfermedad) y la agresividad (Tiempo Letal Medio,  $TL_{50}$ ) de dos cepas de *B. bassiana* nativas de la región Altos Tsotsil-Tseltal, una de Brasil (Bb15) y una comercial (BeaTron®), sobre el segundo estadio larval de tres especies rizófagas de “gallina ciega” en condiciones de laboratorio. Las cepas del hongo se evaluaron contra las larvas de segundo estadio debido a que presentan baja mortalidad natural en comparación con las de primer estadio cuando son criadas en laboratorio, lo que permite aumentar la confiabilidad de la patogenicidad del hongo. Resultados que ayudarán a comprender la importancia de los hongos entomopatógenos nativos y los que provienen de otros ambientes para el manejo de la plaga “gallina ciega” en la región Altos Tsotsil-Tseltal de Chiapas. Con énfasis en señalar si las cepas comerciales resultan las más ventajosas.

#### IV. Pregunta de investigación

- ¿La patogenicidad y el Tiempo Letal Medio (TL<sub>50</sub>) de las cepas nativas de *Beauveria bassiana* de la región Altos Tsotsil-Tseltal serán más eficaces que la de Brasil (Bb15) y que la comercial BeaTron® para la regulación de larvas rizófagas de “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae)?

#### V. Hipótesis

- Si la efectividad de una cepa de hongo entomopatógeno se mide por su patogenicidad y TL<sub>50</sub>, la cepa comercial BeaTron® ofrece serlo, entonces la más eficiente para la regulación de larvas de “gallina ciega” superará en patogenicidad y TL<sub>50</sub> a las demás cepas.

#### VI. Objetivo

- Evaluar la patogenicidad y el Tiempo Letal Medio (TL<sub>50</sub>) de dos cepas nativas de *Beauveria bassiana* de la región Altos Tsotsil-Tseltal, una cepa Brasileña (Bb15) y una comercial (BeaTron®) sobre el segundo estadio larval de *Phyllophaga ravidia*, *Phyllophaga obsoleta* y *Phyllophaga tumulosa* de la región Altos Tsotsil-Tseltal de Chiapas.

## VII. Métodos

La investigación se realizó en el laboratorio de Bioensayos de El Colegio de la Frontera Sur, ubicado en el municipio de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México a 2,135 m de altura, bajo condiciones de  $21.2 \pm 1$  °C y  $59.1 \pm 6$  % de humedad relativa.

### 7.1 Procedencia de las larvas de “gallina ciega”

Adultos de “gallina ciega” se recolectaron manualmente al inicio de la temporada de lluvias (abril de 2018) entre las 19:30 y 21:30 h en sitios cercanos a las parcelas agrícolas y alumbrado público de los municipios Amatenango del Valle y Teopisca, de la región Altos Tsolsil-Tseltal de Chiapas. Para ello, se utilizaron botes de plástico boca ancha de 2 kg de capacidad con 1.2 kg de suelo húmedo desinfectado por solarización (Katan 1981), etiquetas, lámpara de mano, ligas y tela de organza para cubrir los botes y evitar que los escarabajos se escaparan.

Los adultos recolectados se trasladaron al laboratorio, se identificaron las especies con base en su morfología (longitud del cuerpo, color de élitros y abdomen, forma y largo de antenas, disposición de sedas) y se les determinó el sexo; para el género *Phyllophaga* los machos tienen una concavidad en la parte ventral del abdomen y antenas más grandes, en las hembras la parte ventral del abdomen es lisa (Morón 1986). Se recolectaron 824 hembras y 263 machos de *P. ravidia*, 548 hembras y 390 machos de *P. obsoleta*, 419 hembras y 173 machos de *P. tumulosa*, 210 hembras y 211 machos de *P. testaceipennis*, 490 hembras y 364 machos de *P. tenuipilis*, 65 hembras y 122 machos de *P. menetriesi*.

Para obtener oviposiciones por especie,  $25 \pm 5$  hembras con su proporción respectiva de machos se colocaron en botes de plástico boca ancha de 2 kg de capacidad con 1.2 kg de suelo húmedo desinfectado por solarización y se cubrieron con tela de organza; *P. menetriesi* se puso en proporción 1:1. Los adultos se alimentaron con hojas frescas de su hospedero cada tres días hasta que murieron; *P. ravidia* con *Quercus crispipilis* (Fagales: Fagaceae), *P. tumulosa* con *Phaseolus coccineus* (Fabales: Fabaceae), *P. obsoleta*, *P. tenuipilis*, *P. menetriesi* y *P. testaceipennis* con *Alnus acuminata* (Fagales: Betulaceae) (Aragón et al. 2005). A cada recipiente se le agregaron 10-15 ml de agua

una vez por semana para mantener la humedad del suelo. Los adultos se retiraron de los recipientes cuando murieron.

Para estimar la oviposición, número de larvas L1 y L2 por especie, se contó el número de ejemplares de cinco botes, y se calcularon sus proporciones (Vázquez-López et al. 2010). Las especies *P. ravidia*, *P. obsoleta* y *P. tumulosa* tuvieron oviposiciones, L1 y L2 superiores a *P. testaceipennis*, *P. tenuipilis* y *P. menetriesi* (Tabla 1).

Tabla 1. Proporciones de huevos, larvas de primer estadio (L1) y larvas de segundo estadio (L2) de cada una de las especies de “gallina ciega” en cautiverio.

Especie	oviposición	L1	L2
<i>P. ravidia</i>	9563	6123	4930
<i>P. obsoleta</i>	2098	1652	1083
<i>P. tumulosa</i>	1398	1144	847
<i>P. testaceipennis</i>	299	204	170
<i>P. tenuipilis</i>	448	300	208
<i>P. menetriesi</i>	20	15	11

Las larvas de primer estadio (L1) se conservaron en los recipientes de oviposición con suelo húmedo, se les proporcionaron trozos de zanahoria fresca como alimento cada semana, eliminando la zanahoria anterior. Se esperó a que se llegara al número apropiado de larvas de segundo estadio (L2) para contar con el número suficiente para las repeticiones del bioensayo.

Los números adecuados de L2 para el bioensayo se obtuvieron de las especies rizófagas *P. ravidia*, *P. obsoleta* y la rizófaga facultativa *P. tumulosa*, a finales de junio de 2018. En las especies *P. tenuipilis*, *P. menetriesi* y *P. testaceipennis* las oviposiciones fueron bajas, lo que impidió su evaluación en este trabajo. Para el bioensayo se utilizaron larvas de segundo estadio debido a que presentan mortalidad natural baja (8 %) en comparación con la de primer estadio (26.6 %) cuando son criadas en laboratorio (Vázquez-López et al. 2010).

## 7.2 Obtención de las cepas de *Beauveria bassiana*

Las dos cepas nativas se aislaron de larvas de tercer estadio (L3) de la especie rizófaga *P. obsoleta* infectadas en una milpa del municipio de Chanal, Chiapas. Para obtener larvas infectadas con el hongo, en octubre de 2017, 350 larvas de “gallina ciega” se recolectaron de las raíces de las plantas de maíz siguiendo la técnica de Berlanga et al. (2016). Cada larva se colocó individualmente en un recipiente de plástico con tapa (perforada) con 40 g de suelo de la misma parcela. Se trasladaron al laboratorio para su identificación y se mantuvo en observación hasta la presencia de conidias del hongo. Se les mantuvo con alimento (trozos de zanahoria fresca) y humedad suficiente del suelo. Las larvas colectadas fueron de las especies rizófagas *P. obsoleta* y *P. ravidia* en proporciones de 97 y 3 %, respectivamente. Sin embargo, el hongo *B. bassiana* se presentó únicamente en la primera especie con 2.8 % de larvas infectadas. Después, se seleccionaron los ejemplares que presentaron mejor desarrollo morfológico y abundante esporulación para aislar el hongo. Cada aislamiento se sembró en tres tubos de ensayo inclinados con medio sólido de Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) el 21 de febrero de 2018 y se almacenaron a 4 °C el 21 de marzo de 2018.

La cepa Brasileña (Bb15) se obtuvo de la colección de hongos entomopatógenos del laboratorio de Control Biológico de Ecosur-Tapachula; la cual se aisló de *Chalcodermus aeneus* (Coleoptera: Curculionidae) y fue traída a México a principios de 1990 y se conservó en Sílica gel a 4 °C. También esta cepa se resembró en tres tubos de ensayo inclinados con ADS el 21 de febrero de 2018, y se almacenaron a 4 °C el 21 de marzo de 2018.

El producto comercial BeaTron® WP (i.a. cepa Abn Bb102,  $1.2 \times 10^{12}$  conidios por dosis de 240 g) se obtuvo en Alternagro S.A. de C.V., Texcoco, Estado de México. Dicha cepa fue desarrollada y formulada por la empresa Plant Health Care, PHC® y tiene certificado orgánico del Instituto de Revisión de Productos Orgánicos (OMRI, por sus siglas en inglés).

### 7.3 Reproducción de las cepas

Un mes antes de los bioensayos, las cepas nativas y la de Brasil mantenidas en refrigeración a 4 °C, se reprodujeron en arroz como sustrato para obtener suficiente cantidad del hongo para el bioensayo.

### 7.4 Concentración y viabilidad (porcentajes de germinación) de conidios

Las concentraciones de conidios de las cepas se estimaron en la cámara de Neubauer un día antes de la inoculación. De cada cepa se pesaron 10 g de arroz con el hongo, se colocaron en un matraz de 250 ml, se agregaron 100 ml de agua destilada y tres gotas de dispersante Folex 20 al 0.1 % (Grupo Ibarquim S.A de C.V., Edo de México, México). La mezcla se agitó con agitadores magnéticos por 10 min y con una pipeta Pasteur se colocó la muestra para contar los conidios. Bajo la misma técnica (10 g de BeaTron®), se trató de obtener la concentración de la cepa comercial pero fue imposible, por lo que se optó por utilizar la concentración recomendada en la etiqueta ( $1.28 \times 10^{12}$  conidios/240 g).

La viabilidad (porcentajes de germinación) de cada cepa se obtuvo a las 24 y 48 h utilizando la metodología empleada por Goettel e Inglis (1997). En la cepa comercial, la viabilidad se estimó por el desarrollo de micelio debido a que no se observaron los conidios pero la superficie del medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) se cubrió con micelio a las 24 h. Los porcentajes de viabilidad obtenidos se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Concentración y viabilidad de las cepas usadas en el bioensayo.

Cepa	Clave	Viabilidad (%)		Concentración (conidios/ml)
		24 h	48 h	
nativa 1	1LPo	99.1	100	$9.1 \times 10^7$
nativa 2	5LPo	95.2	100	$5.7 \times 10^7$
Brasil	Bb15	77.8	100	$1.5 \times 10^8$
Comercial*	BeaTron®	95.0	100	$5.3 \times 10^8$

\* Viabilidad estimada por el desarrollo de micelio y concentración de conidios tomada de la etiqueta

### 7.5 Inoculación de las larvas

Las cepas usadas en este bioensayo se evaluaron a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/ml. Para cada cepa, 150 ml de solución del hongo se prepararon bajo la misma técnica empleada en la concentración de conidios.

Se utilizaron grupos de 25 larvas que pasaron a segundo estadio (L2) de *P. ravidia*, *P. obsoleta* y *P. tumulosa* por cada cepa de *B. bassiana*. Cada larva se colocó individualmente (tres días antes de la inoculación) en recipientes de plástico con tapa (con cuatro perforaciones de 3 mm de diámetro en su centro, dispuestas en forma de cuadrilátero de 2 cm por lado), con 40 g de suelo estéril (primero por solarización y luego en autoclave a 120 °C por 16 min), enseguida se agregaron 5 ml de la solución del hongo en el suelo (simulando su aplicación en campo). El suelo estéril registró pH de 7.4 y textura franco arenosa. Los testigos consistieron de 5 ml de agua destilada estéril más Folex 20 al 1 %. Después de la inoculación las especies larvales de “gallina ciega” se agruparon por tratamiento.

### 7.6 Observaciones

Las observaciones se realizaron dos veces por semana durante un mes (julio 2018), las variables que se registraron fueron larvas vivas o muertas por el hongo (micosadas, síntomas propios de la enfermedad como puntos necróticos o coloración rosada del cuerpo de las larvas) o muertas por otra causa. A las larvas que seguían vivas durante las observaciones, se les proporcionó 2 g de zanahoria fresca desinfectada como alimento, el cual se cambió en cada revisión, y para mantener la humedad se agregaron 2 ml de agua estéril a cada recipiente una vez por semana.

Las larvas muertas se colocaron encima del suelo para promover el crecimiento de micelio y con ello confirmar que murieron por efecto del hongo.

### 7.7 Análisis estadístico.

Para determinar la patogenicidad de las cepas de *B. bassiana* contra larvas de segundo estadio de “gallina ciega”, se usaron los datos de sobrevivencia de larvas. Para estimar las curvas o funciones de supervivencia se usó el método Kaplan-Meier y para calcular el Tiempo Letal Medio (TL<sub>50</sub>) se usó el percentil 0.5 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS 21.0). Los datos de mortalidad se corrigieron mediante la fórmula Abbott

(1925) y para obtener las diferencias entre los tratamientos más patogénicos de cada especie de “gallina ciega” se usó la prueba Kruskal-Wallis (Past 2.17c, Hammer).

## VIII. Resultados

Las cepas difirieron en su patogenicidad sobre la especie *P. ravidia* (Figura 1). La mortalidad de la cepa comercial y la Bb15 fueron de 4 %, en tanto que para las cepas nativa 1 y nativa 2 fueron de 80 y 64 %, respectivamente. En el testigo la mortalidad por causas ajenas al hongo fue de 4 %.

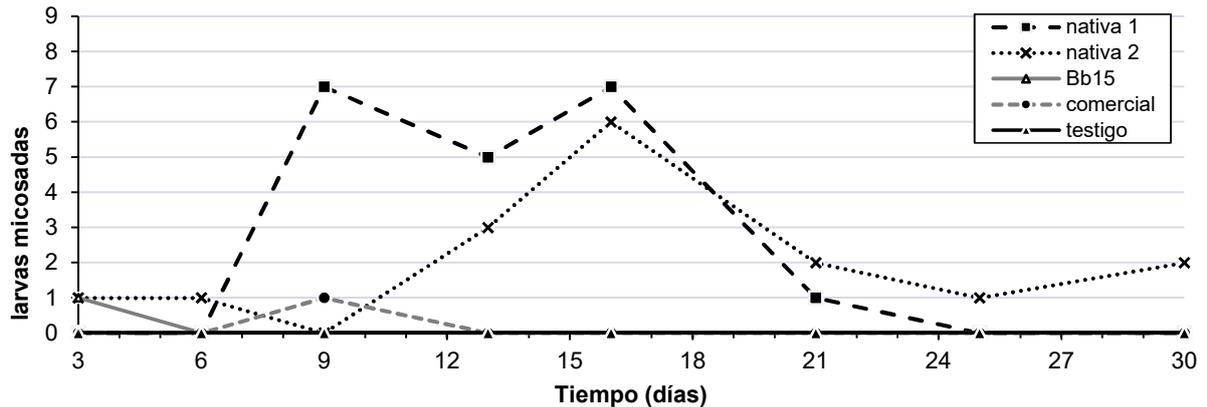


Figura 1. Mortalidad de larvas de la especie *P. ravidia* tratadas con cepas de *B. bassiana*, a la concentración de  $1 \times 10^8$  conidias/ml, en un mes de observación en laboratorio a  $21.2 \pm 1$  °C y  $59.1 \pm 6$  % de humedad relativa.

No hubo diferencia significativa (Kruskal-Wallis,  $F=0.906$ ,  $P>0.05$ ) entre las cepas nativa 1 y nativa 2 respecto a larvas micosadas de *P. ravidia*. Sin embargo, la cepa nativa 1 provocó mayor mortalidad en larvas entre los 9 y 16 días, mientras que la cepa nativa 2 entre los 13 y 21 días.

En la especie *P. obsoleta* las cepas de *B. bassiana* variaron en su patogenicidad (Figura 2). La mortalidad de la cepa comercial fue nula, en tanto que para las cepas Brasil, nativa 1 y nativa 2 fueron de 8, 60 y 52 %, respectivamente. El testigo presentó 20 % de mortalidad por causas ajenas a *B. bassiana*. Para esta especie no se encontró diferencia significativa (Kruskal-Wallis,  $F=0.511$ ,  $P>0.05$ ) entre las cepas nativa 1 y nativa 2. Ambas cepas provocaron la mayor mortalidad de larvas entre los 16 y 25 días.

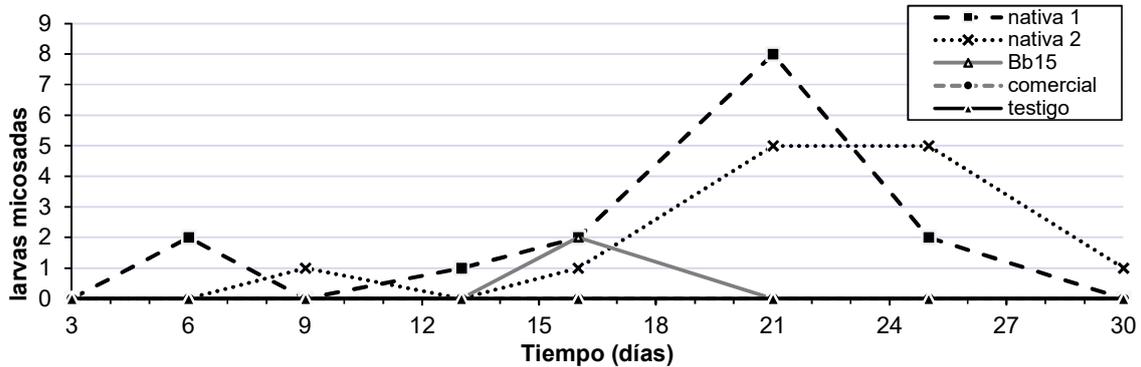


Figura 2. Mortalidad de larvas de la especie *P. obsoleta* tratadas con cepas de *B. bassiana*, a la concentración de  $1 \times 10^8$  conidias/ml, por un mes de observación en laboratorio a  $21.2 \pm 1$  °C y  $59.1 \pm 6$  % de humedad relativa.

En la especie *P. tumulosa* la mortalidad de las cepas nativa 1 y comercial fue nula, mientras que para la nativa 2 y la Bb15 fueron de 12 y 8 %, respectivamente. El testigo presentó 12 % de mortalidad por causas distintas a *B. bassiana*.

Las larvas de *P. ravidia* tratadas con las cepas Bb15 y comercial registraron una sobrevivencia alta (las medianas fueron de 0.76 y 0.84, respectivamente) (Figura 3).

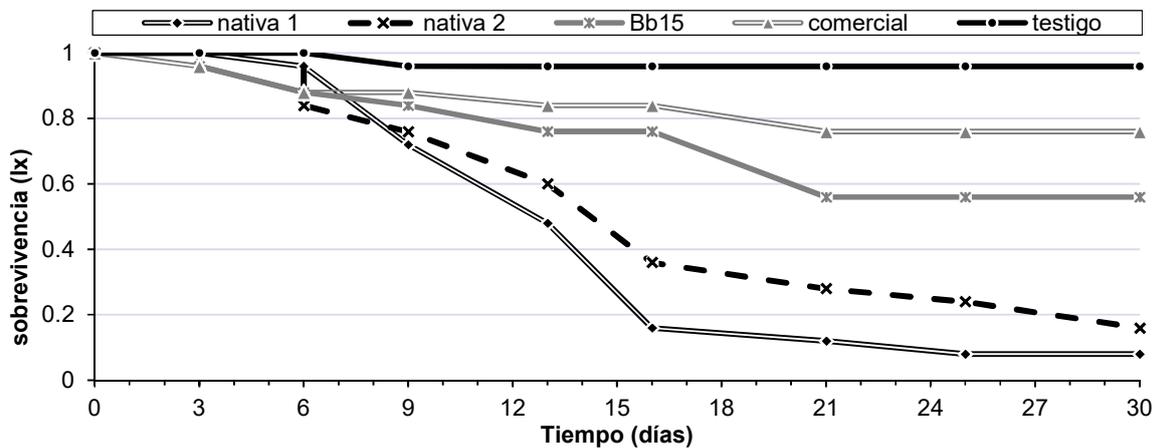


Figura 3. Curvas de sobrevivencia (Kaplan-Meier) de larvas de la especie *P. ravidia* a la concentración de  $1 \times 10^8$  conidias/ml, en un mes de observación en laboratorio a  $21.2 \pm 1$  °C y  $59.1 \pm 6$  % de humedad relativa.

Las larvas de *P. obsoleta* tratadas con las cepas comercial y Bb15 registraron una sobrevivencia alta (las medianas fueron de 0.88 y 0.76, respectivamente) (Figura 4).

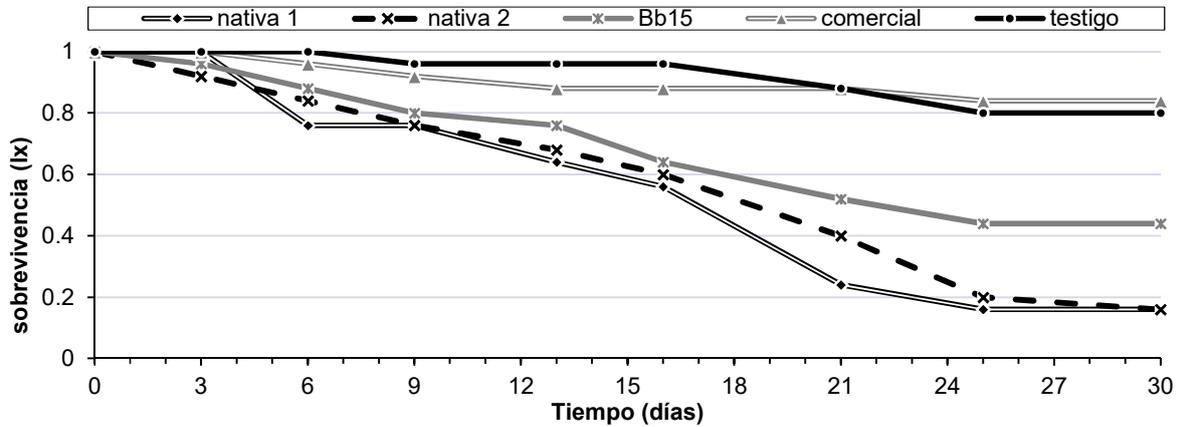


Figura 4. Curvas de sobrevivencia (Kaplan-Meier) de larvas de la especie *P. obsoleta* a la concentración de  $1 \times 10^8$  conidias/ml, en un mes de observación en laboratorio a  $21.2 \pm 1$  °C y  $59.1 \pm 6$  % de humedad relativa.

Las larvas de *P. tumulosa* tratadas con las cepas nativa 1, nativa 2, Bb15 y la comercial presentaron sobrevivencias altas (las medianas fueron de 0.96, 0.92, 0.84 y 0.96, respectivamente) (Figura 5).

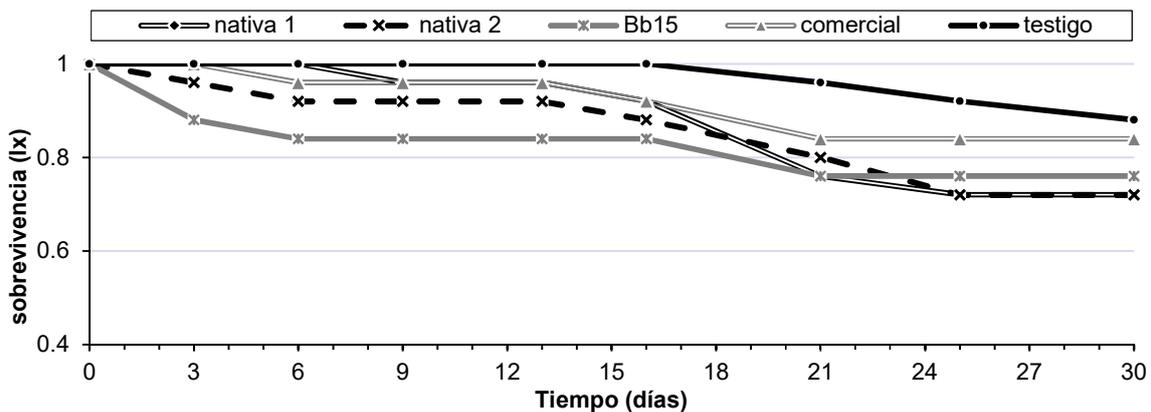


Figura 5. Curvas de sobrevivencia (Kaplan-Meier) de larvas de la especie *P. tumulosa* a la concentración de  $1 \times 10^8$  conidias/ml, en un mes de observación en laboratorio a  $21.2 \pm 1$  °C y  $59.1 \pm 6$  % de humedad relativa.

El Tiempo Letal Medio (TL<sub>50</sub>) para larvas de *P. ravidia* infectadas con *B. bassiana* fue de 13.5 y 21 días para las cepas nativa 1 y nativa 2, respectivamente; de las cepas Bb15 y comercial no se obtuvo el 50 % de mortalidad. Para la especie *P. obsoleta* se obtuvieron los TL<sub>50</sub> de las cepas nativa 1 y nativa 2, los cuales fueron 21 y 25 días, respectivamente; de las demás cepas no se obtuvieron mortalidades superiores a 50 %.

En la especie *P. tumulosa* no se obtuvo el TL<sub>50</sub> para ninguna de las cepas, por no haber provocado más del 50 % de mortalidad.

## IX. Discusión

Los resultados muestran que las cepas nativa 1 y nativa 2 del hongo *Beauveria bassiana* causó una mayor mortalidad sobre larvas L2 de *P. ravidia*, 80 y 64 % respectivamente, presentando la misma tendencia sobre larvas L2 de *P. obsoleta*, con 60 y 52 % de mortalidad. La cepa Bb15 procedente de Brasil y el producto comercial no superaron el 8 % de mortalidad. Estos resultados nos muestran la importancia que presenta la selección de cepas nativas, ya que las cepas 1 y 2 provienen de terrenos agrícolas de la región Altos Tsotsil-Tseltal de Chiapas y fueron aisladas de la especie *P. obsoleta*, por lo que están adaptadas al ambiente de la región montañosa de Chiapas y han tenido mayor interacción con larvas de “gallina ciega” de la región. La habilidad de estas cepas nativas para producir micosis en larvas rizófagas de “gallina ciega” demuestra su potencial para causar epizootias.

Diversos estudios demuestran que los hongos entomopatógenos nativos, aislados del suelo o de insectos hospederos ejercen mayor mortalidad en plagas bajo el mismo hábitat (Nájera-Rincón et al. 2005; Polanco-Mendoza et al. 2010; Vázquez-Martínez et al. 2014). La experiencia con el hongo *Metarhizium anisopliae* en *Phyllophaga* spp., ha mostrado que los aislamientos más virulentos provienen de zonas infestadas con la plaga, aunque no necesariamente de la misma especie (Shanon et al. 1993). Por otro lado hay que tener en cuenta que el uso de microorganismos que coexisten de manera natural con las plagas se perfila como una práctica promisoriosa para su control por su capacidad para causar enfermedades crónicas y muerte, tanto a los estadios larvales como a los adultos de *Phyllophaga* spp., adaptados a los mismos hábitats en que se desarrolla la plaga manteniendo las poblaciones a un nivel bajo (Hidalgo 2001).

La persistencia del patógeno depende de su habilidad para sobrevivir en el ambiente (Van Driesche et al. 2007). Por ello, los hongos entomopatógenos nativos pueden ayudar a mantener en equilibrio las poblaciones de plagas en el suelo; sin embargo, no se descarta la persistencia de hongos entomopatógenos provenientes de otros ambientes.

Por otro lado, las cepas nativa 1 y nativa 2 alcanzaron un Tiempo Letal Medio (TL<sub>50</sub>) de 13.5 y 21 días sobre *P. ravidia* mientras las cepas Bb15 y comercial mostraron una supervivencia alta. En *P. obsoleta* el Tiempo Letal Medio (TL<sub>50</sub>) ocasionadas por las

cepas nativa 1 y nativa 2 fue de 21 y 25 días, mientras los demás tratamientos alcanzaron una alta sobrevivencia de larvas. Velázquez-López et al. (2006) evaluando cepas nativas de *B. bassiana* sobre “gallinas ciegas”, mencionan que las cepas nativas presentaron mayor eficacia al matar en su mayoría en los primeros 15 días a las larvas del tercer estadio larval de las especies *P. ravidia* y *Anomala inconstans*, tanto en cámara húmeda como en suelo estéril. Por lo tanto las cepas nativas también pueden ocasionar una mayor patogenicidad y alcanzar un  $TL_{50}$  en un menor tiempo, debido a que está adaptado al ambiente y al hábitat del hospedero.

Trabajos realizados por Prado-Rebolledo et al. (2014), señalan que al evaluar la patogenicidad de cinco cepas mexicanas de *B. bassiana* contra adultos de la plaga de las camas avícolas *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) bajo condiciones de laboratorio, observaron que la cepa Bb174, aislada de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae), obtuvo el mayor porcentaje de mortalidad (87 %) a la concentración de  $1 \times 10^8$  conidias/ml, a partir de los 6 días post inoculación. Así mismo, Santoro et al. (2008) reportaron la mortalidad de *A. diaperinus*, de 64.4 % y 67.2 % para las cepa CG 71 y CG 152 de *B. bassiana*, respectivamente.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las cepas nativas resultan prometedoras para el control de las especies rizófagas en Los Altos de Chiapas, teniendo en cuenta que en esta región se han registrado densidades de *P. obsoleta* de 37.3 larvas/m<sup>2</sup> (Gómez et al. 2000) y de *P. ravidia* de 12.3 larvas/m<sup>2</sup> (Méndez-Aguilar et al. 2003). También se debe tener en cuenta el desarrollo larval de *Phyllophaga* y sus hábitos alimenticios para establecer estrategias de control de la plaga. En las cepas del hongo entomopatógeno *B. bassiana* se deben considerar aspectos de pureza, viabilidad, concentración de conidias, su almacenamiento, así como el cultivo y las prácticas de manejo de los terrenos agrícolas donde se pretenda utilizar para favorecer su establecimiento y efectividad contra las plagas (Monzón 2001; Montesinos et al. 2015).

El estado larval de la “gallina ciega” se divide en tres estadios: El primero (L1) dura de 20 a 60 días, se alimentan de materia orgánica en descomposición y de raíces pequeñas. El segundo estadio (L2) dura de 30 a 60 días. En esta etapa la larva incrementa sus necesidades alimentarias para aumentar de 5 a 7 veces su biomasa y el daño a las raíces

de las plantas comienza a notarse. El tercer estadio (L3) es la fase más extensa y voraz del complejo, ya que puede durar de 4 a 8 meses en las zonas tropicales y de 7 a 14 meses en zonas templadas (Ramírez-Salinas et al. 1999; Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez 2000). De acuerdo a los resultados obtenidos, el Tiempo Letal Medio (TL<sub>50</sub>) de las cepas nativas en larvas L2 de *P. ravidia* fue de 13.5-21 días y para *P. obsoleta* de 21-25 días y la mortalidad fue en aumento conforme pasaron los días, por lo tanto impide que un gran número de la especie logre sobrevivir y desarrollar a L3, la etapa más voraz y dañina en los cultivos.

Se esperaba que la cepa comercial tuviera mayor patogenicidad y mayor mortalidad en Tiempo Letal Medio (TL<sub>50</sub>), debido a que es un producto con certificación orgánica que ha sido elaborado bajo estándares de calidad requeridos para su comercialización internacional. Sin embargo como se mencionó anteriormente las cepas nativas tuvieron mayor patogenicidad y virulencia (TL<sub>50</sub>) en plagas de la misma región, lo que concuerda con Feng et al. (1994), ya que mencionan que en general las cepas de *B. bassiana* se inclinan a mostrar gran virulencia sobre el hospedero original o especies estrechamente relacionadas con los hospederos originales. Por ello, es necesario aislar cepas nativas de la región agrícola en la que se pretenden emplear, y evaluar su patogenicidad y TL<sub>50</sub> para seleccionar las más efectivas para el manejo de las especies rizófagas de la “gallina ciega” (Zimmermann, 2007; Dunford y Kaufman, 2006).

Es posible que tanto el producto comercial como la cepa brasileña sean eficaces con otros hospederos o con hospederos del lugar de origen. Como ejemplo podemos mencionar que la cepa brasileña Bb15, aislada de *Chalcodermus aeneus* (Coleoptera: Curculionidae), ha tenido comportamientos variables dependiendo del hospedero, ya que cuando fue evaluada contra la chinche *Pachycoris torridus*, presentó un porcentaje de mortalidad en adultos de 62.5 %, cercana a la de mayor patogenicidad (Chávez et al. 2016), mientras que cuando se evaluó contra el picudo de la soya, *Rhyssomatus nigerrimus*, estuvo entre las cinco mejores cepas, con un porcentaje de mortalidad de 94 % (Mejía-Ortíz et al. 2016), sin embargo, en el presente trabajo, la misma cepa presentó una mortalidad baja, no alcanzando el 50 % de mortalidad en larvas de “gallina ciega”.

Se necesitan realizar más estudios con las formulaciones de productos entomopatógenos para encontrar aquellas idóneas para cada región de acuerdo a las condiciones ambientales que se tengan y realizar pruebas de viabilidad, patogenicidad y virulencia para determinadas plagas agrícolas en relación al hábitat de origen. El uso comercial de entomopatógenos fúngicos para controlar insectos generalmente se practica utilizando el enfoque de control biológico por inundación donde se crea un ambiente inundado con altas concentraciones de propágulos de hongos infecciosos (Eileberg et al. 2001). Los productos comerciales de preparaciones conidiales de *B. bassiana* o *M. anisopliae*, presumiblemente utilizan procesos de producción de fermentación de sustrato sólido (Jaronski 1997). Sin embargo, existen condiciones ecológicas y ambientales en las que el uso de conidias puede no ser la mejor opción para el control de insectos en entornos agrícolas o urbanos (Jackson et al., 2010). Las estrategias de producción y formulación de potenciales micosecticidas deben considerar los requisitos y limitaciones ambientales y ecológicos (Vega et al. 2009).

El control de plagas de insectos con hongos entomopatógenos fúngicos requiere una comprensión básica significativa de las interacciones entre el insecto objetivo, el entomopatógeno fúngico y el medio ambiente, la comprensión de las restricciones bióticas y abióticas críticas para cada insecto plaga-ambiente en particular guiará la selección y el desarrollo de estos agentes para la producción de propágulos fúngicos eficaces y el desarrollo de formulaciones adaptadas para superar las limitaciones ambientales específicas, lo que conducirá a la disponibilidad de bioinsecticidas confiables basados en entomopatógenos para el control de insectos en una amplia variedad de hábitats (Jackson et al. 2010). Comprender la ecología de los hongos hipocreales en sus hábitats favoritos y sus relaciones con los hospedadores por encima y por debajo del suelo sería un gran paso adelante para aprovechar su potencial (Bruck 2010; Cory y Ericsson 2010). Es necesario seguir realizando evaluaciones en laboratorio y en campo de los productos comerciales para determinar si pueden desarrollarse en determinados ambientes que permitan su propagación y control de insectos plaga.

Las cepas evaluadas no ocasionaron mortalidad severa en larvas de *P. tumulosa*. En general, las larvas presentaron sobrevivencias altas en todos los tratamientos. Es

probable que esta especie tenga resistencia a *B. bassiana* de manera natural. También es probable que las cepas presenten una cierta especificidad del hospedero del cual fueron aislados, debido a que las dos cepas de este trabajo fueron aisladas de *P. obsoleta*. La patogenicidad sobre el hospedero depende de una relación entre la habilidad del hongo para penetrar la cutícula y la fortaleza del sistema inmunológico del insecto para prevenir el desarrollo del hongo (Hajek y St. Leger 1994). La especie *P. tumulosa* es facultativa, por lo que se puede alimentar de materia orgánica del suelo, por ello, es importante tener un buen manejo en los agroecosistemas, manteniendo una diversidad de plantas o rastrojo que permitan la alimentación de las especies facultativas sin que ocasionen daños al maíz-cultivo principal, ya que en su ausencia (monocultivos) ocasionará severos daños al cultivo (Castro-Ramírez 2004) Esta especie se considera plaga de menor importancia, no obstante, llega a producir daño considerable cuando el suelo es pobre en materia orgánica (Castro-Ramírez et al. 2004). Velázquez-López et al. (2006) demostraron que al aplicar los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* al suelo obtuvieron bajo porcentaje de mortalidad sobre larvas rizófagas de “gallina ciega” sin embargo el tratamiento con composta resultó una buena práctica para el manejo de las especies *Phyllophaga ravidia*, *P. obsoleta* y *P. tenuipilis*, al presentar altas mortalidades por hongos entomopatógenos, pero principalmente, por presentar un buen desarrollo de las plantas, al compensar y contrarrestar el ataque y daño ocasionado por dichas plagas.

Para aplicar *B. bassiana* en campo, es necesario considerar la presencia de los primeros estadios de las especies de *Phyllophaga* en las parcelas, tomando en cuenta las fechas de emergencia de adultos (Polanco-Mendoza et al. 2010), y tener en cuenta la temperatura y humedad para la aplicación de los hongos entomopatógenos. Las aplicaciones en campo deben hacerse por las mañanas antes del alba o por las tardes después del ocaso. La humedad, temperatura y radiación solar afectan a las poblaciones de insectos y la inestabilidad de los entomopatógenos (Carruthers et al. 1991).

Durante el proceso de desarrollo del hongo sobre las larvas, se pudieron observar manchas de color negro, así como el cambio de color de la larva a rosado, hasta el desarrollo total de *B. bassiana* tornándose de color blanco y de aspecto algodonoso en

las larvas, las observaciones realizadas fueron a través del estereoscopio, lo que concuerda con las etapas de infestación mencionadas por algunos autores (Lecuona et al. 1996; Hajek 1997; Tamayo 1998; Hidalgo 2001; Hesketh et al. 2009)

Las cepas nativas probadas en nuestro experimento podrían ser efectivas en campo y propagarse en las poblaciones de “gallina ciega” pero hacen falta más estudios que confirmen su efectividad sobre plagas específicas, así como los métodos de aplicación en campo y la evaluación en organismos no objetivo. Se sabe que el comportamiento de los insectos puede influir en el contacto y adhesión de las estructuras infectivas de los hongos entomopatógenos, ya que durante su metamorfosis, aumentan o disminuyen la probabilidad de infección (Cory y Hoover 2006). La transmisión es un parámetro clave que determina la tasa de propagación de hongos entomopatógenos dentro de las poblaciones de huéspedes y, por lo tanto, el potencial de patógenos para su uso como agente de control microbiano (Steinkraus 2006). La transmisión horizontal entre individuos de la misma especie (autodiseminación) puede ocurrir a través del contacto directo entre individuos contaminados y no contaminados o indirectamente a través de conidios que se han depositado en el sustrato (Quesada-Moraga et al. 2008).

Actualmente *B. bassiana* sigue siendo una de las alternativas importantes para el control de diversas plagas en cultivos orgánicos o de Manejo Integrado de Plagas. El hongo *B. bassiana* tiene ventajas sobre los plaguicidas convencionales, pues persiste en la población de insectos que infecta, reduce su longevidad y ocasiona altas tasas de mortalidad en larvas y adultos (Prado-Rebolledo et al. 2014). Por lo cual, promete ser uno de los agentes más eficaces y con menores consecuencias para las aves y el ambiente cuando se usa en el control biológico de artrópodos; pues se propaga con facilidad, por su capacidad para penetrar la cutícula en una amplia variedad de insectos (Da Silva et al. 2006; Zimmermann 2007).

Las cepas nativas que resultaron ser eficaces en el control de *P. ravidia* y *P. obsoleta*, también presentaron un  $TL_{50}$  en un corto período de tiempo. De acuerdo a nuestros resultados, el hongo *B. bassiana* se podría aplicar en campo cuando las larvas estén en L1 o L2, para esto se debe tener en cuenta la emergencia de los adultos en las primeras

lluvias, para determinar el momento de aplicar los tratamientos, así como las condiciones ambientales.

## X. Conclusiones

- Las cepas nativas 1 y 2 del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* fueron las más patogénicas para la especie *Phyllophaga ravid*a con mortalidades de 80 y 64 % y TL<sub>50</sub> de 13.5 y 21 días, respectivamente. También fueron las más patogénicas para la especie *P. obsoleta* con mortalidades de 60 y 52 % y TL<sub>50</sub> de 21 y 25 días, respectivamente. Para la especie *P. tumulosa*, ninguna de las cepas fueron patogénicas.
- Las cepas nativas *B. bassiana* de la región Altos Tsotsil-Tseltal fueron más patogénicas y agresivas, que la cepa de Brasil y el producto comercial, sobre las larvas rizófagas *P. ravid*a y *P. obsoleta*.

## XI. Literatura citada

- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomologist* 18: 265-267.
- Aragón A, Morón M, López-Olguín J, Cervantes-Peredo L. 2005. Ciclo de vida y conducta de adultos de cinco especies de *Phyllophaga* Harris, 1827 (Coleoptera: Melolonthidae; Melolonthidae). *Acta Zoológica Mexicana* 21(2): 87-99.
- Arredondo H.C. y Rodríguez-del-Bosque L.A. 2008. Casos de Control Biológico en México. México: Mundi Prensa. 423 p.
- Barrera J. F., J. Gómez-Ruiz, A. Castillo-Vera, E. López, J. Herrera-Muñoz y G. González. 2008. Broca del café (*Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae). En: Arredondo-Bernal L. A. y Rodríguez-del-Bosque L. A. eds. Casos de Control Biológico en México. SENASICA, DGSV. SMCC. Mundi Prensa, México, p. 101-120.
- Barrera J. F., J. Toledo y F. Infante. 2012. Manejo Integrado de Plagas: conceptos y estrategias. En: Toledo J., Infante F. eds. Manejo Integrado de Plagas. México: Trillas, p. 13-33.
- Barzman M, Bàrberi P, Birch AN, Boonekamp P, Dachbrodt-Saaydeh S, Graf B, Hommel B, Jensen JE, Kiss J, Kudsk P, et al. 2015. Eight principles of Integrated Pest Management. *Agronomy for Sustainable Development* 35(4): 1199-1215.
- Berlanga A. M., M. A. Ayala, R. Montesinos y J. C. Rodríguez. 2016. Manual de Exploracion para la Colecta de Hongos Entomopatógenos. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. SAGARPA, SENASICA, México, 55 p.
- Bernardino HU, Mariaca Méndez R, Nazar Beutelspacher A, Álvarez Solís JD, Torres Dosal A, Herrera Portugal C. 2017. Percepciones del uso de plaguicidas entre productores de tres sistemas agrícolas en Los Altos de Chiapas , México. *Acta Universitaria* 27(4): 26-41.
- Bruck DJ. 2010. Fungal entomopathogens in the rhizosphere. *BioControl* 55(1): 103-112.

- Carruthers R.I., A.J. Sawyer y K. Hural. 1991. Use of fungal pathogens for biological control of insect pests. En: National Research Council. Sustainable Agriculture Research and Education in the Field. Washington DC, E.U.A: The National Academies Press, p. 336-372.
- Castro-Ramírez, A. E. 2004. Diversidad del complejo “gallina ciega” (Coleoptera) y su impacto al cultivo del maíz en un gradiente ambiental de Los Altos de Chiapas, México. Tesis doctoral en ciencias agropecuarias. Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia, México. 177 p.
- Castro-Ramírez A. E. 2006. Alternativas biotecnológicas para el manejo de la plaga edáfica “gallina ciega” (Coleoptera) en Los Altos de Chiapas. Informe Técnico Final del proyecto CHIS030621. Fondos Mixtos CONACYT- Gobierno del Estado de Chiapas (COCYTECH). México. 30 p.
- Castro-Ramírez A. E., C. Ramírez-Salinas y C. Pacheco-Flores. 2004. Guía ilustrada sobre “gallina ciega” en la región Altos de Chiapas. El Colegio de la Frontera Sur. México. 48 p.
- Castro-Ramírez AE, Delfín-González H, Parra-Tabla V, Morón MA. 2005. Fauna de melolóntidos (Coleoptera: Scarabaeoidea) asociados al maíz (*Zea mays* L.) en los Altos de Chiapas, México. Folia Entomológica Mexicana 44: 339-365.
- Castro-Ramírez A. E. y C. Ramírez-Salinas. 2001. Enemigos naturales de *Phyllophaga obsoleta* en San Cristóbal de Las Casas, Chiapas. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de Entomología y XXVIII Congreso Nacional de Fitopatología. ITESM. Querétaro, México, E-103 pp.
- Castro-Ramírez A. E. y C. Ramírez-Salinas. 2010. “Gallinas ciegas” en Chiapas. En: Rodríguez-del-Bosque L. A., Morón M. A. eds. Plagas del suelo. México: COLPOS, INIFAP, UACH y Mundi-Prensa, p. 313-336.
- CEIEG. 2019. Comité Estatal de Información Estadística y Geográfica de Chiapas. Gobierno del Estado de Chiapas. <http://www.ceieg.chiapas.gob.mx/home/mapas-regionales/> (consultado el 11 de noviembre de 2019).

- Chávez BJ, Rojas JC, Barrera JF, Gómez J. 2016. Evaluación de la Patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Pachycoris torridus* en Laboratorio. *Southwestern Entomologist* 41(3): 783-790.
- Cherman M, Morón M. 2014. Validación de la familia Melolonthidae Leach, 1819 (Coleoptera: Scarabaeoidea). *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.). 30(1): 201-220.
- Cory JS, Hoover K. 2006. Plant-mediated effects in insect pathogen interactions. *Trends in Ecology and Evolution* 21: 278-286.
- Cory JS, Ericsson JD. 2010. Fungal entomopathogens in a tritrophic context. *BioControl* 55: 75-88.
- Da Silva AS, Quintal APN, Monteiro SG, Doyle RL, Santurio IJM, Bittencourt VREP. 2006. "Ação do fungo *Beauveria bassiana*, isolado 986, sobre o ciclo biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratório". *Ciencia Rural* 36 (6): s/n.
- De la Rosa W, López FL, Liedo P. 2002. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican fruit fly (Dipt., Tephritidae) under laboratory conditions. *J. Econ. Entomol.* 95: 36-43.
- De Oliveira DGP, Pinto FGS, Barcellos FG, Alves LFA, Hungria M. 2011. "Variabilidade genética de isolados de *Beauveria* spp. e virulência ao cascudinho *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae)". *Ciências Agrárias* 32(1): 147-156.
- Dunford J.C. y P. E. Kaufman. 2006. "Lesser Mealworm, Litter Beetle, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae)". Department of Entomology and Nematology, University of Florida. 11 p.
- Eilenberg J, Hajek A, Lomer C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46: 387-400.
- Feng MG, Propawsky TJ, Khachatourians GG. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology* 4: 3-34.

- Flores AG, De la Rosa W, Rojas JC, Castro-Ramírez AE. 2002. Evaluation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Mitosporic) against species of the “white grub complex” in the South of Mexico. *Southwestern Entomologist* 27: 73-83.
- Goettel M. e Inglis G. 1997. ‘Fungi: Hyphomycetes’. En: Lacey L. ed. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. San Diego, CA: Academic Press, p. 221-229.
- Gómez B, Castro A, Junghans C, Ruiz ML, Villalobos J. 2000. Ethnoecology of the white grubs (Coleoptera: Melolonthidae) among the Tzeltal Maya of Chiapas. *Journal of Ethnobiology*. 20(1): 43-59.
- Gómez B, Villalobos FJ, Ruíz L, Castro A. 1999. Observaciones sobre la biología de Melolóntidos (Coleoptera: Scarabaeoidea) en una localidad de Los Altos de Chiapas, México. *Acta Zoológica Mexicana* 78: 173-177.
- Hajek AE, St. Leger RJ. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology* 39: 293-322.
- Hajek A. E. 1997. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. En: Jones J. G. ed. *Advances in microbial ecology*. Vol. 15. New York, EUA: Plenum Press, p 193-249.
- Hernández V., V. M., M. E. Núñez V., J. Ruíz V., M. B. Nájera R. y F. J. Villalobos. 2010. Uso de entomopatógenos. En: Rodríguez-del-Bosque L. A., Morón M. A. eds. *Plagas del Suelo*. México: COLPOS, INIFAP, UACH, Mundi-Prensa. p. 169-186.
- Hesketh H, Roy HE, Heilenberg J, Pell JK, Hails RS. 2009. Challenges in modelling complexity of entomopathogens in semi-natural populations of insects. *BioControl* 55: 55-73.
- Hidalgo E. 2001. Uso de microorganismos para el control de *Phyllophaga* spp. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)-CATIE* 60 (37): 1-4.
- Ibarra JE, Castro MC, Galindo E, Patiño M, Serrano L, García R, Carrillo JA, Pereyra-Alfárez B, Alcázar-Pizaña A, Luna-Olvera H, et al. 2006. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48(2): 113-120.

- Jackson TA. 2003. Environmental safety of inundative application of a naturally occurring biocontrol agent, *Serratia entomophila*. En: Hokkanen H. M. T., Hajek A. E. eds. Environmental Impacts of Microbial Insecticides. Progress in Biological Control, vol 1. The Netherlands: Springer, p. 169-176.
- Jackson MA, McGuiarre MR, Lacey LA, Wraight SP. 1997. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. Mycological Research 101(1): 35-41.
- Jackson MA, Dunlap CA, Jaronski ST. 2010. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. BioControl 55: 129-145.
- Jaronski ST. 1997. New paradigms in formulating mycoinsecticides. En: Goss G. R., Hopkinson M. J., Collins H. M. eds. Pesticide formulations and applications systems: 17<sup>th</sup> Volume. American Society Testing Materials International, p. 99-112.
- Katan J. 1981. Solar heating (solarization) of soil for control soilborne pest. Annual Review of Phytopathology 19: 211-236.
- Kaur H. y Gang H. 2014. Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies. En: Soloneski S. ed. Pesticides: Toxic Aspects. IntechOpen, p. 187-230.
- Keskin Y, Karabörklü S, Altin N. 2019. Efficiency of Some Native Entomopathogenic Fungi against *Tenebrio molitor* L. (Col.: Tenebrionidae) Larvae in Soil Condition. *Turkish Journal of Applied Sciences and Technology* 2(1): 26-31.
- Kim KH, Kabir E, Jahan SA. 2017. Exposure to pesticides and the associated human health effects. Science of the Total Environment 575: 525-535.
- Kogan M. 1998. Integrated Pest Management: Historical Perspectives and Contemporary Developments. Annual Review of Entomology 43(1): 243-270.
- Lecuona R., B. Papierok y G. Riba. 1996. Hongos entomopatógenos. En: Lecuona R. ed. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Talleres Gráficos Mariano Mas. Argentina, p. 35-60.

- Mejía-Ortíz SA, Gómez-Ruiz J, López-Guillén G, Cruz-López L, Valle-Mora J. 2016. Evaluation of the Pathogenicity of Isolates of *Beauveria bassiana* Against *Rhyssomatus nigerrimus*. *Southwestern Entomologist* 41(1): 41-50.
- Méndez-Aguilar M. J., A. E. Castro-Ramírez, C. Ramírez-Salinas y M. A López-Anaya. 2003. Preferencias de hábitat de las especies de "gallina ciega" (Melolonthidae) en parcelas agrícolas de Oxchuc, Chiapas. En: Aragón A. G., Morón M. A. y Marín J. A. comp. Estudios sobre coleópteros del suelo en América. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México, p. 149-165.
- Méndez-Aguilar MJ, Castro-Ramírez AE. 2008. Aspectos biológicos y de comportamiento de hembras y larvas de melolóntidos (Coleoptera) en condiciones de laboratorio. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.) 24: 243-245.
- Méndez-Aguilar MJ, Castro-Ramírez AE, Rojas JC, Huerta-Lwanga. 2008. Respuesta olfativa y alimentaria de larvas de *Phyllophaga* (Melolonthidae) a raíces de *Cynodon dactylon*, *Zea mays*, *Phaseolus vulgaris* y *Physalis philadelphica*. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.) 24: 115-128.
- Méndez P., C. G., A. E. Castro-Ramírez, C. Pacheco F. y C. Ramírez S. 2006. Evaluación del daño que causan las larvas de Melolóntidos (Coleoptera) asociadas al maíz en Aguacatenango, Chiapas. En: Castro-Ramírez A. E., Morón M. A., Aragón A. eds. Diversidad, Importancia y Manejo de Escarabajos Edafícolas. México: ECOSUR, Fundación PRODUCE Chiapas y BUAP, p. 147-162.
- Montesinos M. R., M. A. Ayala y A. M. Berlanga. 2015. Manual para la conservación y mantenimiento de Hongos Entomopatógenos. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. SAGARPA, SENASICA, México, 59 p.
- Monzón A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas* (Costa Rica) 63: 95-103.
- Morón M. A. 1986. El género *Phyllophaga* en México (Insecta: Coleoptera). Morfología, distribución y sistemática supraespecífica. México: INECOL A.C. 342 p.

- Morón M. A. 2010. Diversidad y distribución del complejo “gallina ciega” (Coleoptera: Scarabaeoidea). En Rodríguez-del-Bosque L. A., Morón M. A. eds. Plagas del Suelo. México: COLPOS, INIFAP, UACH y Mundi-Prensa, p. 41-63.
- Morón M. A. y L. A. Rodríguez-del-Bosque. 2010. Importancia, historia y retos. En: Rodríguez-del-Bosque L. A., Morón M. A. eds. Plagas del Suelo. México: COLPOS, INIFAP, UACH y Mundi-Prensa, p. 3-17.
- Morón M. A., B. C. Ratcliffe y C. Deloya. 1997. Atlas de los Escarabajos de México (Coleoptera: Lamellicornia). Vol. I. Familia Melolonthidae (subfamilias Rutelinae, Dynastinae, Cetoniinae, Trichiidae, Valginae y Melolonthinae). México: CONABIO y SME A.C. 280 p.
- Morón MA, Nogueira G, Rojas-Gómez CV, Arce-Pérez R. 2014. Biodiversidad de Melolonthidae (Coleoptera) en México. Revista Mexicana de Biodiversidad 85:298–302.
- Murguido CA, Elizondo AI. 2007. El manejo integrado de plagas de insectos en Cuba. Fitosanidad 11(3): 23-28.
- Nájera MB, García M, Crocker RL, Hernández-Velázquez V, Rodríguez-del-Bosque LA. 2005. Virulencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, nativos del occidente de México, contra larvas de tercer estadio de *Phyllophaga crinita* (Coleoptera: Melolonthidae) bajo condiciones de laboratorio. Fitosanidad 9(1): 33-36.
- Nájera R., M. B., T. A. Jackson y J. D. López M. 2006. Hongos Entomopatógenos para el control de *Phyllophaga vetula* (Horn) (Coleoptera: Melolonthidae) en cultivos de maíz en Zacapu, Michoacán, México. En: Castro-Ramírez A. E., Morón M. A, Aragón A. eds. Diversidad, Importancia y Manejo de Escarabajos Edafícola. México: ECOSUR, Fundación PRODUCE Chiapas A.C. y BUAP, p. 241-262.
- Pacheco-Flores C, Castro-Ramírez AE, Morón MA, Gómez B. 2008. Fauna de escarabajos melolontidos (Coleoptera: Scarabaeoidea) en el Municipio de Villaflores, Chiapas, México. Acta Zoológica Mexicana (n.s.) 24: 139-168.
- Pell JK, Hannam JJ, Steinkraus DC. 2010. Conservation biological control using fungal entomopathogens. BioControl 55:187-198.

- Polanco-Mendoza J. C., A. E. Castro-Ramírez y C. Ramírez-Salinas. 2010. Patogenicidad de aislamientos nativos de hongos entomopatógenos sobre el complejo “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae) de Los Altos de Chiapas, México. En: Rodríguez-del-Bosque L. A., Morón M. A. eds. Ecología y control de Plagas Edafícolas. México: INECOL A.C., p. 266-282.
- Prado-Rebolledo O, Lezama-Gutiérrez R, Contreras-Benicio D, Contreras-Lara D, Morales-Barrera EJ, Tellez G. 2014. Patogenicidad del hongo *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) en adultos del escarabajo *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) de casetas avícolas del estado de Colima. Revista Iberoamericana de Ciencias 1(1): 87-93.
- Pucheta M, Flores A, Rodríguez S, De la Torre S. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. Interciencia 31(12): 856-860.
- Quesada-Moraga E, Martín-Carballo I, Garrido-Jurado I, Santiago-Alvarez C. 2008. Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Biological Control 47: 115-124.
- Ramírez-Salinas C., H. I. Arredondo y A. E. Castro-Ramírez. 1999. Biología y Comportamiento de *Phyllophaga (Phytalus) obsoleta*, en la región Altos de Chiapas, México. En: Memorias del XXXIV Congreso Nacional de Entomología-Sociedad Mexicana de Entomología, A. C. Aguascalientes, México, p. 177-182.
- Ramírez-Salinas C, Castro-Ramírez AE. 2000. El complejo “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae) en el cultivo de maíz, en El Madronal, municipio de Amatenango del Valle, Chiapas, México. Acta Zoológica Mexicana 79:17-41.
- Ramírez-Salinas C. y A. E. Castro-Ramírez. 2006. Ciclo de vida de dos especies rizófagas de “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae) de Los Altos de Chiapas. En: Castro-Ramírez A. E., Morón M. A., Aragón-García A. eds. Diversidad, Importancia y Manejo de Escarabajos Edafícolas. México: ECOSUR, Fundación PRODUCE Chiapas y BUAP, p. 37-48.
- Ríos F, Romero S. 1982. Importancia de los daños en maíz por insectos del suelo en el estado de Jalisco, México (Coleoptera). Folia Entomológica Mexicana 52:41-60.

- Rodríguez-del-Bosque L. A. 1988. *Phyllophaga crinita* (Burmeister) (Coleoptera: Melolonthidae); historia de una plaga del suelo. (1985-1998). En: Morón M. A. coord. Memorias de la III Mesa Redonda sobre Plagas del Suelo. Michoacán, México: SME A.C, p.53-80.
- Rohde C, Alves LFA, Neves PMOJ, Alves SB, Da Silva ERL, De Almeida JEM. 2006. "Seleção de Isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra o Cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)". Neotropical Entomology 35(2): 231-240.
- Santoro PH, Neves PMOJ, Alexandre TM, Sartori D, Alves LFA, Fungaro MHP. 2008. "Selection of *Beauveria bassiana* isolates to control *Alphitobius diaperinus*". Journal of Invertebrate Pathology 97: 83-90.
- Sarwar M. 2015. The dangers of pesticides associated with public health and preventing of the risks. International Journal of Bioinformatics Research and Applications 1(2): 130-136.
- Shanon P. J., S. M. Smith, E. Hidalgo. 1993. Evaluación en el laboratorio de aislamientos costarricenses y exóticos de *Metarhizium* spp. y *Beauveria* spp. contra larvas de *Phyllophaga* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae). En: Morón M. A. comp. Diversidad y Manejo de plagas subterráneas. Veracruz, México. Sociedad Mexicana de Entomología. Instituto de Ecología, p. 203-215.
- Shapiro I. D. I., J. R. Fuxa, L. A. Lacey, D. W. Onstad and H. K. Kaya. 2005. Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. Journal of Invertebrate Pathology 88(1): 1-7.
- SIAP. 2017. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cierre de la producción agrícola por municipio, Chiapas. <http://www.siap.gob.mx> (consultado el 20 de noviembre de 2017).
- Steinkraus DC. 2006. Factors affecting transmission of fungal pathogens of aphids. Journal of Invertebrate Pathology 92: 125-131.

- Tamayo M. F. 1998. Efectividad de *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* contra la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae) en Tenexpango, Morelos. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México, México. 175 p.
- Van Driesche R., Hoddle M. S. y Center T. D. 2007. Control de Plagas y Malezas por Enemigos Naturales. EUA: USDA, UFS y FHTET. 751 p.
- Vázquez-López F. G., A. E. Castro-Ramírez y C. Ramírez Salinas. 2010. Biología y comportamiento de siete especies de “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae) bajo condiciones de laboratorio. En: Rodríguez-del-Bosque L. A., Morón M. A. eds. Ecología y Control de Plagas Edafícolas. México: INECOL A.C., p. 107-126.
- Vázquez-Martínez MG, Cirerol-Cruz BE, Torres-Estrada JL, Rodríguez-López MH. 2014. Potential for entomopathogenic fungi to control *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of Chagas disease in Mexico. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 47(6): 716-722.
- Vega FE, Goettel MS, Blackwell M, Chandler D, Jackson MA, Keller S, Koike M, Maniana NK, Monzón A, Ownley B, et al. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. Fungal Ecology 2:149-159.
- Vega F. E., N. V. Meyling, J. J. Luangsa-Ard y M. Blackwell. 2012. Fungal entomopathogens. En: Vega F, Kaya H. K. eds. Insect Pathology 2da ed. EUA: Elsevier, p. 171-220.
- Velázquez-López O. E., C. Ramírez-Salinas, A. E. Castro-Ramírez, y A. Flores-Ricárdez. 2006. Aislamiento y evaluación de cepas nativas del hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin de la “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae) en Los Altos de Chiapas. En: Castro-Ramírez A. E., Morón M. A., Aragón-García A. eds. Diversidad, Importancia y Manejo de Escarabajos Edafícolas. México: ECOSUR, Fundación PRODUCE Chiapas y BUAP, p. 231-240.
- Villani M., G., S. R. Krueger y J. P. Nyrop. 1992. Case study of the impact of the soil environment on insect/pathogen interactions: scarab in turfgrass. En: Jackson T. A., Glare T. R. eds. Use of Pathogens in Scarab Pest Management. England, p. 111-126.

Zimmermann G. 2007. "Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*". *Biocontrol Science and Technology*, 17 (5/6): 553-596, 2007.