

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Bacterias entomopatógenas como agentes de control biológico de larvas de escarabajos del género *Phyllophaga* de importancia económica en Guatemala.

Trabajo de graduación presentado por Eduardo Alejandro Arrivillaga Cano para optar al grado académico de Licenciado en Biología.

Guatemala,

2019

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



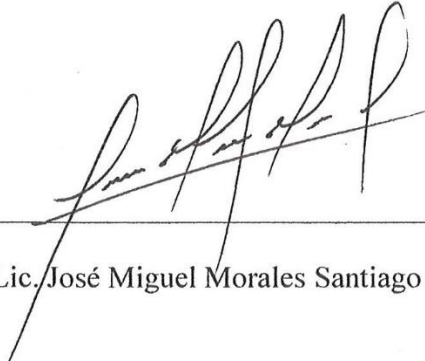
Bacterias entomopatógenas como agentes de control biológico de larvas de escarabajos del género *Phyllophaga* de importancia económica en Guatemala.

Trabajo de graduación presentado por Eduardo Alejandro Arrivillaga Cano para optar al grado académico de Licenciado en Biología.

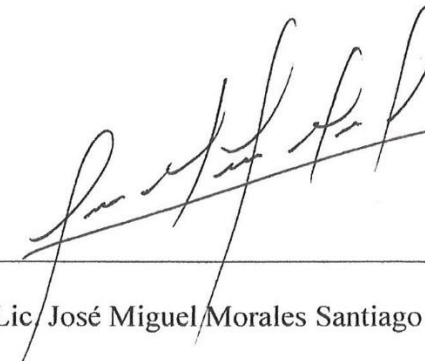
Guatemala,

2019

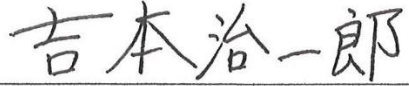
Vo. Bo. :

(f) 
Lic. José Miguel Morales Santiago

Tribunal examinador:

(f) 
Lic. José Miguel Morales Santiago

(f) 
M. Sc. Gabriela Alfaro Marroquín

(f) 
Dr. Jiichiro Yoshimoto

Fecha de aprobación: Guatemala 11 de diciembre del 2019

PREFACIO

La idea de este trabajo de investigación surgió una tarde mientras pensaba en una idea para el proyecto del curso “Microbiología general”. Esa tarde estaba leyendo un artículo de la revista de la Universidad del Valle de Guatemala, escrito por Enio B. Cano (2006), entomólogo que en ese tiempo trabajaba en la universidad. Este artículo trata sobre la taxonomía, daño a cultivos, y distribución de las especies del complejo “gallina ciega” que atacan el maíz en Guatemala. Mi objetivo era poder encontrar información útil para otro proyecto, esta vez del curso “Entomología general”, ya que este trata la diversidad de escarabajos del género *Phyllophaga* en Guatemala. Además de encontrar información útil para mi proyecto de entomología, leyendo una de las recomendaciones del artículo, se me ocurrió realizar este trabajo. Dicha recomendación dice así:

“No existen insecticidas de origen bacteriano para esta región por lo cual es importante el aislamiento de cepas bacterianas con potencial insecticida para larvas de *Phyllophaga*, la principal plaga. Se sugiere la búsqueda de larvas nativas, enfermas con síntomas de Bt, para la búsqueda de bacterias portadoras de genes *cry8C*. [...]. Se puede evaluar la patogenicidad contra larvas sanas criadas en laboratorio y posteriormente evaluar la posibilidad de desarrollar el insecticida por medio de la biotecnología y quizás patentar algún insecticida basado en Bt, específico para ciertas gallinas ciegas propias de Guatemala”.

Este trabajo lo inicié como parte de mi proyecto de microbiología; sin embargo, solo logré aislar algunas bacterias, y extraer proteínas. Esto más que todo me ayudó a conocer el tipo de problemas que podría afrontar realizando este trabajo, y a mejorar ciertas metodologías.

Agradezco a Dios por permitirme estudiar lo que me gusta, y en una universidad en la que, sin su ayuda, no habría podido estudiar. Agradezco a mis padres y hermano por siempre apoyarme, estar a mi lado, y por todo el esfuerzo que han hecho por mí, a mi abuelo, Yury, por comprarme materiales y hacerme favores que necesite, a mi tío Wilson

y tía Mónica por permitirme ir a su casa a buscar gallinas ciegas en los inicios de este trabajo, a mi tío Alex por su ayuda con mi presentación de protocolo de tesis, y a mi familia en general por su apoyo. Le doy gracias al Doc. Enio Cano por indirectamente darme la idea de este trabajo; a mi asesor Lic. José Miguel Morales por ayudarme, aconsejarme, y supervisarme; al Doc. Jiichiro Yoshimoto por sus recomendaciones; a la Majo y a su papá, German Lazo, por permitirme buscar gallinas ciegas en “El Toro”, a Guayo, Lady, Don Rigo y Gustavo, por su hospitalidad y ayuda buscando larvas; a la Lic. Priscila Juárez, a la M. Sc. Gabriela Alfaro, y a Ericka Santos por su apoyo en la logística; a Mynor, Freddy, y José por su ayuda con los materiales, laboratorios y autoclave; a la Lic. Dalia Lau por brindarme los criotubos que utilice para criopreservar las cepas aisladas; a Diego Incer por ayudarme en la elaboración de los mapas; y a mis amigos que muchas veces me ayudaron a preparar alguna solución, me prestaron algún reactivo, e inclusive a buscar gallinas ciegas.

ÍNDICE

	Página
PREFACIO	v
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
A. Antecedentes	1
B. Justificación	8
C. Objetivos	11
D. Hipótesis	12
II. MÉTODOS	13
A. Área de estudio	13
B. Sujetos de estudio	16
C. Tipo y tamaño de la muestra	16
D. Criterios de inclusión y exclusión	16
E. Procedimientos	17
III. RESULTADOS	23
IV. DISCUSIÓN	27
V. CONCLUSIONES	31

VI. RECOMENDACIONES33

LITERATURA CITADA35

ANEXOS41

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Características fenotípicas de las cuatro cepas que seleccione y utilice en el bioensayo de inoculación intracelómica con larvas de <i>P. ravidia</i>	24

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura

1. Mapa de zonas de vida de los departamentos Guatemala y Jutiapa. Los puntos negros indican los sitios de colecta de todas las gallinas ciegas que utilice en este estudio.14
2. Mapa de zonas de vida de los departamentos Guatemala y Jutiapa. Los puntos negros indican los sitios de colecta de todas las gallinas ciegas que utilice en este estudio.15
3. Vista lateral de la morfología general de una gallina ciega20
4. Inoculación bacteriana de gallinas ciegas por inyección intracelómica21
5. Bioensayo por inoculación intracelómica mostrando actividad insecticida en la “cepa 2” y la “cepa 4” a una concentración de 1×10^8 UFC/ml a las 24 h de haber finalizado la inoculación25
6. Bioensayo por inoculación intracelómica mostrando actividad insecticida en las cuatro cepas que seleccione a una concentración de 1×10^8 UFC/ml a las 48 h de haber finalizado la inoculación26

RESUMEN

Se le conoce como gallinas ciegas a las larvas de los escarabajos de la superfamilia Scarabaeoidea. Algunas de estas larvas son de gran importancia económica, ya que destruyen las raíces de las plantas, reduciendo así la producción de las cosechas, siendo las del género *Phyllophaga* la principal plaga. En Guatemala estas son controladas de forma generalizada mediante insecticidas químicos, y en menor medida mediante control biológico con nematodos y hongos entomopatógenos; sin embargo, esta última estrategia no ha sido muy eficiente. Debido a esto, el objetivo de este estudio fue determinar la virulencia hacia larvas sanas de *Phyllophaga* de importancia económica en Guatemala, de cepas bacterianas entomopatógenas aisladas de gallinas ciegas con síntomas de infección bacteriana, colectadas en cultivos de maíz en los departamentos Guatemala y Jutiapa. Para esto, aislé y seleccioné mediante observación de caracteres morfológicos, anatómicos y metabólicos, un total de cuatro cepas bacterianas entomopatógenas (“cepa 1”, “cepa 2”, “cepa 3”, y “cepa 4”), de dos larvas en tercer instar con síntomas de infección bacteriana. En un bioensayo por inoculación intracelómica con larvas de *P. ravidia*, estas cepas provocaron una tasa de mortalidad del: 13%, 73%, 38%, y 44% en 24 h; y del 81%, 100%, 75%, y 88% en 48 h, respectivamente. Según esto, concluyo que la “cepa 2” y la “cepa 4” son las que tienen el mayor potencial de uso como agentes de control biológico de larvas plaga del género *Phyllophaga* en Guatemala; sin embargo, más estudios como este son requeridos para poder considerar el control microbiano de plagas en Guatemala, considerando su gran biodiversidad.

ABSTRACT

The larvae of beetles of the Scarabaeoidea superfamily are known as “gallinas ciegas”. Some of these larvae are of great economic importance, since they destroy the roots of the plants, thus reducing crop production, being the *Phyllophaga* genus the main pest. In Guatemala these are controlled in a generalized way by chemical insecticides, and to a lesser extent by biological control with nematodes and entomopathogenic fungi; however, this last strategy has not been very efficient. Due to this, the objective of this study was to determine virulence towards healthy larvae of *Phyllophaga* of economic importance in Guatemala, of entomopathogenic bacterial strains isolated from “gallinas ciegas” with symptoms of bacterial infection, collected in maize crops in the departments Guatemala and Jutiapa. For this, I isolated and selected by observation of morphological, anatomical and metabolic characters, a total of four entomopathogenic bacterial strains (“cepa 1”, “cepa 2”, “cepa 3”, y “cepa 4”), from two larvae in third instar with symptoms of bacterial infection. In an intracoelomic inoculation bioassay with *P. ravidula* larvae, these strains caused a mortality rate of 13%, 73%, 38%, and 44% in 24 hr; and 81%, 100%, 75%, and 88% in 48 hr, respectively. Based on this, I conclude that “cepa 2” and “cepa 4” are the ones with the greatest potential for use as biological control agents for pest larvae of the genus *Phyllophaga* in Guatemala; however, more studies like this are required to be able to consider microbial pest control in Guatemala, considering its huge biodiversity.

I. INTRODUCCIÓN

Este trabajo de investigación tiene el objetivo presentar la propuesta y metodología de aislamiento y selección, mediante observación de caracteres morfológicos, anatómicos, y metabólicos, de cepas bacterianas entomopatógenas de gallinas ciegas nativas, principalmente del género *Phyllophaga*, la principal plaga. Detalla los resultados obtenidos de un bioensayo por inoculación intracelómica de cuatro cepas aisladas del cuerpo de dos larvas con síntomas de infección bacteriana, en larvas sanas del género *Phyllophaga*; discute estos resultados, y lo que implican para Guatemala. Concluye que los resultados de este estudio son solo un primer paso para poder considerar el control microbiano de plagas como las gallinas ciegas en Guatemala, tomando en cuenta su gran biodiversidad. Finalmente recomienda que, además de bioensayos por inoculación intracelómica, es necesario realizar bioensayos por inoculación oral, bioensayos en campo bajo condiciones de invernadero, y determinar la dosis letal media (DL50) de las cepas utilizadas en este estudio, y de cepas por descubrir.

A. Antecedentes

1. Complejo “gallina ciega”

Las larvas de los escarabajos de la superfamilia Scarabaeoidea, conocidas como “gallinas ciegas”, son larvas blanquecinas en forma de “C”. Dentro de estas, existe un grupo que es de importancia económica, y que se conforma por los géneros: *Phyllophaga*, *Cyclocephala*, *Anomala*, *Euethola*, *Ligyris*, *Diploaxis*, y *Macroductylus*. Las larvas de estos escarabajos destruyen las raíces de las plantas, reduciendo así la producción de las cosechas. Las gallinas ciegas, en especial de los géneros *Phyllophaga*, *Anomala* y *Cyclocephala*, son la plaga más importante que vive en el suelo (Cano *et al.* 2000, Cano 2006). Se sabe que los cultivos más afectados por estos organismos son: el maíz, frijol, arroz, sorgo, trigo, cebada, remolacha, zanahoria, espinaca, acelga, chile, haba, garbanzo, papa, café, caña de azúcar, tabaco, cebolla, pastos, tomate, espárragos, brócoli, rosas, arveja

china, fresa y mora (Cano y Morón 1998, Cano *et al.* 2000), atribuyéndose la mayor parte del daño a *Phyllophaga* spp. (Velásquez 1996).

En Guatemala, las gallinas ciegas son consideradas una de las principales plagas que provocan pérdidas significativas en los cultivos. Estas larvas atacan el sistema radicular de las plantas, comiéndose los pelos absorbentes y raíces, impidiendo así, la absorción de agua y nutrientes del suelo, lo cual provoca que las plantas se tornen amarillentas, y finalmente mueran o caigan por falta de fijación al suelo (Cano *et al.* 2000). Los cultivos en campos afectados por las gallinas ciegas no germinan, o germinan de forma parcial, ya que estas larvas detienen su desarrollo. En un terreno severamente afectado por gallinas ciegas, todas las plantas pueden morir en un lapso de siete a diez días (Ayala y Monterroso 1988). La seriedad de esta problemática radica en que los daños frecuentemente se perciben cuando ya es tarde para aplicar soluciones prácticas, y ya se ha invertido una parte importante del costo de producción (Shannon y Carballo 1996), causando una disminución notable en el rendimiento de las cosechas (Palmieri 1982).

El ciclo de vida de las gallinas ciegas varía entre especies, pero generalmente dura de uno a dos años. En términos generales, la etapa de huevo de una gallina ciega dura alrededor de quince días, después de los cuales nace una pequeña larva de aproximadamente 5 mm. Esta inicia a alimentarse vorazmente, crece y cambia de exuvia tres veces hasta alcanzar un tamaño aproximadamente de 40 mm, entre los meses de enero y febrero hasta marzo. Luego la larva pasa a su etapa de pupa, y durante 90 días aproximadamente permanece en el suelo sufriendo una serie de transformaciones que la llevarán a su etapa adulta, a finales de abril. Después del inicio de las primeras lluvias, entre los meses de abril y junio, los adultos emergen del suelo en masa entre las 17:45 y las 19:00 horas, para alimentarse y copular. Al finalizar la cópula, y luego de haberse fecundado los huevos, las hembras proceden a depositar entre diez a veinte huevos individualmente en el suelo a unos cinco o quince cm de profundidad, para después morir, y reiniciarse el ciclo (Cano *et al.* 2000). Las gallinas ciegas son más dañinas entre los meses de julio y agosto, cuando tienen alrededor de dos a tres meses de vida (Dix 1997). Los adultos se alimentan de follaje, principalmente de los árboles, pudiendo defoliar un árbol completo en una sola noche (Cano *et al.* 2000).

Aunque el daño y la pérdida por efecto de plagas en los cultivos ha sido poco cuantificada en Guatemala (Díaz 2015), diferentes estudios indican que el daño causado por las gallinas ciegas en cultivos de maíz puede alcanzar del diez al 100% de la producción total, dependiendo de la localidad. En Tejutla, San Marcos, se ha reportado un daño del 100%; en Joyabaj, Quiché, del 50%; en Chimaltenango, del 50%; y en San Jerónimo, Baja Verapaz, del 10% (Cano 2006). En cultivos de espárrago, en plantaciones localizadas en los municipios San Antonio Suchitepéquez y Cuyotenango, Suchitepéquez, se han reportado pérdidas de entre el doce y 15% del total de la plantación (Velásquez 1994). En cultivos de rosas para exportación en condiciones de invernadero, en el municipio Santa Lucía Milpas Altas, Sacatepéquez, se ha estimado una pérdida de entre el diez y 20% del total de la producción (Velásquez 1996). En un diagnóstico realizado en Jutiapa en 1990, donde se había observado un incremento en el daño ocasionado por las gallinas ciegas a los cultivos, se determinó que la proporción de cultivos dañados en todo Jutiapa era de: maíz 47%, sorgo 27%, frijol 13%, arroz 6%, ajonjolí 2%, tomate 3% y cebolla 2% (Estrada 1990).

2. Manejo de la gallina ciega en Guatemala

En Guatemala se han diseñado diferentes programas de manejo integrado de la gallina ciega que incluyen la colecta, y eliminación de adultos atraídos a trampas de luz, control biológico con nematodos y hongos entomopatógenos, y control cultural. Sin embargo, el uso de insecticidas químicos es la medida generalizada para el control de plagas en los cultivos (Hernández 1994, Velásquez 1996, Dix 1997). Por ejemplo, en Jutiapa se sabe que el 28% de los agricultores utilizan Volatón granulado y/o líquido (Phoxim) para combatir las gallinas ciegas (Estrada 1990). En cultivos de espárrago se utiliza normalmente el insecticida Mocap, y en cultivos de caña de azúcar se utiliza el insecticida Counter (Velásquez 1996). El uso generalizado y constante de insecticidas químicos representa un problema, ya que afecta el medio ambiente, la biodiversidad, e induce selección a favor de larvas resistentes (Cano 2006, Nuñez-Valdez *et al.* 2008). Además, representa una potencial amenaza contra los trabajadores agrícolas, ya que se encuentran sometidos a especiales riesgos asociados a la inhalación, ingestión, y contacto con los insecticidas durante su preparación y aplicación (Ongley 1997).

a. Problemática del uso de insecticidas químicos

El principal medio de daño ecológico de los insecticidas es el agua contaminada por escorrentía, mediante bioconcentración y bioampliación. La bioconcentración se refiere al flujo del insecticida desde el medio circundante hasta el interior de un organismo, siendo el principal sumidero de algunos insecticidas el tejido adiposo. La bioampliación se refiere a la creciente acumulación del insecticida dentro de la cadena trófica, a medida que los organismos son devorados por sus depredadores. Esto causa que los depredadores mayores presenten elevadas concentraciones de insecticida en sus tejidos, incluyendo el ser humano (Ongley 1997).

En cuanto a la biodiversidad, el objetivo de los insecticidas es eliminar insectos plaga, pero debido a que no son específicos, tienen un impacto letal o subletal en organismos que no son su objetivo; como, por ejemplo: recicladores de nutrientes del suelo, polinizadores, y depredadores de plagas. Además, reducen y contaminan la fuente de alimento de los niveles tróficos superiores (Devine *et al.* 2008).

La humanidad está cada vez más consciente del peligro del uso de insecticidas químicos, por lo que el uso de sus componentes más tóxicos está disminuyendo lentamente, y algunos ya han sido prohibidos en muchos países. Aun así, mantienen un 50% de la cuota de mercado internacional. En los últimos años, se han introducido nuevos insecticidas que presentan baja toxicidad en mamíferos, y que en su mayoría, son menos dañinos contra los depredadores de plagas y otras especies no objetivo, lo que reduce su impacto ambiental (Devine *et al.* 2008). Sin embargo, lo ideal es que se desarrollen insecticidas específicos que solamente afecten a los insectos plaga objetivo, de forma que su impacto ambiental sea nulo.

El término “selección a favor de larvas resistentes”, se refiere a la selección artificial que sucede cuando se impone una presión selectiva elevada y uniforme, por periodos de tiempo prolongados, por parte de un factor de estrés hacia las gallinas ciegas. Esto desemboca en la evolución de larvas resistentes a los insecticidas. Esta evolución involucra diferentes componentes y procesos. Los componentes son: un factor de estrés (insecticida), y el organismo blanco junto con su población. Los procesos son: la disminución de la

fracción de la población que, por factores genéticos, ecológicos, y prácticas agronómicas, es susceptible a los insecticidas (Trumper 2014).

La susceptibilidad de un organismo a una toxina o insecticida está dada por la susceptibilidad inherente de su especie, es decir, tiene un componente genético específico. Un insecto puede ser susceptible o tolerante, bajo determinadas condiciones fisiológicas y ambientales. El término susceptible se refiere a que si la toxina es mortal o no para el insecto (Trumper 2014); y el término tolerante se refiere a la concentración más alta de insecticida que un organismo puede soportar sin ser eliminado (Tabashnik *et al.* 2014).

La población de una determinada especie presenta diferentes susceptibilidades a un determinado factor de estrés, como consecuencia de la variabilidad de las condiciones fisiológicas y ambientales que presentan sus individuos (Trumper 2014). Entonces, la resistencia se define como el carácter heredable que consiste en la menor susceptibilidad (fenotipo) de un insecto a una toxina, o insecticida, en relación con los individuos de la misma población. La frecuencia del genotipo que confiere la baja susceptibilidad en una población aumenta frente a la presión selectiva que ejercen los insecticidas con el tiempo (Caprio *et al.* 2008).

La resistencia habilita a las larvas a superar prácticas de control mediante cambios de comportamiento, desarrollo, o procesos bioquímicos (Onstad 2014); lo cual, en consecuencia, disminuye la efectividad de su manejo (Trumper 2014). Desde un punto de vista social, la resistencia de las plagas representa la degradación de un bien común, el cual es la susceptibilidad de las plagas hacia las prácticas de control e insecticidas (Bourguet *et al.* 2005).

En cuanto a los riesgos a los que se enfrentan los trabajadores agrícolas, al preparar y aplicar los insecticidas, podemos mencionar que la gran mayoría que existen tienen componentes que pertenecen al grupo de los organofosforados. Estos químicos se absorben con facilidad por inhalación, ingestión y penetración dérmica, siendo la capacidad de penetración dérmica directamente proporcional a su grado de toxicidad. Los síntomas de intoxicación por estos insecticidas aparecen minutos u horas tras la exposición, dependiendo de la dosis y la vía (es más rápida la inhalatoria, seguida por la digestiva, y finalmente la dérmica). Los más críticos son los respiratorios, presentándose en muchos

casos, un componente cardiovascular. Las manifestaciones clínicas por intoxicación aguda por organofosforados son: paro respiratorio, convulsiones, fasciculaciones, broncorrea, broncoespasmos graves, bradicardia extrema, visión borrosa, espasmos musculares, debilidad, temblor, incoordinación, vómitos, calambres abdominales y diarrea. Un aumento en las secreciones pulmonares, y la depresión respiratoria, son las causas más comunes de muerte (Martín y Martínez 2006, Devine *et al.* 2008).

3. Control biológico en Guatemala

Una estrategia segura para combatir plagas, como las gallinas ciegas, es el control biológico. Para esto es indispensable la identificación de enemigos naturales nativos, para seleccionar los que presenten mayor potencial en base a criterios como: especificidad, movilidad, virulencia (cuando son patógenos), persistencia, factibilidad, y costos de producción (Hernández-Velázquez *et al.* 2010). En Guatemala se han diseñado diferentes programas de manejo integrado de la gallina ciega que incluyen control biológico; sin embargo, estos no han sido muy eficientes. En el caso de nematodos, algunas limitaciones para su uso a gran escala son: la falta de consistencia de control en campo, la baja tolerancia de estos hacia temperaturas mayores a 30°C, la desecación, la falta de entendimiento de la interacción fisiológica entre los nematodos, su bacteria simbionte, y la plaga objetivo, y, por último, la falta de métodos adecuados para su producción masiva y formulación (Grewal *et al.* 1994, Burges 1998, Alatorre-Rosas 1999, Fridlender 2000, Mukuka *et al.* 2010). En el caso de hongos, el principal reto es que existen pocos protocolos estandarizados y normalizados, tanto para elaboración de medios de cultivo, como para elaboración de tecnologías de producción y evaluación en laboratorio y campo (Laengle *et al.* 2005).

4. Bacterias entomopatógenas

Para el control biológico de gallinas ciegas, además de nematodos y hongos entomopatógenos, se han identificado diferentes bacterias con actividad insecticida de importancia para plagas subterráneas. Estas bacterias se agrupan en dos tipos: las formadoras, y las no formadoras de esporas (Hernández-Velázquez *et al.* 2010). Dentro del grupo de las formadoras de esporas, la más importante es *Bacillus thuringiensis* (Bt), una bacteria Gram positiva de la cual se han identificado varios genes que codifican proteínas

de la familia Cry, tóxicas contra insectos del orden Coleoptera (Bravo *et al.* 1998, Schnepf *et al.* 1998); siendo los genes del tipo *cry8* específicos contra gallinas ciegas (Hori *et al.* 1994, Sato *et al.* 1994, Yu *et al.* 2006, Hernández-Velázquez *et al.* 2010). *Paenibacillus popilliae* (antes conocida como *Bacillus popilliae*) (Hernández-Velázquez *et al.* 2010), y *Lysinibacillus sphaericus* (antes conocida como *Bacillus sphaericus*) (Ahmed *et al.* 2007), son otras bacterias Gram positivas de importancia dentro de este grupo. *P. popilliae* es la causante de la enfermedad “lechosa” en larvas de los escarabajos *Popillia japonica* y *Melolontha melolontha*, y además, al igual que *B. thuringiensis*, posee genes que codifican proteínas Cry (Klein 1988, Zhang *et al.* 1997). *L. sphaericus* es una bacteria que comúnmente se utiliza para el control de mosquitos (Porter *et al.* 1993), pero que también ha presentado actividad insecticida contra larvas del escarabajo *Amphimallon solstitiale*, en Turquía (Sezen *et al.* 2005). Dentro del grupo de bacterias no formadoras de esporas, podemos mencionar como las más importantes a *Serratia marcescens*, *Serratia proteamaculans* y *Serratia entomophila*, todas Gram negativas, siendo las últimas 2, las causantes de la enfermedad “ámbar” en larvas del escarabajo *Costelytra zealandica* (Grimont *et al.* 1988, Jackson *et al.* 2001). Dentro de este grupo, también podemos mencionar a las bacterias Gram negativas *Photorhabdus luminiscens* y *Xenorhabdus* spp., simbioses de nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* y *Steinernema*, respectivamente (Hernández-Velázquez *et al.* 2010).

Todas estas bacterias tienen en común que una vez son ingeridas por las gallinas ciegas, inician un proceso infeccioso en el que como primer paso colonizan el intestino, continuando con el hemocele mediante toxinas y factores de virulencia, como enzimas hidrolíticas que degradan la membrana peritrófica. Dentro del hemocele, las bacterias encuentran un medio rico en nutrientes que impulsa nuevamente su replicación, y la producción de más factores de virulencia que causan la muerte por septicemia de las larvas. En general, los síntomas evidentes de una larva infectada por una bacteria entomopatógena son: inhibición de la alimentación (AFE, por sus siglas en inglés), cambios de coloración y turgencia, cambios en las evacuaciones intestinales, y aletargamiento (Hernández-Velázquez *et al.* 2010).

Actualmente existen solo 3 bioinsecticidas comerciales de origen bacteriano en todo el mundo para el control biológico de las gallinas ciegas (Nuñez-Valdez *et al.* 2008). El primero es conocido como “Doom”, y fue fabricado a partir de *P. popilliae* para combatir al escarabajo japonés *P. japonica* en Estados Unidos; sin embargo, se presenta la dificultad de que la esporulación de esta bacteria es difícil de obtener *in vitro*, por lo que ha sido producida *in vivo*, limitando la manufacturación de este producto (Klein 1981, 1988, Nuñez-Valdez *et al.* 2008). El segundo se conoce como “Buihunter”, y se produce a partir de *B. thuringiensis japonensis*; se encuentra disponible en Japón, y es activo contra larvas de los escarabajos *Anomala donovani*, *P. japonica*, y *Exomala orientalis* (Suzuki *et al.* 1992, Hori *et al.* 1994, Alm *et al.* 1997, Nuñez-Valdez *et al.* 2008). El tercero se conoce como “Invade”, y fue desarrollado en Nueva Zelanda, a partir de *S. entomophila* para combatir larvas del escarabajo *Costelytra zealandica* (Grimont *et al.* 1988, Shannon 1996, Nuñez-Valdez *et al.* 2008). Las ventajas que presentan estos bioinsecticidas sobre los insecticidas químicos son su alta especificidad (solo afectan a los insectos objetivo), no dañan el medio ambiente, y son inocuos contra mamíferos, lo que los hace seguros para los trabajadores agrícolas a la hora de ser aplicados y preparados (Devine *et al.* 2008).

Debido al enorme potencial que presentan los bioinsecticidas de origen bacteriano, y a que no existe ninguno aplicable para esta región, es de gran importancia el aislamiento, selección, identificación, y caracterización de cepas bacterianas entomopatógenas de gallinas ciegas nativas, principalmente del género *Phyllophaga*, la principal plaga, de forma que se puedan desarrollar a futuro bioinsecticidas específicos para el control integrado de la misma, sabiendo que de las aproximadamente 96 especies conocidas de *Phyllophaga* en Guatemala, 19 son plagas importantes, y es posible que el número de especies plaga sea mayor (Cano *et al.* 2000, Cano 2006).

B. Justificación

Las larvas de los escarabajos de la superfamilia Scarabaeoidea, conocidas como “gallinas ciegas”, son larvas blanquecinas en forma de “C”. Dentro de estas, existe un grupo que es de gran importancia económica. Se sabe que los cultivos más afectados por estos

organismos son el maíz, frijol, arroz, sorgo, trigo, cebada, remolacha, zanahoria, espinaca, acelga, chile, haba, garbanzo, papa, café, caña de azúcar, tabaco, cebolla, pastos, tomate, espárragos, brócoli, rosas, arveja china, fresa y mora (Cano y Morón 1998, Cano *et al.* 2000), atribuyéndose la mayor parte del daño a *Phyllophaga* spp. (Velásquez 1996). Estas larvas atacan el sistema radicular de las plantas, comiéndose los pelos absorbentes y raíces, impidiendo así la absorción de agua y nutrientes del suelo, lo cual causa que las plantas se tornen amarillentas, y finalmente mueran o caigan por falta de fijación al suelo (Cano *et al.* 2000).

Aunque el daño y la pérdida por efecto de plagas en los cultivos ha sido poco cuantificada en Guatemala (Díaz 2015), diferentes estudios indican que el daño causado por las gallinas ciegas puede alcanzar del diez al 100% de la producción total de un cultivo, dependiendo de la localidad (Cano 2006). Esto representa un grave problema, sabiendo que en Guatemala el sector agrícola contribuye de forma considerable al producto interno bruto anual (PIB), y que cultivos como el maíz, forman parte de la dieta básica de los guatemaltecos, siendo para muchas familias un cultivo de subsistencia (MAGA 2018). En base a las cifras preliminares más recientes, la participación porcentual en el PIB anual de la actividad económica “Agricultura, ganadería, caza, silvicultura y pesca” es del 15.4%, siendo la segunda con mayor participación, siendo la primera: “Industrias manufactureras” (BANGUAT 2018). En el caso del maíz, para el año agrícola que inicio en mayo del 2017 y concluyo en abril del 2018, según cifras preliminares, se estimó una producción de 43 millones de quintales, de los cuales 38.7 millones corresponden a maíz blanco, siendo el objetivo primario de esta variedad, satisfacer las necesidades alimentarias de la población. Aunado a esto, se proyecta para el ciclo agrícola 2018/2019 una producción de 44 millones de quintales, de los cuales el 90% corresponde a maíz blanco. El mantenimiento y aumento de la producción de cultivos de suma importancia en Guatemala, como el maíz, el cual presenta un consumo aparente de 65 millones de quintales según cifras del año 2017, es una necesidad para la seguridad alimentaria del país (MAGA 2018).

A pesar de que en Guatemala se han diseñado diferentes programas de manejo integrado de la gallina ciega, que involucran la colecta y eliminación de adultos atraídos por trampas de luz, control biológico con nematodos y hongos entomopatógenos, y control cultural, el

uso de insecticidas químicos es la medida generalizada para el control de plagas (Hernández 1994, Velásquez 1996, Dix 1997). El problema con esto es que el uso generalizado y constante de los insecticidas químicos afecta el medio ambiente, la biodiversidad, e induce selección a favor de larvas resistentes (Cano 2006, Devine *et al.* 2008, Nuñez-Valdez *et al.* 2008, Trumper 2014). Además, representa una potencial amenaza contra los trabajadores agrícolas, ya que se encuentran sometidos a especiales riesgos asociados a la inhalación, ingestión, y contacto a través de la piel con los insecticidas durante su preparación y aplicación (Ongley 1997).

El control biológico es una estrategia segura para combatir plagas del suelo como las gallinas ciegas (Hernández-Velázquez *et al.* 2010). Sin embargo, en Guatemala este tipo de control no ha sido muy eficiente, debido a que tanto hongos como nematodos entomopatógenos presentan dificultades a la hora de producirlos, formularlos y aplicarlos (Grewal *et al.* 1994, Burges 1998, Alatorre-Rosas 1999, Fridlender 2000, Laengle *et al.* 2005, Mukuka *et al.* 2010). Para el control biológico de las gallinas ciegas, además de nematodos y hongos entomopatógenos, se han identificado diferentes bacterias con actividad insecticida de importancia para plagas subterráneas. Las más importantes son: *B. thuringiensis*, *P. popilliae*, y *S. entomophila*. Todas estas bacterias tienen en común que una vez son ingeridas por las gallinas ciegas, inician un proceso infeccioso en el que como primer paso colonizan el intestino, luego el hemocele mediante toxinas y factores de virulencia, como enzimas hidrolíticas que degradan la membrana peritrófica. Dentro del hemocele, las bacterias encuentran un medio rico en nutrientes que impulsa nuevamente su replicación, y la producción de más factores de virulencia que causan la muerte por septicemia de las larvas. En general, los síntomas evidentes de una larva infectada por una bacteria entomopatógena son: inhibición de la alimentación (AFE, por sus siglas en inglés), cambios de coloración y turgencia, cambios en las evacuaciones intestinales, y aletargamiento (Hernández-Velázquez *et al.* 2010).

Actualmente, solo existen 3 bioinsecticidas comerciales de origen bacteriano en todo el mundo para el control biológico de las gallinas ciegas. A los primeros dos se les conoce como “Doom” y “Buihunter”, los cuales fueron producidos y fabricados a partir de las bacterias *P. popilliae* y *B. thuringiensis japonensis* respectivamente. El tercer

bioinsecticida fue producido y fabricado a partir de la bacteria *S. entomophila* en Nueva Zelanda, para combatir larvas del escarabajo *C. zealandica* (Nuñez-Valdez *et al.* 2008, Hernández-Velázquez *et al.* 2010). Las ventajas que presentan estos bioinsecticidas sobre los insecticidas químicos son: su alta especificidad, no dañan el medio ambiente, y son inocuos contra mamíferos, lo que los hace seguros para los trabajadores agrícolas a la hora de aplicarlos y prepararlos (Devine *et al.* 2008).

Debido al enorme potencial que presentan los bioinsecticidas de origen bacteriano, y a que no existe ninguno aplicable para esta región, es de gran importancia el aislamiento, selección, identificación, y caracterización de cepas bacterianas entomopatógenas de gallinas ciegas nativas, principalmente del género *Phyllophaga*, la principal plaga, de forma que se puedan desarrollar a futuro bioinsecticidas específicos para el control integrado de la misma, sabiendo que de las aproximadamente 96 especies conocidas de *Phyllophaga* en Guatemala, 19 son plagas importantes, y es posible que el número de especies plaga sea mayor (Cano *et al.* 2000, Cano 2006).

C. Objetivos

1. General

- Determinar la virulencia hacia larvas sanas del género *Phyllophaga* de importancia económica en Guatemala, de cepas bacterianas entomopatógenas aisladas de gallinas ciegas con síntomas de infección bacteriana, colectadas en cultivos de maíz en los departamentos Guatemala y Jutiapa.

2. Específicos

- Aislar cepas bacterianas del intestino medio y/o hemocele de gallinas ciegas de importancia económica en Guatemala que presenten síntomas de infección bacteriana.
- Seleccionar las posibles cepas bacterianas con actividad entomopatógena hacia larvas del género *Phyllophaga* de importancia económica en Guatemala mediante observación de caracteres morfológicos, anatómicos y metabólicos.

- Determinar la mortalidad de gallinas ciegas sanas del género *Phyllophaga* de importancia económica en Guatemala provocada por las bacterias seleccionadas mediante un bioensayo de inoculación intracelómica.

D. Hipótesis

1. Alternativa

- Las gallinas ciegas sanas del género *Phyllophaga* de importancia económica en Guatemala que se sometan al bioensayo con las bacterias seleccionadas, manifestarán una tasa de mortalidad estadísticamente significativa.

2. Nula

- Las gallinas ciegas sanas del género *Phyllophaga* de importancia económica en Guatemala que se sometan al bioensayo con las bacterias seleccionadas, no manifestarán una tasa de mortalidad estadísticamente significativa.

II. MÉTODOS

A. Área de estudio

Todas las gallinas ciegas (Coleoptera: Scarabaeidae) que utilice en este estudio las colecte en dos sitios: en un pequeño cultivo de maíz asociado con frijol y rodeado de bosque natural ubicado en el Km. 15.3 de carretera a San Pedro Ayampuc, San Pedro Ayampuc, Guatemala, a una elevación de 1395 msnm; y en un cultivo maíz dentro de la finca “El Toro”, en Moyuta, Jutiapa, a una elevación de 16 msnm. Según el sistema de clasificación de Holdridge, estos sitios se encuentran dentro de las zonas de vida: bosque húmedo subtropical templado y bosque húmedo subtropical cálido (zona sur), respectivamente (Duro *et al.* 2005). Las especies vegetales indicadoras de estas zonas son: *Pinus oocarpa*, *Curatella americana*, *Quercus* spp., y *Byrsonima crassifolia*; *Sterculia apetala*, *Platymiscium dimorphum*, *Maclura tinctoria*, y *Cordia alliodora* (De la Cruz 1982). En base al sistema de clasificación por ecorregiones, estos sitios se encuentran dentro del bosque de pino-encino de Centroamérica, y bosque seco de Centroamérica, respectivamente. Estas ecorregiones se encuentran tanto en zonas tropicales como subtropicales (BANGUAT y URL 2009). El cultivo ubicado en el Km. 15.3 de carretera a San Pedro Ayampuc tiene una extensión de 0.036 ha aproximadamente, y todo el maíz y frijol producido se usa únicamente para consumo propio del dueño y su familia. El cultivo dentro de la finca “El Toro” tiene una extensión de siete hectáreas aproximadamente. Esta finca también posee ganado vacuno para producción de lácteos, cultivos de ajonjolí y maicillo. Este último sirve de alimento para el ganado.

A continuación, presento el mapa de cada sitio, donde se puede observar la zona de vida y ecorregión en la que se encuentra cada uno.

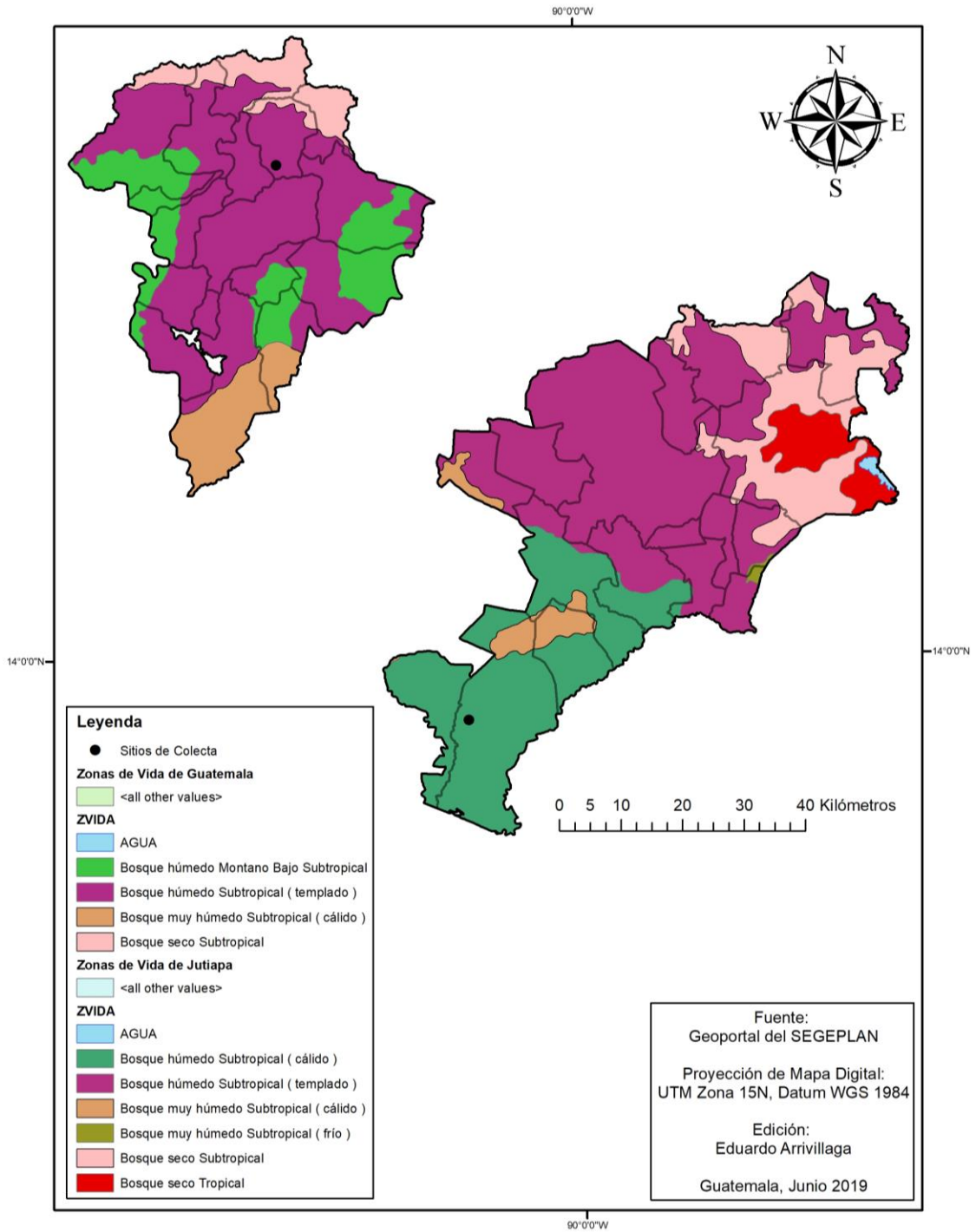


FIGURA 1. Mapa de zonas de vida de los departamentos Guatemala y Jutiapa. Los puntos negros indican los sitios de colecta de todas las gallinas ciegas que utilice en este estudio.

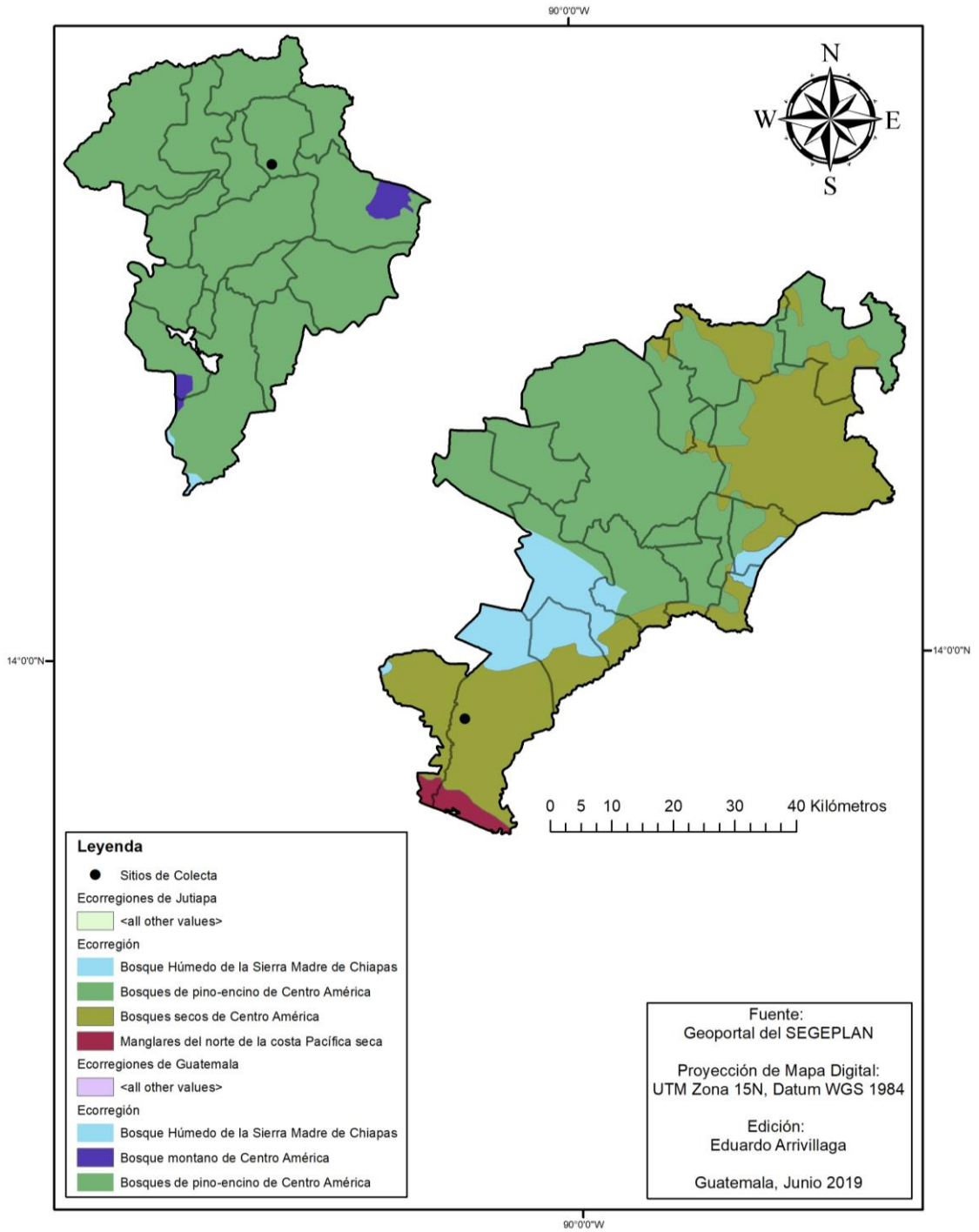


FIGURA 2. Mapa de ecorregiones de los departamentos Guatemala y Jutiapa. Los puntos negros indican los sitios de colecta de todas las gallinas ciegas que utilice en este estudio.

B. Sujetos de estudio

Mi objetivo fue determinar la virulencia hacia larvas sanas del género *Phyllophaga* de importancia económica en Guatemala, de cepas bacterianas entomopatógenas aisladas de gallinas ciegas con síntomas de infección bacteriana, colectadas en cultivos de maíz en los departamentos Guatemala y Jutiapa. Por lo tanto, los sujetos de estudio de este trabajo son todas las cepas entomopatógenas que logre aislar del intestino medio y/o hemocele de gallinas ciegas con síntomas de infección bacteriana.

C. Tipo y tamaño de la muestra

La muestra (bacterias entomopatógenas) la tome mediante un muestreo del tipo no probabilístico con fines especiales, ya que para aislar cepas entomopatógenas es necesario colectar gallinas ciegas con síntomas de infección bacteriana. Utilice dos gallinas ciegas enfermas en tercer instar, una de cada área de estudio, para aislar las cepas.

Para el bioensayo por inoculación intracelómica utilice de diez a veinte gallinas ciegas en tercer instar del género *Phyllophaga* de importancia económica en Guatemala sanas por tratamiento, de acuerdo con la cantidad con la que disponía.

D. Criterios de inclusión y exclusión

Para aislar cepas entomopatógenas busque gallinas ciegas de cualquier género dentro del complejo “gallina ciega” en segundo y/o tercer instar, con síntomas de infección bacteriana.

Para el bioensayo busque gallinas ciegas sanas del género *Phyllophaga* de importancia económica en Guatemala en tercer instar.

E. Procedimientos

1. Colecta en campo y crianza de larvas

Las gallinas ciegas con síntomas de infección bacteriana y sanas, las colecte en base a la metodología descrita por Cano (2006). Primero identifique plantas con evidencia de daño por gallinas ciegas, siendo la más obvia la falta de fijación al suelo. Una vez identificadas estas plantas, les extraje todo el suelo un círculo de aproximadamente 30 cm de diámetro y profundidad. Todas las larvas sanas que encontré las coloque de forma individual en frascos de ocho onzas de vidrio con tapadera de rosca, para evitar canibalismo, y las almacene en cajas de cartón. Las larvas enfermas las almacene a 4°C para ralentizar su descomposición sin matar las cepas bacterianas.

En laboratorio, almacené las larvas enfermas a 4°C, hasta que aislé las bacterias (Patil *et al.* 2012). Lo ideal es hacer esto lo más pronto posible y no dejarlas almacenadas por más de tres días. A las larvas sanas las coloque en vasos plásticos desechables transparentes de ocho onzas con broza hasta la mitad como sustrato, previamente esterilizada en un horno microondas por cinco minutos, y enfriada a temperatura ambiente (anexo 1). A los vasos les coloque una cubierta de cedazo sujetada con una tira de hule. Alimente las larvas con rodajas de zanahoria fresca previamente lavada con jabón de trastos. Las rodajas las inserte hasta la mitad en el sustrato y las cambie al igual que la broza semanalmente, para evitar crecimiento de hongos, ya que se debe de mantener húmedo el sustrato (humedad relativa del $70 \pm 5\%$) (Aragón-García *et al.* 2005, Cano 2006).

Los vasos con las larvas los almacene en cajas de cartón cerrados, a manera de mantenerlas en oscuridad, y las coloque en un cuarto a temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) (Aragón-García *et al.* 2005, Cano 2006, Koppenhöfer *et al.* 2012). De esta forma críe las larvas hasta juntar la cantidad necesaria para poder llevar a cabo el bioensayo por inoculación intracelómica.

2. Identificación de larvas

Identifique todas las larvas colectadas utilizando dos claves de identificación de estados inmaduros de especies de *Phyllophaga* elaboradas por Ramírez-Salinas *et al.* (2000), y Cano (2006).

3. Aislamiento bacteriano

Como primer paso tomé el cuerpo de las larvas enfermas y lo lavé con una solución de hipoclorito de sodio 15%, luego con agua estéril para mantener asepsia. Perforé el cuerpo justo en la zona ventral del abdomen con un bisturí estéril, y presionándolo contra la pared de un beaker pequeño estéril, obtuve el fluido corporal del intestino medio y/o hemocele. Tomé cuatro alícuotas de 20 µl por larva y las esparcí de forma individual en medios de cultivo nutritivo tripticasa de soya agar (TSA). Luego de 24 horas de incubación a 30°C, tome las distintas colonias individuales y las sembré en 500 µl de caldo de cultivo nutritivo Luria-Bertani (LB) con glicerol 25%, para almacenarlas a -60°C en criotubos de 1 ml de forma individual (Nuñez-Valdez *et al.* 2008, Pineda-Castellanos *et al.* 2015).

4. Selección de bacterias a utilizar en el bioensayo

Para seleccionar las posibles cepas bacterianas entomopatógenas a utilizar en el bioensayo, realice lo sugerido por Patil *et al.* (2012), y Koppenhöfer *et al.* (2012). Las colonias criopreservadas las observe en microscopio con tinción de Gram y tinción de esporas, para poder separar las cepas Gram positivas formadoras de esporas (Asano *et al.* 2003), de las Gram negativas. De entre las cepas Gram negativas identificadas, busque bacterias del género *Serratia* spp., cultivándolas en medios de cultivo diferenciales dnasa-azul de toluidina agar (Berkowitz y Lee 1973), y adonitol agar (O'Callaghan y Jackson 1993). En el medio dnasa-azul de toluidina agar modificado por Berkowitz y Lee (1973), después de 24 h de incubación a 30°C, *S. entomophila* y *S. marcescens* producen un halo rojo debido a su incapacidad de fermentar L-arabinosa; mientras que otras especies de este género producen un halo amarillo. En el medio adonitol agar, de O'Callaghan y Jackson (1993), después de 24 h de incubación a 30°C, *S. entomophila* produce colonias de color amarillo, mientras que *S. proteamaculans* produce colonias de color azul/verde.

5. Bioensayo por inoculación intracelómica

El bioensayo por inoculación intracelómica los realice basándome en el trabajo hecho por Nuñez-Valdez *et al.* (2008), y Pineda-Castellanos *et al.* (2015). Tuve un total de cinco tratamientos; cuatro grupos experimentales y un grupo control. A las larvas de los grupos experimentales les inyecte 50 µl de agua estéril con bacterias en suspensión a una concentración de 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml, directamente en el hemocele, mediante una jeringa hipodérmica con una aguja de 31 G de calibre. A las larvas del grupo control les inyecte directamente en el hemocele 50 µl de solución de agua estéril con caldo de cultivo LB estéril, de la misma forma que a las de los grupos experimentales. Las larvas de cada tratamiento las designé de forma aleatoria, al igual que el orden en el que las inyecté entre tratamientos, mediante la herramienta de aleatorización de Microsoft Office Excel.

Para esto, sembré en 700 µl de caldo de cultivo nutritivo LB cada una de las bacterias seleccionadas, las incubo por 24 h, y tomo 50 µl de cada una para luego ponerlas en solución con 3 ml de agua estéril en tubos de vidrio con tapadera de rosca de 20 ml. A partir de aquí, utilizando un estándar de McFarland 0.33 que realice para usar de referencia, ajusto las soluciones de bacterias a la concentración deseada (1×10^8 UFC/ml), agregando alícuotas de 100 µl y 50 µl de solución bacteriana madre, o de agua estéril, según fuera el caso, todo dentro de una campana de flujo laminar. La solución de agua estéril con caldo de cultivo LB para el grupo control, la realice mezclando 133.3 µl de caldo LB estéril con 866.6 µl de agua estéril en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Esto lo hice tomando como referencia que lo máximo que agregué de solución bacteriana madre a las soluciones bacterianas para ajustarlas a la concentración deseada fue 400 µl, dando como resultado una relación de 2:15. Una vez listas las soluciones, hice alícuotas de 50 µl en tubos Eppendorf de 1 ml a modo de preparación para la inoculación.

Las larvas se deben inocular como describo a continuación: se sujeta firmemente el cuerpo, sin aplastarlas, entre el pulgar y el dedo índice, de manera que la parte posterior del dorso este posicionada hacia afuera. La aguja se inserta en la porción dorsal de la sutura entre el segundo, y tercer segmento abdominal (Fig. 3). Se debe tener mucho cuidado en que la aguja entre de forma horizontal, para no perforar el intestino (Fig. 4). En caso este

se perfora, la aguja hipodérmica debe ser reemplazada por una nueva, o esterilizada inmediatamente con una solución de hipoclorito de sodio 0.5%, antes de continuar con la inoculación. La zona por inyectar debe estar completamente limpia de cualquier partícula de sustrato. También se debe tener mucho cuidado en que ninguna burbuja de aire se encuentre dentro de la jeringa y/o aguja; de lo contrario, esto puede provocar un sesgo en el volumen por inyectar a las larvas (Koppenhöfer *et al.* 2012).

A partir de la hora de finalización de la inoculación, verifique el estado de las larvas cada 24 h, hasta que todas, o la gran mayoría muriera; esto debido a que según la teoría, con esta forma de inocular, en un término de 96 h como máximo, deberían morir todas (Nuñez-Valdez *et al.* 2008, Pineda-Castellanos *et al.* 2015).

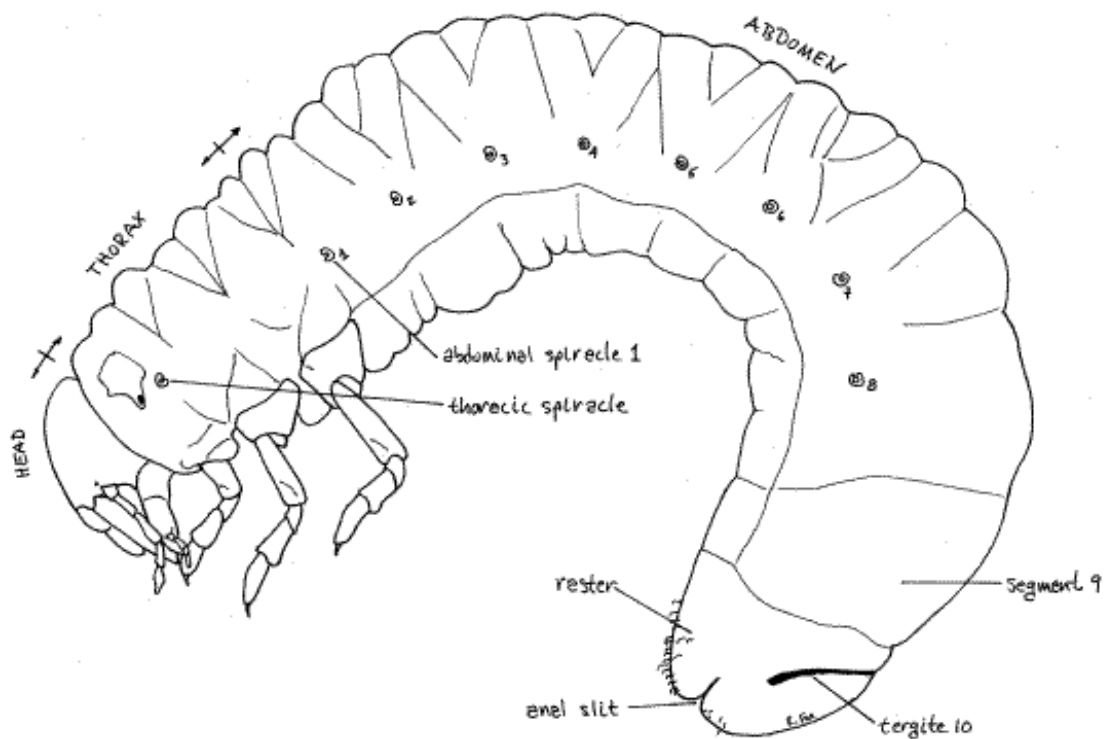


FIGURA 3. Vista lateral de la morfología general de una gallina ciega. (Ruppert *et al.* 2004).

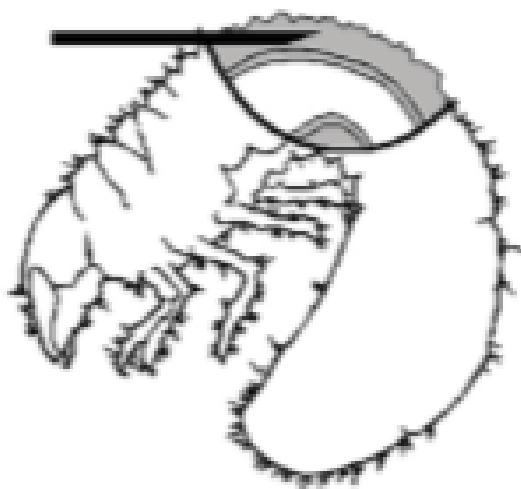


FIGURA 4. Inoculación bacteriana de gallinas ciegas por inyección intracelómica.

(Jackson y Saville 2000).

6. Análisis de datos y presentación de resultados

La mortalidad de larvas por tratamiento la represente gráficamente mediante diagramas de barras, expresando los valores de forma porcentual, redondeando al número entero más cercano. Mediante la prueba de chi cuadrado de independencia (χ^2), con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, decidí si rechazaba o no mi hipótesis nula. Aplique la corrección de Yates en los casos en los que se presentó algún valor de frecuencia esperada menor a cinco; y la corrección de Bonferroni a manera de contrarrestar el efecto de la comparación múltiple entre el grupo control y los diferentes grupos experimentales. Tanto la evaluación de las hipótesis como la elaboración de los diagramas, lo realice con el software R, en R Studio.

III. RESULTADOS

La mayoría de larvas del género *Phyllophaga* que colecté para el bioensayo por inoculación intracelómica ($n = 79$), las identifiqué como *P. ravida*, por lo que utilice exclusivamente esta especie. Las otras especies que colecte fueron: *P. tumulosa* ($n = 2$) y *P. obsoleta* ($n = 1$). Encontré otras tres especies de *Phyllophaga* que no me fue posible identificar ($n = 7$). La primera presenta una palidia que encaja con la de *P. testaceipennis* (anexo 2); sin embargo, también presenta proplegmata, por lo que es no posible que sea esta especie. La segunda se asemeja mucho a *P. obsoleta*, excepto en que cada palidium está conformado por diez a doce pali (anexo 3), mientras que, en *P. obsoleta*, cada palidium se conforma por quince a veintisiete pali. La última presenta una palidia que encaja con la de *P. tumulosa* (anexo 4); sin embargo, no presenta proplegmata, por lo que no es posible que sea esta especie. No incluí estas especies en el bioensayo por la baja cantidad en la que las colecté. Todas provienen de Moyuta, Jutiapa.

A partir de la observación de caracteres morfológicos, anatómicos y metabólicos, seleccione cuatro cepas bacterianas que utilice en el bioensayo de inoculación intracelómica. Etiquete cada cepa como “cepa 1”, “cepa 2”, “cepa 3”, y “cepa 4”. La “cepa 1” (anexo 5), es un coco Gram positivo que manifiesta colonias redondas pequeñas color rojo/anaranjado fuerte; la “cepa 2” (anexo 6), es una bacteria filamentosa Gram positiva formadora de esporas que manifiesta colonias grandes blanquecinas de borde sinuado; la “cepa 3” (anexo 7), también es una bacteria filamentosa Gram positiva formadora de esporas que crece de forma uniforme en los medios de cultivo agar, y que su forma recuerda el sistema radicular de las plantas (anexo 8); y por último, la “cepa 4”, posiblemente pertenece al género *Pseudomonas* sp. (Cuadro 1). Todas las cepas, excepto la última, las aislé del cuerpo de una larva muerta de *Phyllophaga* sp., proveniente de carretera a San Pedro Ayampuc, Guatemala. La última, la aislé del cuerpo de una larva muerta de *Cyclocephala* sp., de coloración anaranjada (anexo 9), proveniente de Moyuta, Jutiapa.

CUADRO 1. Características fenotípicas de las cuatro cepas que seleccione y utilice en el bioensayo de inoculación intracelómica con larvas de *P. ravidia*.

Cepa #	Reacción de tinción de Gram (+/-)	Morfología bacteriana	Morfología y coloración colonial	Endosporas (Sí/No)
1	+	Coco	Pequeñas circulares rojizas	No
2	+	Estreptobacilo	Grandes circulares blanquecinas de borde sinuado	Sí
3	+	Estreptobacilo	Blanquecina uniforme, parecida al sistema radicular de las plantas	Sí
4	-	Bacilo	Pequeñas circulares blanquecinas de borde crenulado	No

Todas las cepas manifestaron actividad insecticida, provocando síntomas típicos de infección bacteriana, y tasas de mortalidad estadísticamente significativas después de 48 h de haber finalizado la inoculación (Fig. 6); a las 24 h, únicamente la “cepa 2” y la “cepa 4” provocaron tasas de mortalidad significativas. Todas las larvas, excepto las del grupo control, manifestaron cambio de coloración, de blanquecino a negro, principalmente en la zona de inoculación, aletargamiento, y cambio de turgencia del cuerpo (anexos 10 al 14). La “cepa 1”, causó una mortalidad del 13% en 24 h ($x^2 = 0.533$, gl = 1, $p > 0.0125$); y del 81% en 48 h ($x^2 = 15.18$, gl = 1, $p < 0.0125$). La “cepa 2”, causó una mortalidad del 73% en 24 h ($x^2 = 15.124$, gl = 1, $p < 0.0125$); y del 100% en 48 h ($x^2 = 23.93$, gl = 1, $p < 0.0125$). La “cepa 3”, causó una mortalidad del 38% en 24 h ($x^2 = 5.128$, gl = 1, $p > 0.0125$); y del 75% en 48 h ($x^2 = 12.69$, gl = 1, $p < 0.0125$). La “cepa 4”, causó una mortalidad del 44% en 24 h ($x^2 = 6.582$, gl = 1, $p < 0.0125$); y del 88% en 48 h ($x^2 = 18$, gl = 1, $p < 0.0125$).

Todas las larvas del grupo control permanecían vivas después de 24 h; y a las 48 h murieron dos de las 16 (13%).

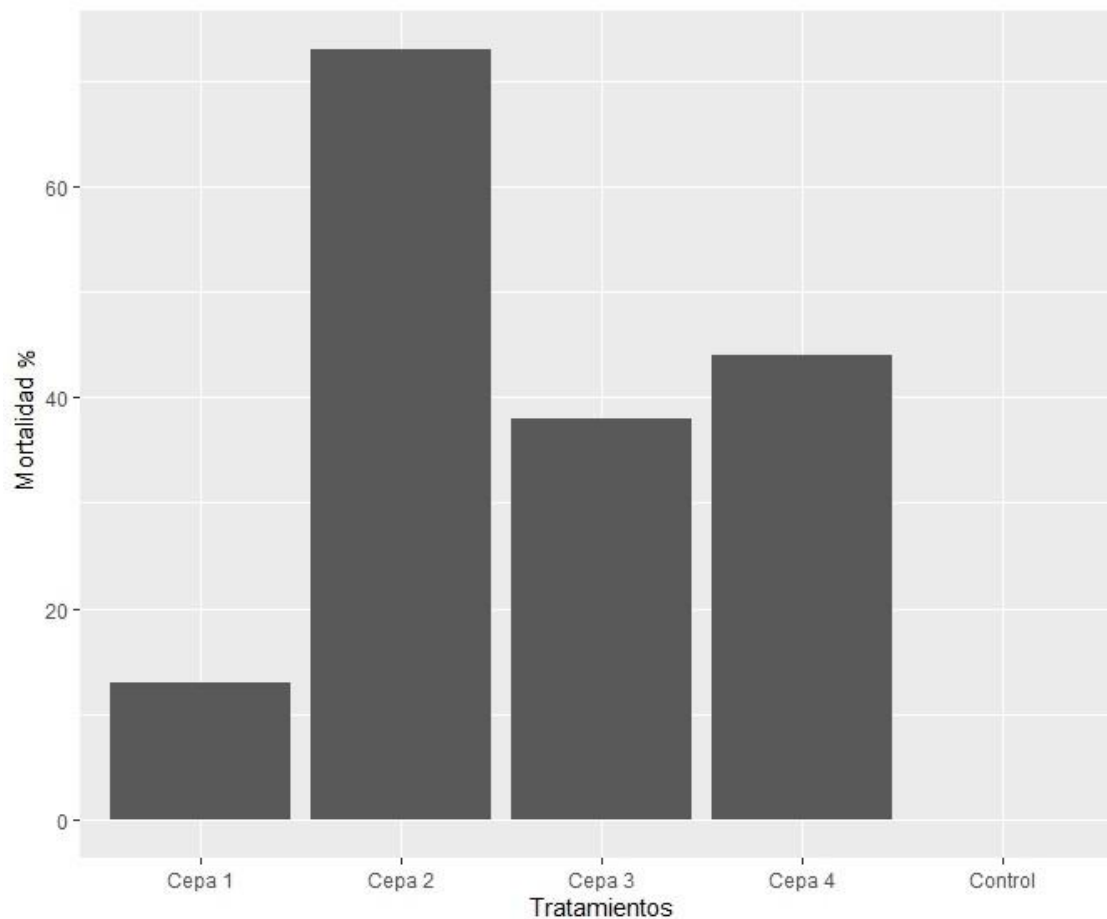


FIGURA 5. Bioensayo por inoculación intracelómica mostrando actividad insecticida en la “cepa 2” y la “cepa 4” a una concentración de 1×10^8 UFC/ml a las 24 h de haber finalizado la inoculación (“cepa 1”: $n = 16$; “cepa 2”: $n = 15$; “cepa 3”: $n = 16$; “cepa 4”: $n = 16$; control: $n = 16$). El control representa una solución de agua estéril con caldo de cultivo LB estéril a una relación de 2:15.

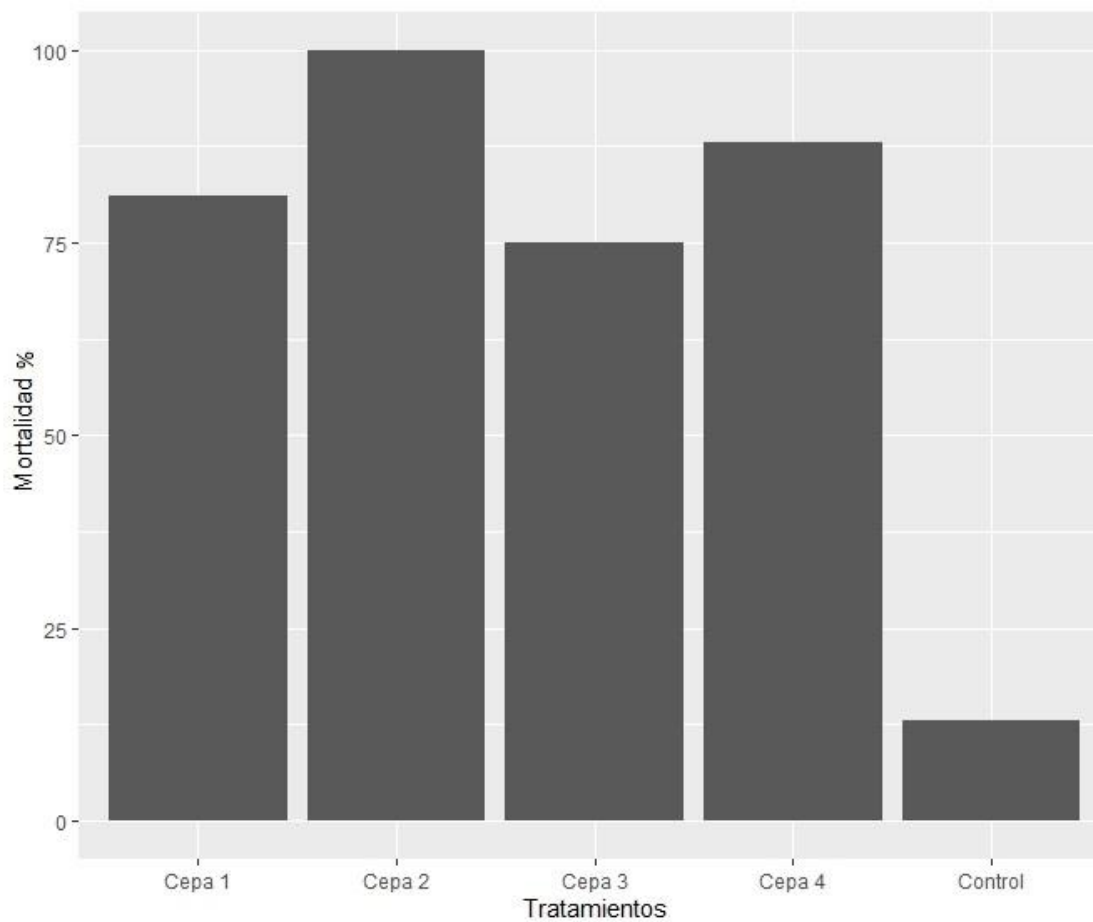


FIGURA 6. Bioensayo por inoculación intracelómica mostrando actividad insecticida en las cuatro cepas que se seleccionaron a una concentración de 1×10^8 UFC/ml a las 48 h de haber finalizado la inoculación (“cepa 1”: $n = 16$; “cepa 2”: $n = 15$; “cepa 3”: $n = 16$; “cepa 4”: $n = 16$; control: $n = 16$). El control representa una solución de agua estéril con caldo de cultivo LB estéril a una relación de 2:15.

IV. DISCUSIÓN

En base a la distribución conocida en Guatemala de especies de gallina ciega del género *Phyllophaga* sp., esperaba coleccionar larvas de *P. obsoleta*, *P. menetriesi*, y *P. tenuipilis*, en ese mismo orden de probabilidad, en Moyuta, Jutiapa; sin embargo, la especie que en mayor abundancia colecte fue *P. ravidata*. Esto puede deberse a que, según Cano (2006), esta especie no se conocía muy bien en Guatemala. Los estudios de gallinas ciegas no la habían reportado antes, probablemente porque la estaban confundiendo con otra especie, posiblemente con *P. tumulosa*, ya que se asemejan mucho (Ramírez-Salinas *et al.* 2000). Cano (2006) encontró material abundante de esta especie en su estudio, por lo cual la considera importante en el cultivo de maíz. Aparentemente es una especie que ha sido seleccionada como plaga a partir del uso de plaguicidas, por lo cual parece ser muy resistente al control químico (Cano 2006). En México es reconocida como una plaga importante del maíz, caña de azúcar, y pastos (Morón *et al.* 1996, Nájera 1998). No use larvas provenientes de carretera a San Pedro Ayampuc en el bioensayo para optimizar el tiempo, ya que, por cada visita, solo lograba coleccionar de tres a cuatro larvas, probablemente por ser un cultivo muy pequeño (0.036 ha aproximadamente); mientras que en Moyuta, logre coleccionar 70 larvas en un solo día de colecta.

Esperaba hallar dos cepas entomopatógenas, una por cada larva disectada; sin embargo, aislé tres de una larva (“cepa 1”, “cepa 2” y “cepa 3”), y una de la otra (posible *Pseudomonas* sp.). No esperaba que la “cepa 1” manifestara actividad insecticida, ya que es un coco Gram positivo no formador de esporas, mientras que las cepas entomopatógenas de gallinas ciegas Gram positivas que han sido reportadas, son bacilos formadores de esporas. Esto se debe en gran parte a que la habilidad de una bacteria de formar esporas favorece la patogenicidad, ya que, además de dar resistencia a agentes químicos y físicos, en muchos casos, la esporulación favorece la síntesis de toxinas y factores de virulencia (Sonenshein 2000). Esto se evidencia en bacterias como *B. thuringiensis* y *P. popilliae*. *B. thuringiensis* en ocasiones sintetiza toxinas insecticidas durante su crecimiento vegetativo; sin embargo, la mayoría de los genes de toxinas que posee están bajo el control de factores sigma de esporulación específicos (σ^E y σ^K). Lo mismo sucede con *P. popilliae*, ya que la

transcripción del gen *cry18Aa*, que codifica una proteína de la familia Cry tóxica para gallinas ciegas, también depende de factores sigma de esporulación específicos (Adams *et al.* 1991, Agaisse y Lereclus 1994, Estruch *et al.* 1996, Schnepf *et al.* 1998, Zhang *et al.* 1998).

Es muy probable que la “cepa 1” sea en realidad un patógeno oportunista, ya sea de los que forman parte de la flora intestinal, de los que residen normalmente en el exoesqueleto como comensales inofensivos, o de los que se encuentran en el ambiente. Bucher (1981) señala que las infecciones bacterianas en insectos son frecuentemente causadas por las mismas especies que se encuentran en el tracto digestivo de insectos sanos, y que las infecciones ocurren cuando un estrés produce la falla de los mecanismos homeostáticos, permitiendo la multiplicación anormal de las bacterias dentro del tracto digestivo. Esto a la vez incrementa el estrés, y da lugar a que las bacterias invadan el hemocele, produciendo la muerte por septicemia. Este también puede ser el caso de la “cepa 3”, ya que la “cepa 2” fue la que provocó la tasa de mortalidad más alta (73% a las 24 h, y 100% a las 48 h), además de ser, junto con la “cepa 4”, las únicas que provocaron tasas de mortalidad significativas tanto a las 24 como 48 horas. Es probable que la “cepa 2” sea el patógeno primario, el cual infectó la larva de la cual la aislé, comprometiendo sus defensas, dando lugar a que tanto la “cepa 1” como la “cepa 3”, también infectarán la larva, provocando en conjunto con la “cepa 2”, la muerte por septicemia. Que estas dos cepas hayan provocado una tasa de mortalidad significativa solo a las 48 h de haber finalizado la inoculación, puede significar que, como patógenos oportunistas, posean determinantes de virulencia insuficientes y/o poco potentes, en comparación con la “cepa 2”, ya que los patógenos oportunistas requieren un defecto en las defensas de su hospedero, ya sean anatómicas o inmunológicas, para poder causar enfermedad (Ala’Aldeen y Wooldridge 2012).

Existe evidencia de cepas bacterianas filamentosas formadoras de esporas y cocos habitantes del suelo que infectan escarabeoideos. Se ha reportado a *Bacillus cereus* como un agente patógeno de larvas de *P. menetriesi* y *P. obsoleta* que causa la muerte por septicemia en un periodo de catorce días, por inoculación oral, en Costa Rica; y de larvas de *Phyllophaga anxia*, en Canadá, tanto por inoculación oral como por inyección (Poprawski y Yule 1990, Vargas y Abarca 1991). Otros autores también han implicado a

Diplococcus sp., y a *Micrococcus nigrofasciens* como patógenos de *Phyllophaga consanguínea*, *Phyllophaga vandinei* y *P. anxia*. Estas bacterias son ingeridas del suelo, y pueden producir septicemia en pocos días. En el caso de *M. nigrofasciens*, se considera que en la naturaleza puede ser un agente de control de gallinas ciegas importante (Poprawski y Yule 1990, Shannon 1996). Debido a esto no descarto la posibilidad de que tanto la “cepa 1” como la “cepa 3” puedan ser utilizadas como agentes de control biológico de gallinas ciegas.

La larva de la cual aislé la “cepa 4”, cuando la colecté, tenía una coloración anaranjada, por lo que pensé que la infección había sido causada por una cepa del género *Serratia* sp., ya que, según la literatura, las larvas infectadas por *S. marcescens* cambian de una coloración blanquecina a una rojiza (Hernández-Velázquez *et al.* 2010). Sin embargo; es muy probable que la cepa pertenezca en realidad al género *Pseudomonas* sp., ya que los medios de cultivo agar, en los cuales inoculé las alícuotas que obtuve del cuerpo de la larva enferma de donde la aislé, adquirieron una coloración azul verdosa. Esto es algo que sucede comúnmente en medios de cultivo agar con *Pseudomonas aeruginosa*, ya que esta bacteria secreta piocianina, el cual es un pigmento que se difunde en los medios de cultivo dándoles esta tonalidad (Iglewski 1996, Lau *et al.* 2004). La coloración de la larva al momento de colectarla en realidad se debió a que estaba en estado de prepupa, y de manera general, las pupas de los escarabeidos son anaranjadas. Esta cepa la aislé de forma casi exclusiva, probablemente gracias a la piocianina, ya que se conoce que este pigmento tiene cualidades bactericidas, retardando el crecimiento de algunas otras bacterias, facilitando de esta forma la colonización de la bacteria que la haya secretado (Iglewski 1996, Lau *et al.* 2004). Debido a que esta cepa, al igual que la “cepa 2”, provocó una tasa de mortalidad significativa, tanto a las 24 como 48 horas, y a que las bacterias del género *Pseudomonas* son bien conocidas como patógenos humanos oportunistas (Iglewski 1996), esta cepa presenta un gran potencial de uso como agente de control biológico de gallinas ciegas, al igual que la “cepa 2”. Poprawski y Yule (1990), y Shannon (1996) ya han reportado a *P. aeruginosa* y otras especies de *Pseudomonas* sp., como patógenos de *P. anxia* y *Phyllophaga smithi*, respectivamente. En el caso de *P. aeruginosa*, se ha encontrado de forma natural infectando huevos de *Phyllophaga* sp., y se ha visto que provoca septicemia

en larvas de *P. anxia* al inocularse por inyección, pero no por vía oral (Poprawski y Yule 1990).

Todas las larvas de los grupos experimentales mostraron un cambio de coloración de forma consistente a como ha sido reportado por otros autores, ya que las tonalidades de gris y negro se han reportado para especies de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, y *Acinetobacter*; además de cambios en la turgencia del cuerpo (Shannon 1996, Nuñez-Valdez *et al.* 2008, Hernández-Velázquez *et al.* 2010, Pineda-Castellanos *et al.* 2015). Los cambios de coloración son un síntoma que varía dependiendo de la especie de bacteria entomopatógena; y el de turgencia, está asociado a la destrucción de los tejidos internos de la larva, por lo que generalmente antecede a la muerte (Hernández-Velázquez *et al.* 2010).

La determinación del potencial de un organismo para su uso como agente de control biológico se hace en base a criterios como: especificidad, movilidad, virulencia (cuando son patógenos), persistencia, factibilidad, y costos de producción (Hernández-Velázquez *et al.* 2010). Por lo que los resultados de este estudio son solo un primer paso para poder considerar el control microbiano de plagas como las gallinas ciegas en Guatemala. Es necesario buscar más cepas entomopatógenas que puedan ser utilizadas para este fin, y realizar diferentes bioensayos con las mismas, no solo de inoculación intracelómica, sino que también de inoculación oral, al igual que determinar la dosis letal media de las nuevas cepas.

En términos generales, *Phyllophaga* se conforma por aproximadamente 839 especies en América, con 96 en Guatemala; sin embargo, se calcula que en todo el país deben existir al menos unas 120 especies. De las 96 especies conocidas, 49 (51%) son endémicas del país. Esto nos permite tener una idea acerca de la enorme biodiversidad de Guatemala al compararla con otros países, e inclusive entre departamentos (Cano *et al.* 2000, Barrios 2009). De esta misma manera, y aún más, debe de ser la diversidad de bacterias entomopatógenas en el país, por lo que es imperativa la investigación en este campo aún no explorado en Guatemala. Esto dará lugar al descubrimiento de factores de virulencia, y proteínas tóxicas contra coleópteros, y otros ordenes con insectos plaga, que, si se administran y usan bien, pueden contribuir al desarrollo del país, tanto en el sector económico y tecnológico, como en el de seguridad alimentaria.

V. CONCLUSIONES

- La especie que en mayor abundancia colecte fue *P. ravida*; contrario a lo que esperaba en base a la distribución conocida de *Phyllophaga* en Guatemala. Esto se debe probablemente a que en trabajos anteriores han confundido a esta especie con *P. tumulosa*, ya que se asemejan mucho.
- La “cepa 2” y la “cepa 4”, son las que presentan el mayor potencial de uso como agentes de control biológico de larvas de escarabajos del género *Phyllophaga* en Guatemala, provocando tasas de mortalidad estadísticamente significativas del 73% y 44% en 24 h ($x^2 = 15.124$, gl = 1, $p < 0.0125$; $x^2 = 6.582$, gl = 1, $p < 0.0125$); y del 100% y 88% en 48 h ($x^2 = 23.93$, gl = 1, $p < 0.0125$; $x^2 = 18$, gl = 1, $p < 0.0125$), respectivamente.
- La “cepa 1” y la “cepa 3”, provocaron tasas de mortalidad estadísticamente significativas solo a las 48 h de haber finalizado el bioensayo por inoculación intracelómica ($x^2 = 15.18$, gl = 1, $p < 0.0125$; $x^2 = 12.69$, gl = 1, $p < 0.0125$, respetivamente).
- Los resultados de este estudio son solo un primer paso para para poder considerar el control microbiano de plagas como las gallinas ciegas en Guatemala, tomando en cuenta su gran biodiversidad.

VI. RECOMENDACIONES

- Es necesario el aislamiento, selección y caracterización de cepas bacterianas entomopatógenas en el país, para poder considerar el control microbiano de plagas en Guatemala, y así contribuir al desarrollo del país en sectores como el económico, tecnológico, y el de seguridad alimentaria.
- Para esclarecer la virulencia de las cepas utilizadas en este estudio, y el de cepas por descubrir, es necesario realizar bioensayos por inoculación intracelómica con proteínas extracelulares, obtenidas mediante centrifugación y filtración de cultivos bacterianos en caldo, incubados por 24 y 48 horas, en larvas sanas de escarabajos del género *Phyllophaga*, y de otros géneros dentro del complejo “gallina ciega”.
- Además de bioensayos por inoculación intracelómica, es necesario realizar bioensayos por inoculación oral alimentando larvas sanas de escarabajos del género *Phyllophaga*, y de otros géneros dentro del complejo “gallina ciega”, con rodajas de zanahoria con un peso específico a manera de estandarizar la metodología, que hayan sido deshidratadas y rehidratadas con solución de bacterias entomopatógenas a cierta concentración previamente, para esclarecer la virulencia de las cepas utilizadas en este estudio, y el de cepas por descubrir.
- Es necesaria la determinación de la dosis letal media (DL 50) de las cepas utilizadas en este estudio, y el de cepas por descubrir, inoculando diferentes concentraciones de UFC/ml, iniciando por una concentración de 1×10^3 hasta 1×10^8 , en larvas sanas de escarabajos del género *Phyllophaga*, y de otros géneros dentro del complejo “gallina ciega”.
- Para determinar la cepa más recomendable con la cual poder continuar los estudios correspondientes, y así en un futuro desarrollar un bioinsecticida específico para gallinas ciegas del género *Phyllophaga* en Guatemala, además de lo anteriormente dicho, se recomienda realizar bioensayos en condiciones de invernadero que imiten las condiciones reales del campo, donde se tengan plántulas del cultivo de interés, con una gallina ciega en tercer instar de la especie de interés por plántula, donde por vertido en el sustrato, de solución bacteriana a una concentración en específico, se determine la

efectividad de las cepas utilizadas en este estudio, y el de cepas por descubrir, como agentes de control biológico de gallinas ciegas plaga.

- Se recomienda el uso del medio de cultivo caprilato-talos agar (caprylate-thallos agar, en inglés), antes del medio diferencial dnasa-azul de toluidina agar, para garantizar el aislamiento rápido de cepas entomopatógenas del género *Serratia*, cuando se sospeche que una larva está infectada por este género de bacterias.

VII. LITERATURA CITADA

- Adams, L.F., K.L. Brown y H.R. Whiteley. 1991. Molecular cloning and characterization of two genes encoding sigma factors that direct transcription from a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene promoter. *J. Bacteriol.* 173: 3846–3854.
- Agaisse, H. y D. Lereclus. 1994. Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the *cryIIIa* toxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol* 13: 97–107.
- Ahmed, I., A. Yokota, A. Yamazoe y T. Fujiwara. 2007. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1117–1125.
- Ala'Aldeen, D.A.A. y K.G. Wooldridge. 2012. Bacterial pathogenicity, p. 156–167. *En* Medical Microbiology. Elsevier.
- Alatorre-Rosas, R. 1999. Perspectiva del uso de nematodos entomopatógenos en México. *En* H.C. Arredondo-Bernal, J. Molina-Ochoa y V. Hernández-Velázquez (eds.). Potencial de nematodos entomopatógenos en el control de plagas. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Colima, Mexico.
- Alm, R.S., G.M. Villani, T. Yeh y R. Shutter. 1997. *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain buibui for control of japanese and oriental beetle larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Applied Entomology and Zoology* 32: 477–484.
- Aragón-García, A., M.Á. Morón, J. López-Olguín y L.M. Cervantes-Peredo. 2005. Ciclo de vida y conducta de adultos de cinco especies de *Phyllophaga* Harris, 1827 (Coleoptera: Melolonthidae; Melolonthinae). *Acta Zool. Mex* 21: 87–99.
- Asano, S., C. Yamashita, T. Iizuka, K. Takeuchi, S. Yamanaka, D. Cerf y T. Yamamoto. 2003. A strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* containing a novel *cry8* gene highly toxic to *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biological Control* 28: 191–196.
- Ayala, J.E. y L.E. Monterroso. 1988. Manejo de la gallina ciega. PRIAG, Guatemala, Guatemala.
- BANGUAT. 2018. Producto interno bruto trimestral cuarto trimestre del 2017 (año de referencia 2001).
- BANGUAT y URL. 2009. Cuenta integrada de tierra y ecosistemas (CITE). Sistema de contabilidad ambiental y económica integrada de Guatemala., No. 8. Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente: Universidad Rafael Landívar, Guatemala.
- Barrios, M. 2009. Distribución de *Phyllophaga* (Scarabaeidae: Melolonthinae) en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, Guatemala.

- Berkowitz, D.M. y W.S. Lee. 1973. A selective medium for the insolation and identification of *Serratia marcescens*. Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology.
- Bourguet, D., M. Desquilbet y S. Lemarié. 2005. Regulating insect resistance management: the case of non-Bt corn refuges in the US. *Journal of Environmental Management* 76: 210–220.
- Bravo, A., S. Sarabia, L. Lopez, H. Ontiveros, C. Abarca, A. Ortiz, M. Ortiz, L. Lina, F.J. Villalobos, G. Peña, M.E. Nuñez-Valdez, M. Soberón y R. Quintero. 1998. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4965–4972.
- Bucher, G.E. 1981. Identification of bacteria found in insects., p. 7–33. *En* H.D. Burges (ed.). *Microbial Control of Plant Pests and Diseases*. Academic Press, London.
- Burges, H.D. 1998. Formulation of mycoinsecticides. *En* *Formulation of Microbial Biopesticides Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments*. Springer Verlag.
- Cano, E.B. 2006. Taxonomía, densidad poblacional y predicción de la distribución del complejo “gallina ciega” (Coleoptera: Scarabaeidae), que ataca los cultivos de maíz (*Zea mays* L.) en Guatemala. Informe final, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología -CONCYT-, Guatemala.
- Cano, E.B., J. Monzón y J.C. Schuster. 2000. Las “gallinas ciegas” y los “ronrones” del género *Phyllophaga* (Coleoptera: Scarabaeidae) en Guatemala: diversidad, endemismo e importancia agrícola. *Revista Universidad del Valle de Guatemala* 19–24.
- Cano, E.B. y M.A. Morón. 1998. Las especies de *Phyllophaga* (Coleoptera: Scarabaeidae: Melolonthinae) de Guatemala. Diversidad, distribución e importancia., p. 7–18. *En* M.A. Morón y A. Aragón (eds.). *Avances en el estudio de la diversidad, importancia y manejo de los coleópteros edafícolas americanos*. Sociedad Mexicana de Entomología: Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- Caprio, M.A., N.P. Storer, M.S. Sisterson, S.L. Peck y A.H.N. Maia. 2008. Assessing the risk of the evolution of resistance to pesticides using spatially complex simulation models., p. 90–117. *En* M.E. Whalon, D. Mota-Sanchez y R.M. Hollingworth (eds.). *Global Pesticide Resistance in Arthropods*. CABI, Wallingford.
- De la Cruz, J. 1982. Clasificación de zonas de vida de Guatemala a nivel de reconocimiento.
- Devine, G.J., D. Eza, E. Oigusuku y M.J. Furlong. 2008. Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 25: 74–100.
- Diaz, L.B. 2015. Agricultura para la prosperidad de los territorios rurales en Guatemala: vincular el desarrollo agropecuario con la prosperidad del campo. The World Bank.

- Dix, A.M. 1997. The biology and ecology of broccoli white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) in the community of Chilascó, Baja Verapaz, Guatemala: an integrated approach to pest management. Thesis (Ph. D.), University of Georgia, Athens, Georgia.
- Duro, J.M., R.M. Monzón, R. Vásquez, G.R. González, G.P. García, J.C. Argueta y O.R. González. 2005. Atlas temático de la Republica de Guatemala. Serie de recursos naturales, sociales, productivos, amenazas y vulnerabilidad.
- Estrada, H.L. 1990. Géneros y especies de los insectos de la familia Scarabaeidae (gallina ciega) diagnóstico e identificación, p. 5. *En* Boletín Informativo. Bib. Orton IICA / CATIE.
- Estruch, J.J., G.W. Warren, M.A. Mullins, G.J. Nye, J.A. Craig y M.G. Koziel. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 5389–5394.
- Fridlender, B. 2000. p. 505. *En* Abstract Book I - XXI-International Congress of Entomology. Brazil.
- Grewal, P.S., S. Selvan y R. Gaugler. 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment, and reproduction. *Journal of Thermal Biology* 19: 245–253.
- Grimont, P.A.D., T.A. Jackson, E. Ageron y M.J. Noonan. 1988. *Serratia entomophila* sp. nov. associated with amber disease in the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38: 1–6.
- Hernández, A. 1994. El manejo integrado de la plaga (*Phyllophaga* spp.) en Guatemala. *En* Biología y control de los insectos del género *Phyllophaga*. CATIE: PRIAG, Turrialba, Costa Rica.
- Hernández-Velázquez, V.M., M.E. Núñez-Valdez, J. Ruiz-Vega, M.B. Nájera-Rincón y F.J. Villalobos. 2010. Uso de entomopatógenos. *En* Plagas del suelo. INIFAP: Colegio de Postgraduados: Universidad Autónoma Chapingo: Mundi Prensa, México.
- Hori, H., N. Suzuki, K. Ogiwara, M. Himejima, L.S. Indrasith, M. Minami, S. Asano, R. Sato, M. Ohba y H. Iwahana. 1994. Characterization of larvicidal toxin protein from *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui specific for scarabaeid beetles. *Journal of Applied Bacteriology* 76: 307–313.
- Iglewski, B.H. 1996. *Pseudomonas*. *En* S. Baron (ed.). *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas.
- Jackson, T.A., D.G. Boucias y J.-O. Thaler. 2001. Pathobiology of Amber Disease, Caused by *Serratia* Spp., in the New Zealand Grass Grub, *Costelytra zealandica*. *Journal of Invertebrate Pathology* 78: 232–243.
- Jackson, T.A. y D.J. Saville. 2000. Bioassays of replicating bacteria against soil-dwelling insect pests, p. 73–93. *En* A. Navon y K.R.S. Asher (eds.). *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*. CABI Publishing, Wallingford, UK.

- Klein, M.G. 1981. Advances in the use of *Bacillus popilliae* for pest control., p. 183–192. En H.D. Burges (ed.). Microbial Control of Pests and Plant Diseases. Academic Press, New York.
- Klein, M.G. 1988. Pest management of soil-inhabiting insects with microorganisms. Agriculture, Ecosystems y Environment 24: 337–349.
- Koppenhöfer, A.M., T.A. Jackson y M.G. Klein. 2012. Bacteria for use against soil-inhabiting insects, p. 129–149. En Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Elsevier.
- Laengle, T., B. Pernfuss, C. Seger y H. Strasser. 2005. Field efficacy evaluation of *Beauveria brongniartii* against *Melolontha melolontha* in potato cultures. Sydowia 57: 54–93.
- Lau, G.W., D.J. Hassett, H. Ran y F. Kong. 2004. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. Trends in Molecular Medicine 10: 599–606.
- MAGA. 2018. Informe de situación de maíz blanco. Agosto 2018. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Guatemala, Guatemala.
- Martín, J.C. y S. Martínez. 2006. Intoxicación por insecticidas. Jano: Medicina y humanidades 43–46.
- Morón, M.A., S. Hernández-Rodríguez y A. Ramírez-Campos. 1996. El complejo “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae) asociado con la caña de azúcar en Nayarit, México. Folia Entomológica Mexicana 1–44.
- Mukuka, J., O. Strauch, C. Hoppe y R.-U. Ehlers. 2010. Improvement of heat and desiccation tolerance in *Heterorhabditis bacteriophora* through cross-breeding of tolerant strains and successive genetic selection. BioControl 55: 511–521.
- Nájera, M.B. 1998. Diversidad y abundancia del complejo “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae) en agroecosistemas de maíz de la región templada de Michoacán, México., p. 99–106. En M.A. Morón y A. Aragón (eds.). Avances en el estudio de la diversidad, importancia y manejo de los coleópteros edafícolas americanos. Sociedad Mexicana de Entomología: Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- Núñez-Valdez, M.E., M.A. Calderón, E. Aranda, L. Hernández, R.M. Ramírez-Gama, L. Lina, Z. Rodríguez-Segura, M. del C. Gutiérrez y F.J. Villalobos. 2008. Identification of a putative mexican strain of *Serratia entomophila* pathogenic against root-damaging larvae of Scarabaeidae (Coleoptera). Appl Environ Microbiol 74: 802–810.
- O’Callaghan, M. y T.A. Jackson. 1993. Isolation and enumeration of *Serratia entomophila* -a bacterial pathogen of the New Zealand grass grub, *Costelytra zealandica*. Journal of Applied Bacteriology 75: 307–314.
- Ongley, E.D. 1997. Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos, Estudio FAO riego y drenaje. FAO, Roma.
- Onstad, D.W. (Ed.). 2014. Insect resistance management: biology, economics, and prediction. Elsevier, Ámsterdam; Boston.

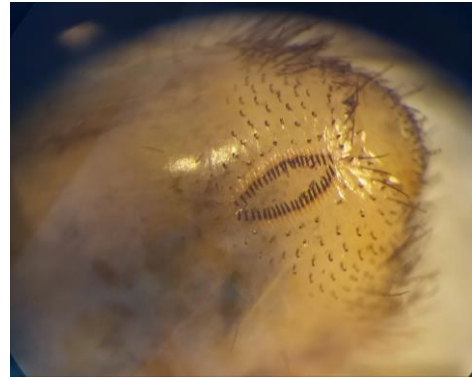
- Palmieri, M. 1982. Estudio básico del efecto de factores físicos sobre la incidencia de “ronrones de mayo” (*Phyllophaga*) y géneros afines) a trampas de luz en la ciudad de Guatemala. Tesis Licenciatura en Biología, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala, Guatemala.
- Patil, C.D., S.V. Patil, B.K. Salunke y R.B. Salunkhe. 2012. Insecticidal potency of bacterial species *Bacillus thuringiensis* SV2 and *Serratia nematodiphila* SV6 against larvae of mosquito species *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, and *Culex quinquefasciatus*. Parasitol. Res. 110: 1841–1847.
- Pineda-Castellanos, M.L., Z. Rodríguez-Segura, F.J. Villalobos, L. Hernández, L. Lina y M.E. Nuñez-Valdez. 2015. Pathogenicity of Isolates of *Serratia marcescens* towards larvae of the scarab *Phyllophaga Blanchardi* (Coleoptera). Pathogens 4: 210–228.
- Poprawski, T.J. y W.N. Yule. 1990. Bacterial pathogens of *Phyllophaga* spp. (Col., Scarabaeidae) in southern Quebec, Canada. Journal of Applied Entomology 109: 414–422.
- Porter, A.G., E.W. Davidson y J.W. Liu. 1993. Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. Microbiol. Rev. 57: 838–861.
- Ramírez-Salinas, C., M.A. Morón y A. Castro-Ramírez. 2000. Descripción de los estados inmaduros de seis especies de *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae; Melolonthinae) de la región Altos de Chiapas, México. Folia Entomol. Mex. 73–106.
- Ruppert, E.E., R.S. Fox y R.D. Barnes. 2004. Invertebrate zoology: a functional evolutionary approach. Thomson-Brooks/Cole, Belmont, CA.
- Sato, R., K. Takeuchi, K. Ogiwara, M. Minami, Y. Kaji, N. Suzuki, H. Hori, S. Asano, M. Ohba y H. Iwahana. 1994. Cloning, heterologous expression, and localization of a novel crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui toxic to scarabaeid insects. Current Microbiology 28: 15–19.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler y D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 775–806.
- Sezen, K., I. Demir, H. Kati y Z. Demirbag. 2005. Investigations on bacteria as a potential biological control agent of summer chafer, *Amphimallon solstitiale* L. (Coleoptera: Scarabaeidae). J. Microbiol. 43: 463–468.
- Shannon, P.J. 1996. Control microbiano de *Phyllophaga* spp. (Col.:Melolonthidae)., p. 80–93. En P.J. Shannon y M. Carballo (eds.). Biología y control de *Phyllophaga* Spp. CATIE: PRIAG/ALA 88/23, Turrialba, Costa Rica.
- Shannon, P.J. y M. Carballo (Eds.). 1996. Biología y control de *Phyllophaga* spp., Serie técnica. CATIE: PRIAG/ALA 88/23, Turrialba, Costa Rica.

- Sonenshein, A.L. 2000. Endospore-forming bacteria: an overview, p. 133–150. *En* Y.V. Brun y L.J. Shimkets (eds.). Prokaryotic Development. American Society of Microbiology, Washington DC.
- Suzuki, N., H. Hori, K. Ogiwara, S. Asano, R. Sato, M. Ohba y H. Iwahana. 1992. Insecticidal spectrum of a novel isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar *Japonensis*. *Biol. Control* 2: 136–142.
- Tabashnik, B.E., D. Mota-Sanchez, M.E. Whalon, R.M. Hollingworth y Y. Carrière. 2014. Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. *J. Econ. Entomol.* 107: 496–507.
- Trumper, E.V. 2014. Resistencia de insectos a cultivos transgénicos con propiedades insecticidas: teoría, estado del arte y desafíos para la república argentina. *Agriscientia* 31: 109–126.
- Vargas, E. y G. Abarca. 1991. Patogenicidad de *Bacillus cereus* y *Erwinia* spp., sobre jobotos del género *Phyllophaga* spp. (Col.: Scarabaeidae). *Agronomía Costarricense* 15: 157–162.
- Velásquez, M. 1994. Descubrimientos. Boletín informaiivo, ICTA, Guatemala.
- Velásquez, M. 1996. Incidencia y control del complejo *Phyllophaga* spp. en Guatemala, p. 1–5. *En* P.J. Shannon y M. Carballo (eds.). Biología y control de *Phyllophaga* spp. CATIE: PRIAG/ALA 88/23, Turrialba, Costa Rica.
- Yu, H., J. Zhang, D. Huang, J. Gao y F. Song. 2006. Characterization of *Bacillus thuringiensis* Strain Bt185 toxic to the asian cockchafer: *Holotrichia parallela*. *Current Microbiology* 53: 13–17.
- Zhang, J., T.C. Hodgman, L. Krieger, W. Schmetter y H.U. Schairer. 1997. Cloning and analysis of the first cry gene from *Bacillus popilliae*. *J. Bacteriol.* 179: 4336–4341.
- Zhang, J., H.U. Schairer, W. Schmetter, D. Lereclus y H. Agaisse. 1998. *Bacillus popilliae* cry18Aa operon is transcribed by σ^E and σ^K forms of RNA polymerase from a single initiation site. *Nucleic Acids Res.* 26: 1288–1293.

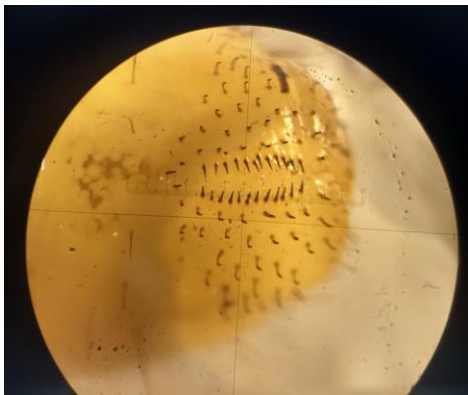
VIII. ANEXOS



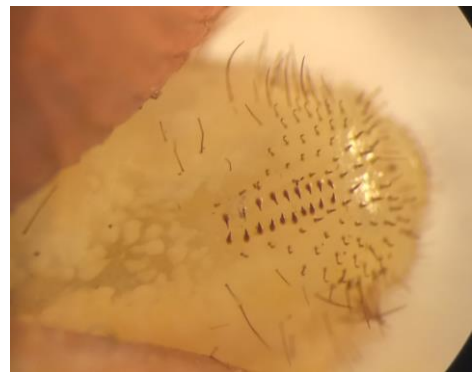
ANEXO 1. Larva de *P. ravida* en crianza.



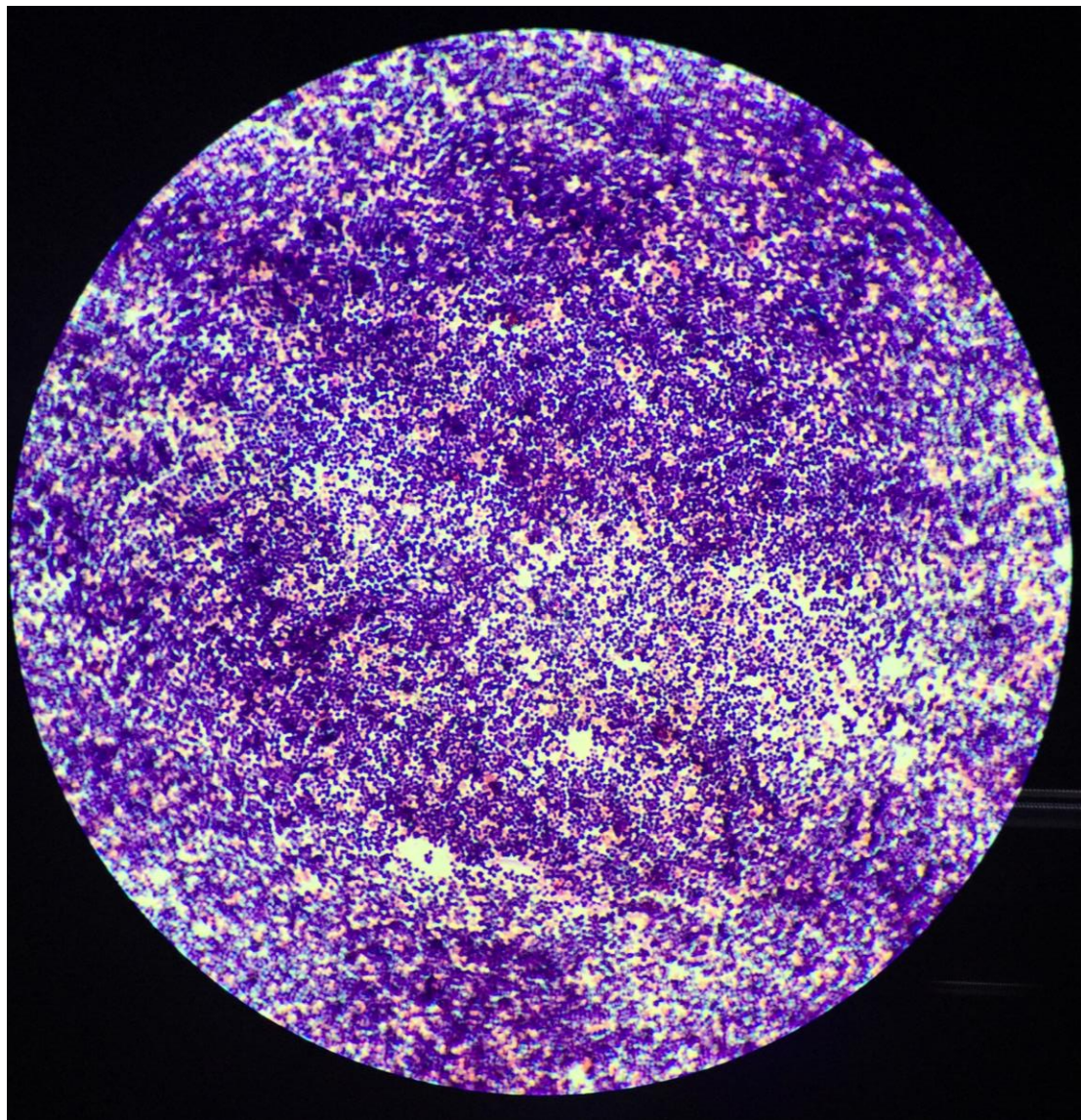
ANEXO 2. Palidia de *Phyllophaga* sp. semejante a la de *P. testaceipennis*, 160x de aumento.



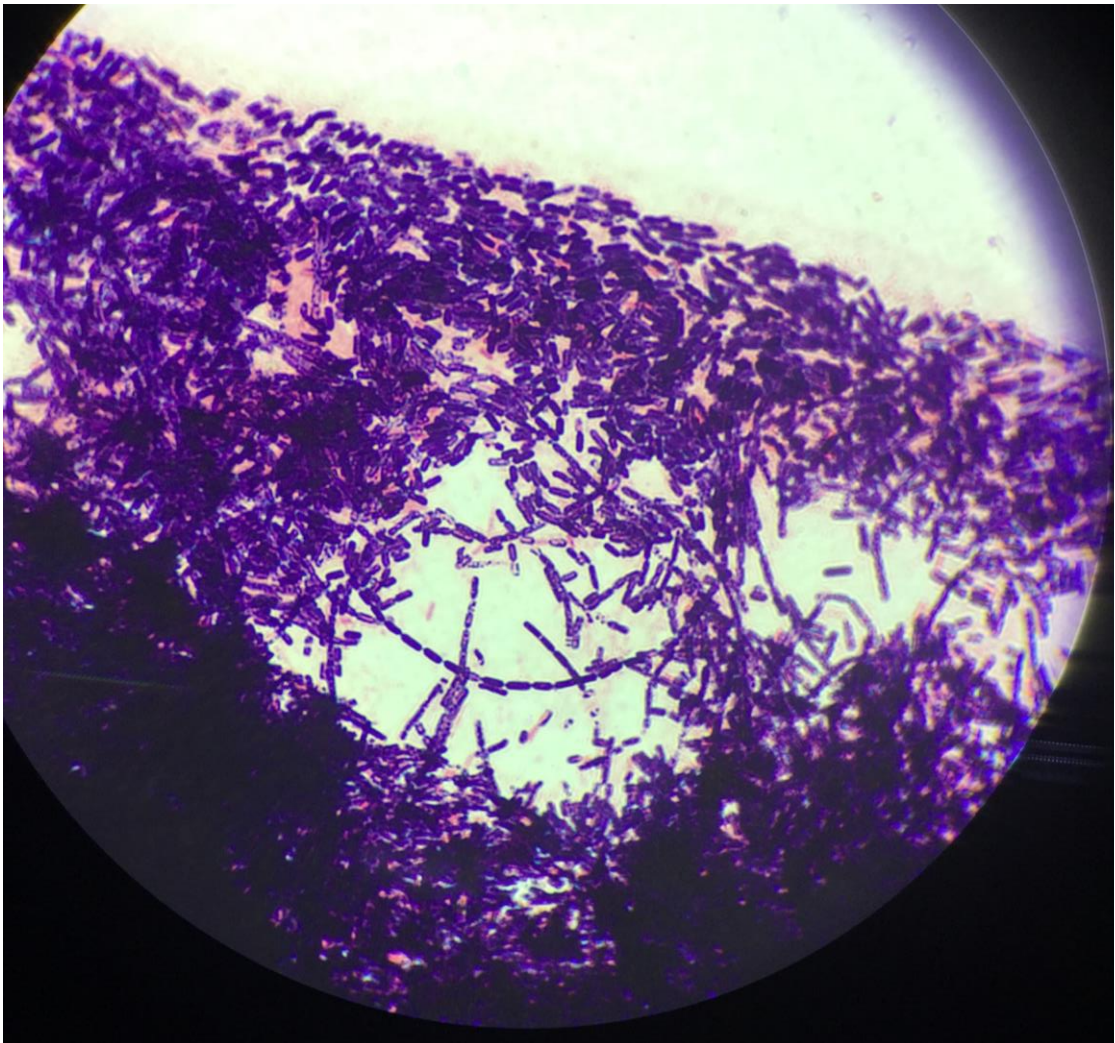
ANEXO 3. Palidia de *Phyllophaga* sp. semejante a la de *P. obsoleta*, 160x de aumento.



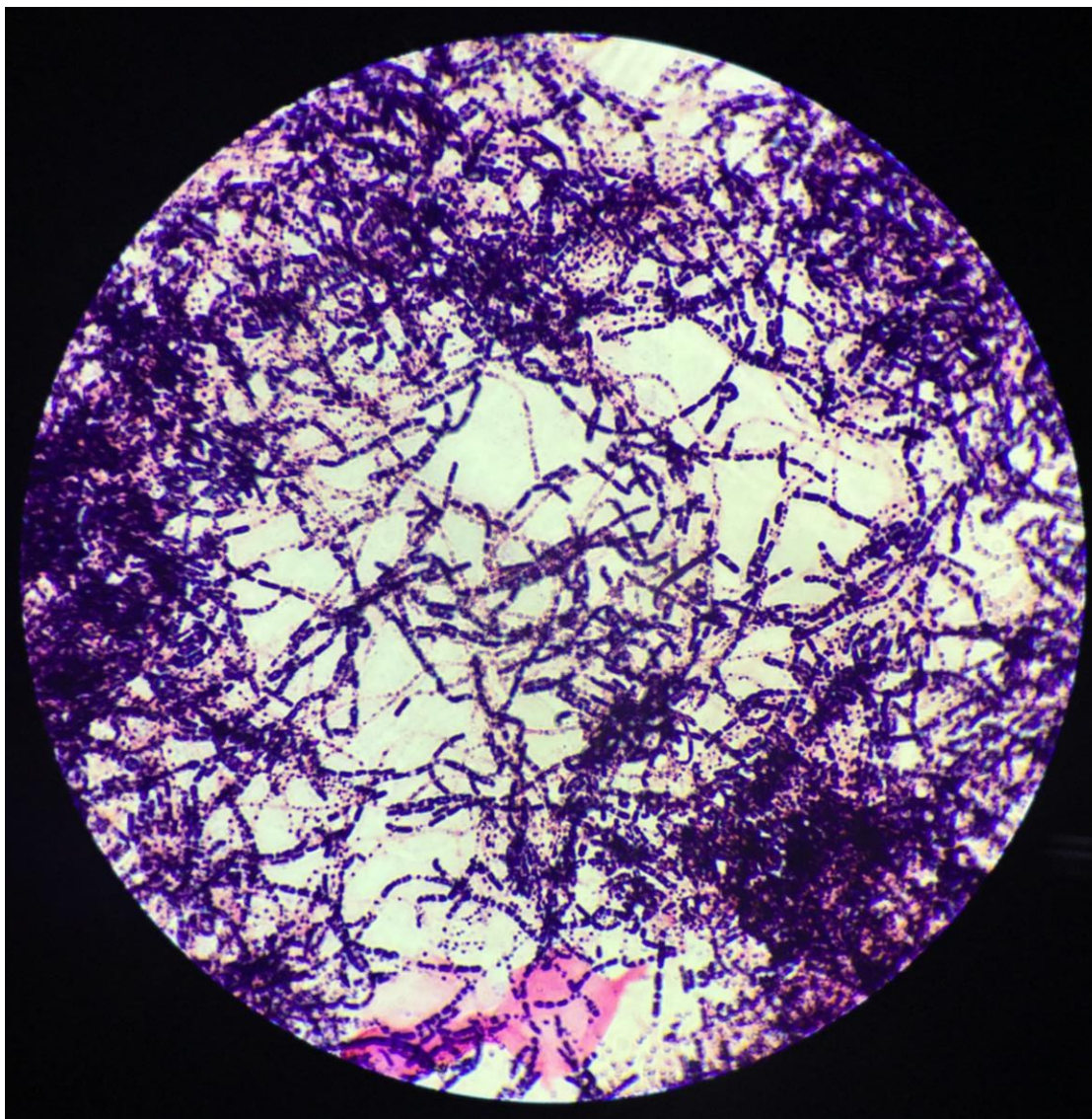
ANEXO 4. Palidia de *Phyllophaga* sp. semejante a la de *P. tumulosa*, 160x de aumento.



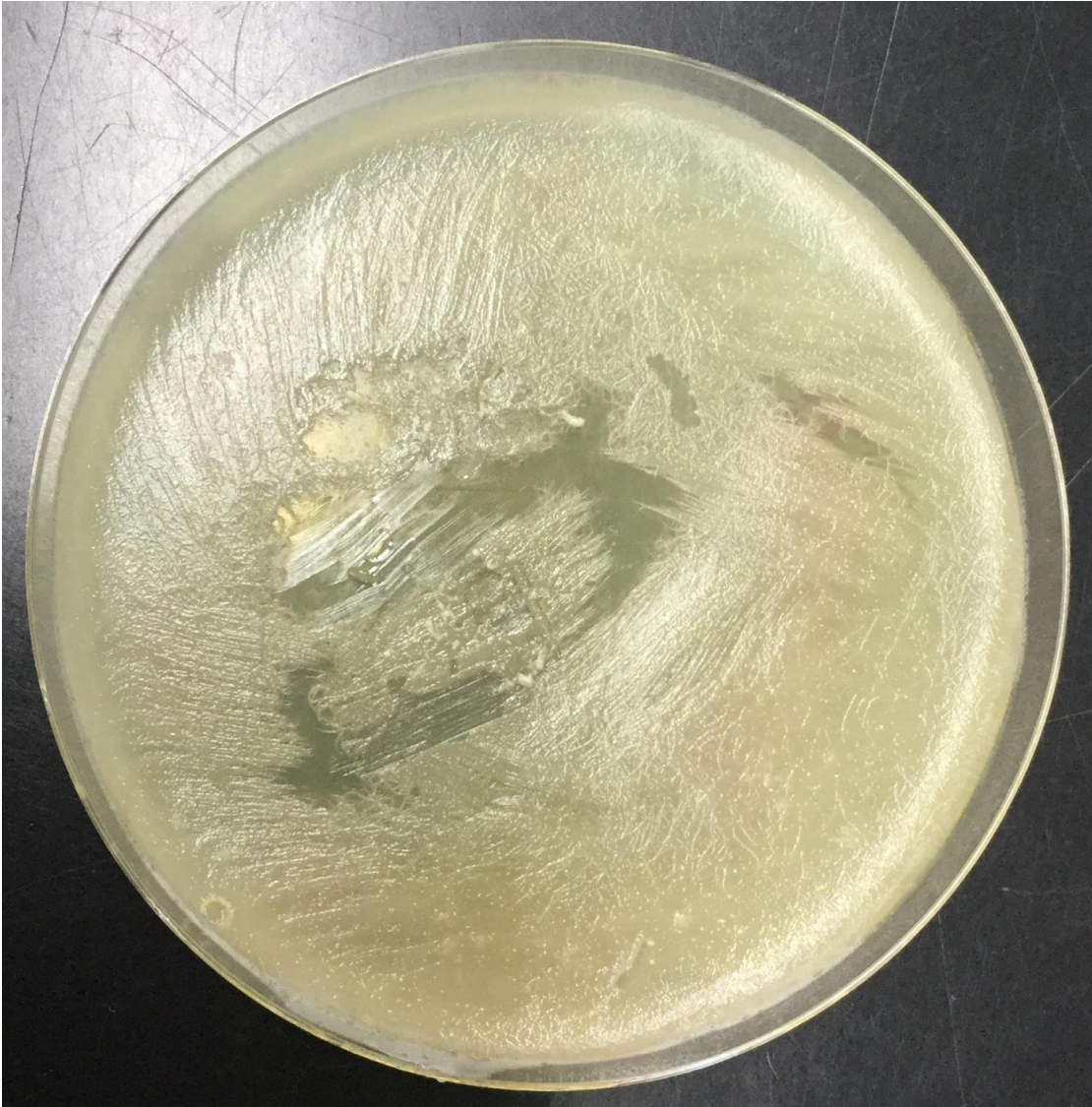
ANEXO 5. "Cepa 1", 1000x de aumento.



ANEXO 6. "Cepa 2", 1000x de aumento.



ANEXO 7. "Cepa 3", 1000x de aumento.



ANEXO 8. Morfología colonial de la “cepa 3”.



ANEXO 9. Cuerpo de larva de *Cyclocephala* sp. muerta, proveniente de Moyuta, Jutiapa, del cual aislé la “cepa 4”.



ANEXO 10. Cuerpo de larva muerta de *P. ravidia* inoculada con la “cepa 1”.



ANEXO 11. Cuerpo de larva muerta de *P. ravidia* inoculada con la “cepa 2”.



ANEXO 12. Cuerpo de larva muerta de *P. ravidia* inoculada con la “cepa 3”.



ANEXO 13. Cuerpo de larva muerta de *P. ravidia* inoculada con la “cepa 4”.



ANEXO 14. Larva sana de *P. ravidia* del grupo control.