

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Y AGROPECUARIAS**



**Genética Poblacional de *Phyllophaga obsoleta***  
**(Blanch) (Coleoptera: Melolonthidae)**  
**en Amatenango del Valle, Chiapas**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA:**  
**GUILLERMO DÁVILA OROZCO**

**LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO. NOVIEMBRE DE 2005**



**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y**  
**Agropecuarias**

*Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura  
en Biología*

165/ C. C. BIOLÓGIA

**C. GUILLERMO DÁVILA OROZCO**  
**PRESENTE**

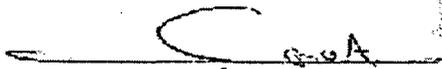
Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título : "GENÉTICA POBLACIONAL DE *Phyllophaga obsoleta* (Blanch) (Coleoptera:Melolonthidae) en Atenango del Valle Chiapas" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo al M en c. **LORENA RUIZ MONTOYA** y como asesor / a M en C. **JOSÉ LUIS NAVARRETE HEREDIA**

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan., 25 de Abril del 2005

  
**DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

  
**DRA. ANA ISABEL RAMÍREZ QUINTANA**  
**SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

C.c.p. M en c. **LORENA RUIZ MONTOYA** - Director del trabajo

Guadalajara Jalisco, 15 de septiembre del 2005

Dr. Carlos Álvarez Moya.  
Presidente del Comité de Titulación.  
Carrera de Licenciado en Biología.  
CUCBA.  
Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad TESIS E INFORMES, opción TESIS con el título: "**Genética Poblacional de *Phyllophaga obsoleta* (Blanch) (Coleoptera:Melolonthidae) en Amatenango del Valle, Chiapas**" que realizó el pasante Guillermo Dávila Orozco con número de código 396828233 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

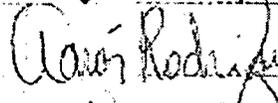
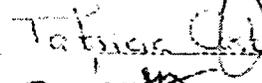
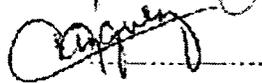
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente

  
Dra. Lorena Ruiz Montoya  
Directora

  
M. en C. José Luis Navarrete Heredia  
Asesor

*V. B. O.*  
Carlos Álvarez Moya  
Coordinador de Carrera  
*20/10/05*

Nombre completo de los Síndicos asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Gustavo Moya Raygoza		03/oct/2005
Dr. Aarón Rodríguez Contreras		04/oct/2005
M en C. Patricia Castro Félix		11/oct/05
Dr. Marcelino Vázquez García		18/oct/05

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A mi familia**

A mis hermanos y padres que con su paciencia, confianza y apoyo brindado me alentaron a seguir con mi formación profesional como Licenciado en Biología

### **A mis amigos**

A todos aquellos que hoy no son nombrados pero que en algún momento de mi carrera con su amistad lograron hacer más fácil y divertido el camino recorrido.

### **A mis asesores**

A Lorena Ruiz Montoya y a Adriana Castro Ramírez por permitirme participar en este proyecto. También les agradezco su apoyo recibido por su guía y asesorías a José Luis Navarrete Heredia, Adriana Castro Félix, Aarón Rodríguez Contreras, Gustavo Moya Raygoza y Marcelino Vázquez García por leer y darme sus valiosas sugerencias para mejorar la tesis.

### **A mis compañeros de trabajo**

Expreso un gran agradecimiento a Eduardo Velásquez Cruz, Guadalupe Andraca Gómez, Cutberto Pacheco Flores, Noemí Berenice Rodríguez Mendoza, Concepción Ramírez Salinas y a María de Jesús Méndez Aguilar por sus ideas y trabajo en campo, ya que sin ellos no hubiera sido posible realizar esta tesis.

### **A las instituciones**

Universidad de Guadalajara (CUCBA) y El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) Unidad San Cristóbal, por la formación que de ellas obtuve. A la Fundación Produce Chiapas, A.C. por el apoyo económico otorgado para la realización de mi tesis a través del financiamiento del proyecto "Evaluación de estrategias para el manejo de la gallina ciega: impacto sobre la densidad de larvas y genética de poblaciones de larvas y adultos" otorgado a la Dra. Lorena Ruiz-Montoya y al proyecto Dinámica de poblaciones y comunidades de insectos de ECOSUR por las facilidades logísticas y de infraestructura.

## INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTE.....	2
<b>Biología y Taxonomía de <i>Phyllophaga obsoleta</i></b> .....	2
Ubicación taxonómica.....	2
Descripción.....	2
Distribución.....	4
Hábitat.....	4
Ciclo de vida.....	5
Reproducción.....	5
Alimentación.....	6
Enemigos naturales.....	6
<b>Daños ocasionados por larvas de <i>Phyllophaga obsoleta</i></b> .....	7
Daños a los cultivos.....	7
Pérdidas económicas.....	8
<b>Estrategias de manejo</b> .....	8
Control químico.....	8
Control biológico.....	9
Supresión manual.....	9
Composta.....	10
Manejo integrado de plagas.....	10
<b>Genética de poblaciones</b> .....	11
JUSTIFICACIÓN.....	13
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
<b>Área de estudio</b> .....	15
Municipio de Amatenango del Valle.....	15
Poblado de Amatenango del Valle.....	16
Aljó.....	16
San Nicolás.....	16
Los Olivos.....	16
<b>Diseño experimental para la evaluación de estrategias sobre el crecimiento del maíz, sobrevivencia de larvas y genética de larvas</b> .....	17
<b>Mortalidad de adultos y huevos en laboratorio</b> .....	19
<b>Genética de adultos</b> .....	19
<b>Análisis genéticos de larvas y adultos</b> .....	20
<b>Análisis estadísticos</b> .....	21
Crecimiento del maíz y sobrevivencia de larvas en campo.....	21
Genética de larvas y adultos.....	21
RESULTADOS.....	23
<b>Crecimiento del maíz</b> .....	23
<b>Mortalidad de adultos y huevos en laboratorio</b> .....	25
<b>Sobrevivencia de larvas en campo</b> .....	25
<b>Genética de larvas</b> .....	27
<b>Genética de adultos</b> .....	31
DISCUSIÓN.....	36
<b>Crecimiento del maíz</b> .....	36
<b>Sobrevivencia de larvas (mortalidad en laboratorio, sobrevivencia en campo y genética)</b> .....	37
<b>Genética de adultos</b> .....	40
CONCLUSIONES.....	42
LITERATURA CITADA.....	43
APÉNDICE 1.....	49
APÉNDICE 2.....	50

Genética Poblacional de *Phyllophaga obsoleta* (Blanch)  
(Coleoptera: Melolonthidae) en Amatenango del Valle, Chiapas.

**RESUMEN**

*Phyllophaga obsoleta* (Blanch) es un escarabajo melolóntido, cuyas larvas forman parte del complejo gallina ciega. Este complejo es plaga importante de cultivos de maíz por alimentarse de su sistema radicular. Cada año se registran grandes pérdidas económicas ocasionadas por la actividad de sus larvas. Ante esta situación, es necesario diseñar y evaluar métodos de control contra gallina ciega. Para el diseño de métodos de control contra *P. obsoleta* es preciso el conocimiento sobre su diversidad genética. La teoría de la genética poblacional es útil para reconocer el grado de diferenciación genética entre las poblaciones y valorar la conveniencia de hacer manejo local o regional, así como para reconocer el potencial evolutivo de las resistencias a estrategias de manejo. El presente trabajo tiene por objetivos: (1) Determinar los efectos de la aplicación de composta y el hongo *Beauveria bassiana* (Bálsamo) en el crecimiento del maíz, en la mortalidad en laboratorio, sobrevivencia en campo y estructura genética de larvas de *P. Obsoleta* y (2) determinar la diversidad y la estructura genética de cuatro poblaciones de adultos de *P. obsoleta* en Amatenango del Valle, Chiapas. Los loci allo/iso-enzimáticos empleados para determinar la estructura y diversidad genética de larvas y adultos de *P. obsoleta* fueron EST, GOT-1, GOT-2, EM-1, y EM-2. La aplicación de composta tuvo efecto positivo en el desarrollo inicial del maíz. En todos los tratamientos se encontró un bajo número de larvas, lo que no permite mostrar si el hongo tuvo efecto en su mortalidad. En condiciones de laboratorio el hongo incremento la mortalidad de la especie. El hongo disminuyo la diversidad genética de las larvas y la composta la aumentó. Estos cambios no fueron suficientes para que se observara una diferenciación genética relevante entre tratamientos. La diferenciación entre las poblaciones de adultos es baja pero mantienen altos niveles de diversidad genética. Hay factores que actúan en todas las poblaciones a favor de los heterocigotos. La estructura de machos y hembras es diferente.

Palabras claves: Alelo, Allo/iso-enzimas, *Beauveria bassiana*, Diferenciación genética, Gallina ciega, Heterocigosidad, Polimorfismo.

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### Biología y taxonomía de *Phyllophaga*

Ubicación taxonómica (Endrodi 1966)

CLASE: Insecta

ORDEN: Coleoptera

FAMILIA: Melolonthidae

SUBFAMILIA: Melolonthinae

TRIBU: Melolonthini

SUBTRIBU: Rhizotrogina

GÉNERO: *Phyllophaga*

SUBGÉNERO: *Phytalus*

ESPECIE: *Phyllophaga obsoleta* (Blanch, 1850)

En México, la tribu Rhizotrogina está representada sólo por el género *Phyllophaga* con 246 especies. Esta cantidad representa el 27 % del total de especies de la familia Melolonthidae con 918 especies y el 50 % de las especies de la subfamilia Melolonthinae con 467 (Morón 1996; 2001; 2003).

#### Descripción

Los adultos de *Phyllophaga obsoleta* tiene una longitud promedio de 16-20 mm y 6-8 mm de ancho (Figura 1a). Su coloración es parda amarillenta con el pronoto y los apéndices pardo rojizos, el dorso es glabro y brillante y las antenas tienen 10 artejos. Los espolones metatibiales apicales se encuentran articulados y las uñas tarsales están hendidas con la proyección inferior más larga que la superior. Los machos tienen una amplia depresión mesial en los esternitos cubiertas de abundantes sedas. El quinto esternito presenta una proyección laminar ornamentada que cubre parte de la placa anal. Las hembras tienen un tubérculo preapical en la placa pigidial (Morón 1997). Las pupas de *Phyllophaga* son de color pardo ambarino y miden de 15 a 23 mm de longitud. Los huevos del género son de color blanco perlado de forma ovoideo esféricos de 1.5 a 3 mm de longitud. Las larvas de

*Phyllophaga* son del tipo escarabiformes y pasan por tres estadios (Figura. 1b). Son de color blanco grisáceo o blanco cremoso y con forma de “U” o “C”. La cabeza es de color café amarillento con mandíbulas fuertes y presentan tres pares de patas bien desarrolladas (Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez 2000).

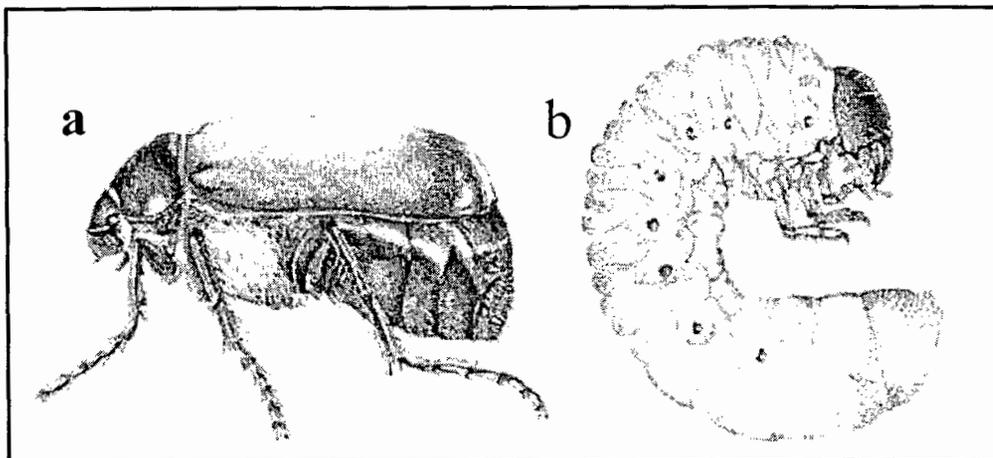


Figura 1: Adulto (a) y Larva (b) de *Phyllophaga* sp (Morón 2001, Castro- Ramírez et al. 2004).

En general, las diferencias entre las especies de gallina ciega pueden observarse con mayor facilidad en su tercer estadio. Las larvas en tercer estadio de *Phyllophaga obsoleta* miden 3.11 cm y su cuerpo no es muy robusto. El tamaño de la palidia varía de 1.5 a 1.8 mm de longitud y 0.4 a 0.5 mm de anchura y esta formada por líneas curvas con forma de huso sin unirse a los extremos. El número de pali presentes es de 17 a 27 con forma aguzadas separados en su base por una distancia menor o igual que el ancho basal de cada palus. Generalmente se observan 30 o menos sedas en las tegillas y el palidium tiene aproximadamente 20 o menos pali. La cápsula cefálica mide en promedio 4.5 mm de anchura, con 8 a 13 sedas frontales anteriores y 3 a 5 sedas dorso epicraneales. La epifaringe tiene en promedio 2 mm de ancho y 1.5 mm de longitud. Los plegmatas presentan entre de 9 a 14 plegmas. Las especies que pueden confundirse fácilmente con las larvas de *P. obsoleta* son *P. raviada* (Blanch) y *P. tenuipilis* (Bates) (Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez 1998).

### Distribución

*Phyllophaga obsoleta* es una especie muy común y amplia distribución. Se le encuentra desde el sur de los Estados Unidos de Norteamérica hasta Venezuela. En México se tienen registros en 14 estados (Figura 2). En la región de los altos de Chiapas está distribuida en los municipios de Aguacatenango, Amatenango del Valle, Balún Canal, Bochil, El Madronal, Juznajib. Majosik, Navil, Oxchuc, Pacvilná, Piedra Escrita, Las Piedrecitas, San Cristóbal de las Casas, Tenejapa, Teopisca, Tzunuzum, Winikton, Yalumá y San Francisco (Castro-Ramírez *et al.* 2004, Morón 2003).



Figura 2: Distribución de *Phyllophaga obsoleta* en México.

### Hábitat

*Phyllophaga obsoleta* habita desde los 800 hasta los 2500 m de altitud en diferentes tipos de vegetación que no sean secos (Morón 2001). Los huevo, larvas y pupas son estrictamente edafícolas, los adultos, emergen del suelo en las tarde para iniciar su actividad (~ 7-10 p.m.) y son atraídos fuertemente por las fuentes de luz eléctrica (Gómez *et al.* 1999a, Cruz-López *et al.* 2001, Castro-Ramírez *et al.* 2003). Tanto adultos larvas, pupas y huevos son observados en el suelo desde los 2 hasta los 50 cm de profundidad (Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez 2000). Las raíces vivas y los suelos ligeramente ácidos, sueltos y bien drenados parecen ser cruciales para la sobrevivencia de la especie durante su vida edafícola (King 1994).

### Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Phyllophaga obsoleta* es anual. La mayor parte de la vida de esta especie se desarrolla en el suelo ya que los adultos sólo se desentierran unas cuantas horas por las noches (Figura 3). Después a las dos o tres primeras lluvias de la temporada (abril y mayo en Chiapas ), los adultos salen a la superficie para alimentarse y copular. Entre mayo y junio y a los 11 días después de la cópula las hembras depositan sus huevos. A 17 días las larvas eclosionan. En julio y agosto las larvas pasan al tercer estadio. Durante diciembre y enero las larvas de tercer estadio empiezan a perder movimientos y se encierran en cámaras ovoides. En febrero las larvas pupan y el adulto emerge nuevamente con las primeras lluvias, comenzando un nuevo ciclo (Ramírez-Salinas *et al.* 1999).

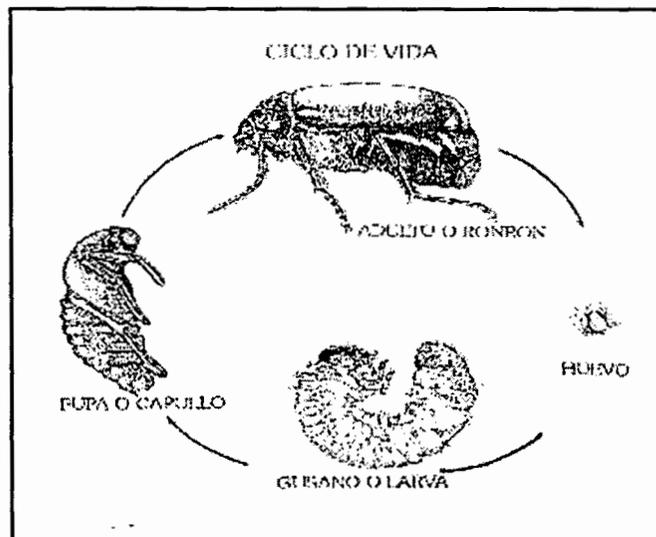


Figura 3: Ciclo de vida de *Phyllophaga obsoleta* (Castro-Ramírez *et al.* 2004)

### Reproducción

En San Cristóbal de las Casas, Chiapas, la cópula de *Phyllophaga obsoleta* se desarrolla entre las 7:15 y las 8:00 pm sobre el suelo o en hospederos de los que se alimentan los adultos (Gómez *et al.* 1999a). Las hembras de este género tienen una preferencia notable por depositar sus huevos en suelos ricos en humus y bajo gramíneas (King 1994). La proporción sexual y la cantidad de huevos que depositan las hembras de *Phyllophaga obsoleta* varía dependiendo de la localidad. En Honduras se encontró que la proporción sexual de la especie es 1:1, las hembras maduras sexualmente capturadas en el suelo tenían

un promedio de 14 huevos y las capturadas con trampas de luz presentaron un promedio de 8 huevos (Vásquez 2003). Cruz-López *et al.* (2001) señala que en la comunidad chiapaneca El Madronal la proporción sexual de *P. obsoleta* fue de 2:1 (macho hembra) y el promedio de huevecillos por hembra durante ese ciclo agrícola fue de 9.4 al finalizar las cuatro semanas de recolección. En San Cristóbal de Las Casa se ha observado que las hembras de esta especie depositan un promedio de 42 huevos con un máximo de 62. La variabilidad en la cantidad de huevos encontrados en las hembras del género *Phyllophaga* se debe a que depositan sus huevo por partes. Así, al transcurrir las semanas la cantidad de huevos por hembra disminuye, sesgando considerablemente los resultados (Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez 2000).

#### Alimentación

La alimentación de *Phyllophaga* es muy diversa y cambia según el estadio en el que se encuentre. Las larvas se alimentan de materia orgánica, de raíces de árboles frutales, forestales y hortalizas como papa, acelga, repollo, brócoli, zanahoria, cilantro, cebolla, chile, tomillo y maíz (Ramírez-Salinas *et al.* 1999). Los adultos se alimentan del follaje de una gran variedad de árboles entre los cuales se encuentran los géneros *Quercus*, *Guazuma*, *Senecio*, *Eyitrina*, *Acacia*, *Cuphea* y *Crataegus* (Morón 1997, Gómez *et al.* 1999a).

#### Enemigos naturales

Los adultos de *Phyllophaga obsoleta* son depredados comúnmente por murciélagos, aves, reptiles, mamíferos y anfibios. También se ha observado que son consumidos por hormigas, escarabajos del género *Calosoma* y arañas de la familias Thomisidae y Agelenidae. Las larvas son alimento de aves, tejones, mapache, zorrillos, tlacuaches, cacomixtles, armadillos, coatíes y musarañas (Morón 1986). Se han encontrado ácaros asociados con adultos y larvas sin determinar el tipo de relación (foresis, simbiosis, parásito). También se tienen registro de dípteros e himenópteros (*Thipia*, *Compsomeria*, *Scolia*, *Pelecinius*) como endoparásitos de este género (Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez 1999). Las larvas de *Phyllophaga* pueden ser huésped de acantocéfalos y ser parasitados por nemátodos o protozoos. Otros factores que pueden causar la muerte de *P. obsoleta* en cualquiera de sus estadios son los hongos *Beauveria* y *Metarhizium* (Morón 1986, Gómez *et al.* 1999a).

## Daños ocasionados por larvas de *Phyllophaga obsoleta*

### Daños a los cultivos

*Phyllophaga obsoleta* puede reducir la productividad y provocar la muerte de los cultivos en los que se les encuentra sus larvas debido a que consumen la raíz de las planta quedando incapaces de absorber los nutrimentos del suelo y que en los altos de Chiapas la biología de *P. obsoleta* se encuentra plenamente sincronizada con el cultivo de maíz (Figura 4). Asimismo, El daño del maíz que causa el complejo gallina ciega depende del estado fenológico del cultivo, de la densidad y composición del complejo, de cuando las larvas se encuentran en terceros estadios, del manejo que el productor de a su cultivo y de las condiciones climáticas y edáficas. Las parcelas con problemas de inundación presentan menor número de larvas y de daño en la raíz. Se ha encontrado relación entre el número de larvas y daño a la raíz, pero la presencia de larvas no siempre implica disminución en el rendimiento de la planta. ( Gómez *et al.* 1999b , Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez 2000).

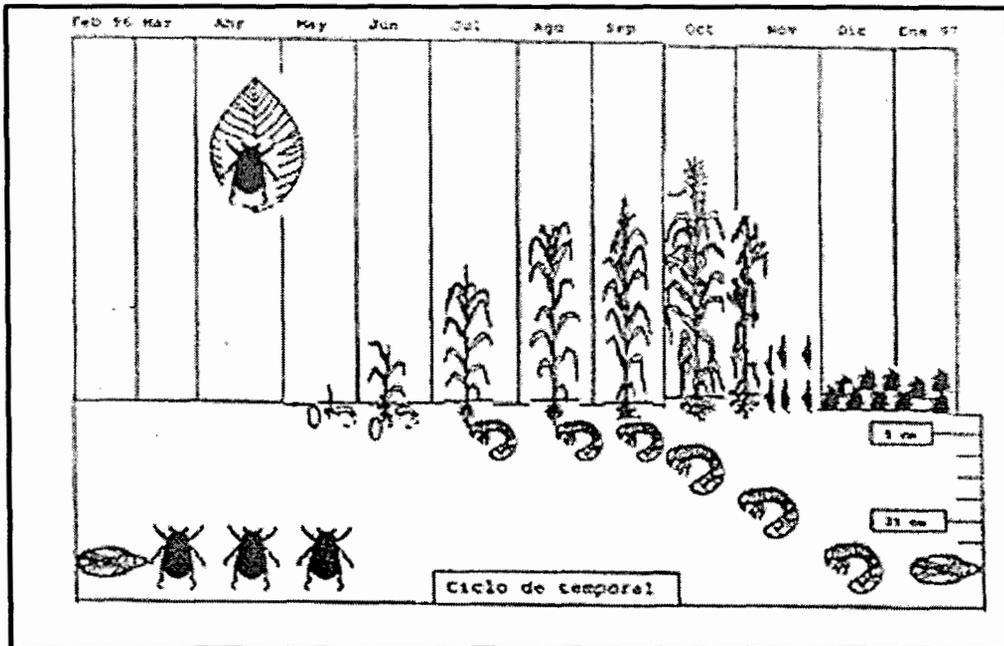


Figura 4: Fenología de gallina ciega y de maíz en cultivos de temporal  
(Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez 2000).

### Pérdidas económicas

Los campesinos al tratar de evitar el daño incorporan fertilizantes a sus parcelas para obtener una mayor producción de maíz. La incorporación de fertilizantes e insecticidas representa un gasto considerable para el precio tan bajo con que se cotiza el producto en México (Aranda 1990, Nájera-Rincón 1993, COVECA 2002). En 1977 en el estado de Jalisco se registró una disminución en el rendimiento del grano de maíz de 2,796 kg/ha causado por plagas del suelo donde dos especies de *Phyllophaga* ocasionaron el 47% de esta pérdida. En 1978 tres especies del complejo causaron el 50% de la mortalidad de plántulas de maíz en el mismo estado (Ríos y Romero 1982; citado por Morón 1986). Según Nájera-Rincón (1993) durante 1984 y 1989 se utilizó en Jalisco un promedio anual de 1,278.36 ton de insecticidas al suelo y se aplicó a 63,911 ha de maíz y sorgo insecticidas granulados para el combate de plagas rizófagas. Este esfuerzo representó en 1993 \$5,432,000,000.00 (cinco mil cuatrocientos treinta y dos millones de pesos mexicanos). En Amatenango del Valle, Chiapas, el 62 % de la población realiza actividades agropecuarias con fines económicos y/o de autoconsumo. En este municipio la gallina ciega ocasiona pérdidas de hasta 3 ton/ha lo que provoca que la agricultura sea subsidiada por la alfarería producida por las mujeres de la región (Aleman y López 1989; citado por Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez 2000, COESPO 2002 , Ramos-Muñoz 2002, Méndez-Pérez 2003).

### Estrategias de manejo

#### Control químico

Este es el sistema de control para plagas del suelo con mayor difusión en México. Consiste en rociar o incorporar compuestos químico sobre los cultivos. Estos compuestos son denominados popularmente insecticidas. Los principales insecticidas sintéticos son los organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides. Tienen por objetivo eliminar las plagas que puedan causar daño a los cultivos en un momento dado. Los insecticidas organoclorados como el DDT fueron los primeros plaguicidas sintéticos en comercializarse de una manera amplia. Pueden tener una alta persistencia en el ambiente biótico o abiótico de hasta 11 años. Los organofosforados permanecen en el ambiente tan sólo unas pocas semanas (hasta 12). Los carbamatos presentan una baja permanencia en el ambiente pero en

el medio acuático suelen estabilizarse. Estos insecticidas pueden causar daños tanto a la salud humana como al ambiente ya que no son productos específicos y pueden afectar a diferentes organismos al esparcirse, acumularse y magnificarse a través de las redes tróficas. Estos productos actúan sobre el sistema nervioso de diversos organismos e incluso algunos organofosforados tienen la capacidad de inhibir la fotosíntesis. Otros compuestos menos agresivos al ambiente son las piretrinas que se obtienen de moler las flores secas de crisantemos y su uso, doméstico, se extiende desde varios siglos antes de Cristo. Los piretroides son moléculas modificadas de piretrinas y ambas son degradadas fácilmente por los organismos y susceptibles a la oxidación causada por el ambiente. Actualmente se están estudiando y utilizando insecticidas químicos a base de feromonas y reguladores del crecimiento, estos suelen ser más específicos ya que pueden llegar a actuar sólo en estadios juveniles de los artrópodos (Albert 1990, Alpuche 1990a, Alpuche 1990b, Aranda 1990, Barcenas 1990, Rendón-von Osten 1990).

#### Control biológico

El control biológico es el estudio y la utilización de parásitos, depredadores y/o patógenos en la regulación de las densidades de las poblaciones de hospederos plaga e incluye el estudio, importación, incremento y conservación de tales organismos (DeBach 1978). El control biológico como solución es atractivo debido a que puede ser altamente selectivo y obtener resultados positivos a largo plazo (McEvoy 1996). Los hongos entomopatógenos de los géneros *Metarhizium* y *Beauveria* han sido estudiados en condiciones experimentales como controladores de especies de escarabajos plaga incluyendo a las larvas del género *Phyllophaga* (Shannon *et al.* 1993, Cruz-López 1999, Castro-Morales y Zamora-Basillio 2000, Mosso y Gutiérrez 2000, Flores *et al.* 2002, Dubois *et al.* 2004).

#### Supresión manual

La supresión manual de adultos de gallina ciega es una estrategia preventiva. Esta consiste en la recolección masiva de escarabajos adultos en las parcelas de los agricultores durante la etapa de emergencia. Las especies plaga de *Phyllophaga* suelen atacar a cualquier cultivo sin importar a quien pertenezca. Por este motivo, esta táctica de control requiere del trabajo organizado, sistemático y colectivo de la población. Asimismo, es indispensable la

capacitación del personal en la biología de la plaga para que la colecta sea eficiente y específica (Cruz-López *et al.* 2001, Castro-Ramírez *et al.* 2003). En un estudio realizado por Cruz-López *et al.* (2001) en el municipio de Amatenango del Valle, Chiapas, se capacitaron a 83 alumnos para capturar adultos de gallina ciega. Durante cuatro semana se capturaron 40,995 adultos en un área de 27 ha. La captura de estos adultos permitió reducir la densidad larval de 17.34 larvas/m<sup>2</sup> (un año antes del estudio) a 1.5 larvas/m<sup>2</sup>. Con estos datos el autor concluye que la captura masiva de adultos de gallina ciega es una alternativa de manejo económica, eficiente y segura.

#### Composta

Los abonos orgánicos juegan un papel importante en el desarrollo de las plantas. La adición de composta a las plantas no reduce la densidad de las larvas en el cultivo si no que le da mayor vigor a la planta para soportar y contrarrestar los daños que causa la gallina ciega a la raíz (Castro Ramírez *et al.* 2001).

#### Manejo integrado de plagas

El manejo integrado de plagas implica la necesidad de tolerar a la plaga y así aprender a convivir con ella bajo condiciones más ventajosas para los seres humanos. Este manejo debe ser aplicado con un criterio netamente preventivo. Para adoptar este tipo de programas se debe incluir la optimización y minimización del control químico. Las técnicas que se emplean en los programas de manejo integrado de plagas son los métodos culturales (policultivos, rotación, introducción de variedades resistente, etc.), métodos mecánicos (colectas manuales entre otras), métodos físicos (control de humedad o manipulación de la luz), control biológico, control químico, métodos genéticos y control legal (cuarentenas, obligatoriedad de practicas agrarias, prohibición de productos agresivos, control en la manipulación y aceptación de productos transgénicos). El manejo integrado de plagas requiere de la participación de verdaderos equipos interdisciplinarios, de la cooperación de técnicos adiestrados en el monitoreo permanente de plagas y del conocimiento detallado sobre plagas en todos sus aspectos (Aranda 1990, Pérez-Moreno 2000).

## Genética de poblaciones

La genética poblacional se define como el estudio de las fuerzas que provocan cambios genéticos espacial o temporalmente en una población. Estos cambios provocan la diferenciación genética que se refleja en diferentes frecuencias alélicas entre poblaciones (Hartl y Clark 1997). La genética poblacional permite el reconocimiento de los procesos evolutivos que promueven los cambios genéticos dentro y entre poblaciones. Los procesos hasta el momento reconocidos son la selección natural, la deriva genética, la mutación, la recombinación y el flujo génico. La selección natural es la sobrevivencia y reproducción diferencial de organismos distintos, este proceso se genera cuando los diferentes genotipos tienen distintos mecanismos de eficiencia para dejar descendencia viable. La mutación es el mecanismo de generación de nuevos genes pero es poco relevante para cambiar las frecuencias alélicas. La deriva génica es el cambio de frecuencias génicas a lo largo del tiempo causada por errores de muestreo, esto es, la oportunidad de que algunos individuos tengan un mayor o menor número de descendientes sin que la selección natural intervenga; la deriva génica conduce comúnmente a la pérdida de alelos y a elevar la homocigosis (cuanto más pequeña la población más efecto tendrá la deriva génica en ésta). El flujo génico o migración es el movimiento de genes de una parte del área de distribución de una población a otra ocasionando la homogeneización de las poblaciones, esta fuerza evolutiva depende de la tasa de migración entre las poblaciones y de las frecuencias génicas en los individuos migrantes (Hartl y Clark 1997, Eguiarte 1999).

La genética poblacional puede ser aplicada de manera práctica en el campo de la agricultura (Hartl y Clark 1997) debido a que la estructura y diversidad genética responden rápidamente a los cambios ambientales creados por actividades antropogénicas como la aplicación de insecticidas, la degradación de hábitats y la contaminación ambiental (Kim 1993). Se ha demostrado que poblaciones de insectos plaga mantienen diferentes niveles de variación genética. Esta diversidad genética podría conferirle resistencia a la plaga ante las diferentes técnicas de control y al cambio de uso de suelo (McEvoy 1996, Roderik 1996). La variación genética se expresa en rasgos específicos dependiendo de la dirección en que actúen las fuerzas de selección natural y cambios ambientales. Cuando la selección natural

interactúa con la mutación y deriva génica se favorece la adaptación de la población a las condiciones ambientales que conduce a una diferenciación en las poblaciones mientras que el flujo génico opone tales diferenciaciones (Kim 1993). Roderik (1996) cree que la migración contribuye al desarrollo de resistencias a insecticidas en los insectos plaga y que en algunas especies de insectos plaga la gran variabilidad entre y dentro de las poblaciones es atribuible a las fuerzas de selección locales. Así, el patrón de variación de las resistencias de los insectos podría estar en función de su capacidad de dispersión y a la manera de aplicación del insecticida

No hay estudios de genética de poblaciones con *Phyllophaga obsoleta*. Sin embargo, existe información sobre la estructura poblacional de varias especies de insectos plaga. Martins y Contel (2000) describieron la diversidad genética de poblaciones de *Digitonthophagus gazella* (Fabricius) y encontraron que existe poca variabilidad en la población estudiada. Carter *et al.* (1996) estableció la relación de las poblaciones de la plaga de pinos en Norte America *Tomicus piniperda* (L.). También se han desarrollado esfuerzos en determinar la posible relación entre la intensidad de tinción de la esterasa y la resistencia a insecticidas de una población de *Diabrotica virgifera* LeConte de Nebraska (Zhuo *et al.* 2000) especie de escarabajo barrenador del maíz; esta puede ser una buena técnica para el monitoreo de resistencia en frecuencias individuales.

## JUSTIFICACIÓN

Las larvas *Phyllophaga obsoleta* son plaga de gran cantidad de plantas cultivadas. En Amatenango del Valle, Chiapas, la poca productividad de los cultivos de maíz, resultante del ataque de la gallina ciega, sumado al esfuerzo económico utilizado en la aplicación de insecticida y fertilizantes para contrarrestar o controlar los efectos de esta plaga, representa una gran pérdida económica en comparación con la cotización (1,400 \$/ton) y productividad (2 ton/ha) del grano en el estado (COVECA 2002). Asimismo, La aplicación del insecticida es generalmente de manera indiscriminada, su eficacia actualmente es limitada y las consecuencias son adversas para a la salud y el ambiente. Ante esta situación, es necesario diseñar y evaluar nuevas alternativas de control de *P. obsoleta*, factibles de ser incorporadas en el manejo tradicional que los productores realizan y en los programas de manejo integrado de plagas del maíz en Los Altos de Chiapas.

Para llegar a un control ecológicamente sostenible, específico y con efectos positivos a largo plazo es necesario obtener un conocimiento integral y detallado de la ecología de la especie de interés. Hoy en día, la teoría y conceptos de la genética de poblaciones y concretamente de la ecología genética son particularmente útiles para reconocer nuevas estrategias de control con posibilidades de funcionar por periodos más largos. Determinar los cambios en la estructura genética de insectos plaga relacionados a las métodos de control es el principio de un reconocimiento de la evolución de la resistencia al método en uso (Kim 1993, Roderik 1996).

## OBJETIVOS

Aportar conocimientos sobre genética poblacional de adultos de *Phyllophaga obsoleta* y de las larvas asociadas a estrategias de manejo o control.

1. Determinar el efecto de la aplicación del hongo *Beauveria bassiana* (estrategia de control) y de composta (estrategia de manejo) en el crecimiento del maíz en tres parcelas de Amatenango del Valle, Chiapas.
2. Determinar el efecto, en condiciones de laboratorio, de la aplicación del hongo *Beauveria bassiana* en la mortalidad de adultos y huevos de *Phyllophaga obsoleta* capturados en cuatro localidades de Amatenango del Valle, Chiapas.
3. Determinar el efecto de la aplicación del hongo *Beauveria bassiana* y de composta en la sobrevivencia de larvas de *Phyllophaga obsoleta* en tres parcelas de Amatenango del Valle, Chiapas.
4. Determinar la diversidad genética y la estructura genética de larvas de *Phyllophaga obsoleta* asociadas al efecto de la aplicación del hongo *Beauveria bassiana* y de composta en tres parcelas de Amatenango del Valle, Chiapas.
5. Determinar la diversidad genética y la estructura genética de cuatro poblaciones de adultos de *Phyllophaga obsoleta* en Amatenango del Valle, Chiapas.

## HIPÓTESIS

Las estrategias de control que incrementan la mortalidad de larvas, como la aplicación de hongos, reducen la diversidad genética de las poblaciones de larvas de *Phyllophaga obsoleta* mientras que las estrategias inocuas como la aplicación de composta, mantiene la diversidad genética.

Las poblaciones de *Phyllophaga obsoleta* de Amatenango del Valle se encuentran genéticamente diferenciadas.

## MATERIALES Y MÉTODO

### Área de estudio

#### Municipio de Amatenango del Valle

Amatenango del Valle es un municipio chiapaneco que forma parte de la región de Los Altos de Chiapas (Figura 5). Sus coordenadas geográficas son 16°32' N y 92°26' W. Tiene una extensión territorial de 236 km<sup>2</sup> que representa el 6.25% de la superficie de la región Altos. Su altitud promedio es de 1,810 m. El terreno es semiplano en la mayoría de su extensión. El clima es templado con lluvias en verano. En esta región se registra una precipitación promedio anual de 1,366.5 mm y una temperatura media anual de 16.8°C. El tipo de vegetación predominante es el bosque de pino-encino, sin embargo gran parte del municipio sobretodo en las partes bajas o planicies está ocupada por el cultivo de maíz. Los suelos son arcillosos con un pH que varía de 6.2 a 7.7. La red hidrológica está representada por los arroyos Amatenango, San Nicolás y Pie del Cerro (COESPO 2002).



Figura 5: Ubicación del municipio de Amatenango del Valle, Chiapas, México (Ramírez-Salinas y Castro-Ramírez 2000).

Se eligieron tres sitios en el municipio de Amatenango del Valle (San Nicolás, Aljío, y Cabecera municipal de Amatenango) y uno en el de Venustiano Carranza (Monte Los Olivos; en adelante Los Olivos) para realizar la descripción de la estructura genética de

adultos. En San Nicolás, Aljó y Los Olivos se realizaron los experimentos para observar la relación entre la diversidad genética de las larvas y dos estrategias de manejo (Apéndice 1).

#### Poblado de Amatenango del Valle

Amatenango es un pueblo tzeltal que se encuentra aproximadamente a 60 km de San Cristóbal de las Casas sobre la carretera San Cristóbal-Comitán. El nombre de Amatenango significa, en náhuatl "lugar de amates". El grupo de tzeltales que originaron el poblado se estableció en el municipio durante el período clásico de la época precolombina. 51.1% de la población vive en la cabecera municipal. Una gran parte de sus habitantes son indígenas, incluso algunos son monolingües. Este poblado es conocido por la hermosa alfarería realizada por sus mujeres indígenas (COESPO 2002).

#### Aljó

Aljó es un conjunto de parcelas localizadas en un pequeño valle a 3 km al norte de la cabecera municipal. El acceso a estas parcelas es relativamente difícil ya que sólo se puede ingresar a ellas caminando durante 90 mn o bien por medio de camiones de cuatro toneladas. El valle, rodeado de cerros, está lejos de cualquier fuente de luz y población. La vegetación es de tipo encino-pino. En esta localidad practican tanto el cultivo de riego y de temporal. También se practica el poli-cultivo de maíz y frijol. El suelo es de tipo arcilloso con pH 7.5, 4.4 % de materia orgánica, 0.2 % de nitrógeno y 8.6 % de fosfatos.

#### San Nicolás

San Nicolás es un conjunto de parcelas que se encuentran a la orilla de la carretera San Cristóbal-Comitán a 2 km al este de la cabecera municipal de Amatenango del Valle. Los cultivos de esta zona son exclusivamente de temporal. Los campesinos locales practican el poli-cultivo, combinando en sus parcelas la siembra de maíz y frijol. El suelo es de tipo arcilloso, con pH 7.8, 6.9 % de materia orgánica, 0.6 % de nitrógeno y 14.7 % de fosfatos.

#### Los Olivos

Los Olivos es una comunidad que se encuentra dentro del municipio de Venustiano Carranza a 7.5 km en línea recta al sur del poblado de Amatenango. Los cultivos en la que

trabajamos son propiedad de la comunidad de Amatenango. Las parcelas son exclusivamente de temporal practicando en ocasiones el policultivo. Estas se encuentran aproximadamente a un kilómetro del poblado de Los Olivos, por lo que es posible que los adultos puedan ser influenciados por las luces de las casas. La vegetación natural que circunda a las parcelas es una asociación de pino-encino. El suelo es de tipo arcilloso muy pedregoso y no suele ser limpiado ni quemado tras la cosecha, con pH 7.2, 8.4 % de materia orgánica, 0.4 % de nitrógeno y 17.3 % de fosfatos.

### **Diseño experimental para la evaluación del efecto de estrategias sobre el crecimiento del maíz, sobrevivencia de larvas y genética de las larvas**

El diseño experimental constó de tres parcelas de maíz localizadas en Aljío, San Nicolás y Los Olivos (Apéndice 1). Las parcelas experimentales tuvieron una área de 14 x 4m con un borde de un metro alrededor de ésta. En cada parcela se instalaron 60 macetas. Las macetas que se utilizaron fueron cilindros de malla de acero de 0.5 x 0.5 cm de luz. Los cilindros tuvieron 30 cm de altura y 50 cm de diámetro. Cada cilindro fue revestido interiormente con bolsas plásticas oscuras perforadas con agujas para permitir la filtración del agua. Los cilindros fueron rellenos de suelo proveniente de cada parcela. Esta tierra fue tamizada y revisada para evitar la introducción de organismos que podrían alterar el experimento. Las macetas se enterraron en cada punto de siembra. En cada maceta se sembraron 4 semillas de maíz (esperando obtener dos plántulas). Las macetas están diseñadas para evitar factores no deseados como colonización de otros insectos rizófagos y depredadores. Se asignó aleatoriamente cada maceta a uno de tres tratamiento (composta, hongo, suelo) y un testigo. Cada parcela experimental constó de 15 macetas por tratamiento y testigo. Finalmente todas las macetas, exceptuando las del testigo, se cubrieron con tul de un metro de altura. Los adultos de *Phyllophaga obsoleta* con los que se inoculó cada tratamiento se colectaron en la plaza de Amatenango del Valle. En este lugar se concentró un gran número de individuos de la especie debido a la excelente iluminación que atrae a los escarabajos de este tipo. A continuación se describe en que consiste cada uno de los tratamientos y el testigo.

*Composta:* A cada maceta se le inocularon 2 parejas de *Phyllophaga obsoleta*. Al suelo se le adicionaron 2 kg de composta, cuyo efecto se esperaba que fuera el fomentar la tolerancia del maíz al ataque de *P. obsoleta*. La composta utilizada fue procesada con desechos orgánicos de cocina, rastrojo y estiércol.

*Hongo:* A las macetas pertenecientes a este tratamiento se les inocularon dos parejas de *Phyllophaga obsoleta* contaminadas con las esporas del hongo *Beauveria bassiana* mediante la técnica utilizada por Cruz-López (1999), denominada prueba máxima. Esta técnica consistió en introducir cada pareja en un frasco con esporas del hongo y agitar suavemente para que estas se adieran a los escarabajos. Mediante este procedimiento se pretendía que el hongo fuera transmitido a la descendencia ocasionando la muerte de larvas de *P. obsoleta* y así minimizar el daño causado a la plántula. El hongo consistió en 2 kg de conidios (deshidratados) con sustrato de arroz. El resultado de la prueba de viabilidad hecha por la institución cooperante fue de  $1.88 \times 10^7$  conidios/gr.

*Suelo:* Cada maceta de este tratamiento se inoculó con dos parejas de *Phyllophaga obsoleta*. No se aplicó ningún tipo de alternativa de manejo, sin embargo, se controló la entrada de competidores y depredadores de la misma manera que en los tratamientos con materia orgánica y composta (mediante el tul). Se esperaba que su descendencia se desarrollara normalmente por lo que este tratamiento funcionó de testigo para los análisis de las larvas ya que fue el punto referencia de la variación genética en la población sometida al hongo y a la composta.

*Testigo:* No se implementó ningún tipo de manejo. A diferencia de los tratamientos anteriores a estas macetas no se les inocularon las parejas de *Phyllophaga obsoleta* y no se controló la entrada de depredadores y/o competidores que pudieron ingresar por la parte aérea (no se colocó la malla de tul). El propósito de este tratamiento fue permitir la puesta de huevos normal de cualquier especie del complejo gallina ciega como normalmente sucede y proporcionar condiciones más parecidas a las que normalmente está sometida la planta de maíz y así evaluar el posible efecto del diseño experimental sobre el crecimiento de estas.

Las parcelas fueron visitadas cada quince días durante siete meses. En cada visita se registro el crecimiento del maíz, se restauraron las unidades experimentales dañadas y proporcionó alimento a los escarabajos utilizados. Al finalizar la emergencia de escarabajos adultos se retiró el tul para darle mayor libertad al crecimiento del maíz. Al finalizar el experimento cada planta fue retirada y se colectaron las larvas presentes en cada cilindro, las cuales se conservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para realizar los análisis electroforéticos.

### **Mortalidad de adultos y huevos en laboratorio**

Se colectaron 30 parejas de *Phyllophaga obsoleta* de las distintas localidades. Cada pareja se introdujo en un vaso de plástico con tierra para transportarla al laboratorio. Se seleccionaron al azar diez parejas para inocularlas con el hongo *Beauveria bassiana*. Cada tres o cuatro días se revisaron las pareja para registrar cuando y cuantos huevos ponían las hembras y el día en el que cada individuo adulto murió. Las parejas se alimentaron introduciendo en el vaso follaje nuevo de encino. Los huevos fueron separados de sus progenitores y se colocaron en suelo húmedo para registrar el número de huevos que pasaron al primer estadio larval. Durante el experimento se humedeció el suelo con 3 a 5 ml de agua dependiendo del estado de humedad del mismo.

### **Genética de adultos**

Para analizar la diversidad y estructura genética de adultos en Amatenango del Valle se colectaron adultos de ambos sexos de *Phyllophaga obsoleta* en las localidades de Aljó, Los Olivos, San Nicolás y Amatenango del Valle. Las capturas se realizaron en las cercanías de cada parcela experimental con trampas de luz y lampareo sobre la vegetación circundante. En el parque de Amatenango del Valles, en la parcela de San Nicolás y en Los Olivos se colectaron los individuos que fueron atraídos por el alumbrado público más cercano (de manera exclusiva en Amatenango y como auxiliar en las otras dos parcelas). Los adultos capturados en su medio natural fueron almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Las hembras y machos de *P. obsoleta* fueron analizados genéticamente por separado.

## **Análisis genéticos de larvas y adultos**

La descripción de la diversidad y estructura genética se realizó utilizando allo/iso-enzimas como marcadores genéticos y reveladas mediante la técnica de electroforesis. La electroforesis se basa en la migración de partículas cargadas bajo la influencia de la corriente eléctrica. Las enzimas son proteínas cuya carga neta está dada por el pH del sistema en que se mueven. Las que difieren en su carga eléctrica migran a velocidades diferentes en un mismo campo eléctrico, por ende, difieren en al menos un aminoácido, los cuales confieren la carga eléctrica. Ya que las secuencia de aminoácidos de cada enzima está controlada por genes y/o alelos diferentes es posible analizar la estructura genética de cualquier población (Hartl y Clark 1997).

Las allo/iso-enzimas tienen la ventaja de que son codominantes y el heterocigoto puede ser fácilmente reconocido. Esto permite establecer de manera sencilla la relación entre la frecuencia de genotipos observados y esperados bajo condición de equilibrio de Hardy-Weinberg (Richardson *et al.* 1986). El principio de Hardy-Weinberg (EHW) señala que una población se mantiene en equilibrio, es decir, sin cambios en sus frecuencias genotípicas y alélicas, siempre y cuando no exista migración, selección, mutación y deriva génica que actúen sobre la misma (Roderick 1996, Hartl y Clark 1997, Eguiarte 1999).

Se trató de revelar tanto para adultos (hembras y machos) como para larvas al menos 15 enzimas. Los mejores resultados se obtuvieron mediante corrimientos electroforéticos en acetato de celulosa de allo/iso-enzimas con los loci enzimáticos Glutamato-Oxaloacetato Transaminasa (GOT), Enzima Mállica (EM) y Esterasa (EST). Las enzimas, EM, y EST corrieron en el sistema Trís-Maleato pH 7.8 durante, 60 y 40 minutos respectivamente, mientras que la enzima GOT se corrió en un sistema de Fosfatos pH 7 durante 60 minutos. El resto de las enzimas no fueron tomadas en cuenta debido a que mostraban mala resolución o no se revelaron exitosamente. La extracción de las enzimas se efectuó macerando cada organismo con 200  $\mu$  del amortiguador de extracción. Los detalles del procedimiento de tinción, las condiciones de corrimiento y la preparación de reactivos y soluciones amortiguadoras pueden consultarse en el Apéndice 2.

## Análisis estadísticos

Crecimiento del maíz y sobrevivencia de larvas en campo.

Para evaluar el desarrollo del maíz se obtuvo la tasa del crecimiento final por medio de la fórmula  $r = [\ln (M_2 - M_1)] / d$ . Donde  $M_2$  = medida final,  $M_1$  medida inicial y  $d$  = días transcurridos entre cada medición (Wilson y Tilman 1991). Se construyó una curva de crecimiento del maíz por tratamiento y por localidad, utilizando la fórmula antes descrita y considerando cada periodo de evaluación (cada quince días). Por medio del programa JMP (SAS Institute 1995) se efectuaron los análisis de varianza de la tasa promedio del crecimiento y de el número de larvas sobrevivientes para observar si existieron diferencias significativas entre tratamientos en cada localidad y otro análisis considerando la interacción tratamiento/localidad. Asimismo, se obtuvo la chi cuadrada ( $\chi^2$ ) para mostrar si el número de larvas encontradas en cada localidad es dependiente del tratamiento.

Genética de larvas y adultos.

Los datos obtenidos de los corrimiento genéticos fueron analizados en el programa Tools for Population Genetics Analysis (TFPGA Miller 1997) para estimar la heterocigosidad, polimorfismo, equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), el grado de diferenciación genética y la distancia genética de las poblaciones de *Phyllophaga obsoleta* estudiadas. La heterocigosidad por locus se realizó por conteo directo. Se consideró como locus polimórfico a todo aquel cuyo alelo más común tuviera una frecuencia menor a 0.95. La estimación de EHW permitió inferir la ocurrencia de factores ecológicos y evolutivos que modifican las frecuencias genotípicas y alélicas. El grado de similitud entre las poblaciones se calculó realizando una matriz de distancia genética de Nei (1978) con la cual se realizó un análisis de agrupación por UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean; Miller 1997). Se obtuvieron los estadísticos  $F_{IT}$  (indica si hay exceso de heterocigotos u homocigotos por lo menos en alguna población)  $F_{IS}$  (indica si hay exceso de heterocigotos u homocigotos en el total de las poblaciones) y  $F_{ST}$  (determina el grado de diferenciación genética entre las poblaciones). Cuando los valores de  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  son negativos muestran un exceso de heterocigotos y si estos son positivos muestran un exceso de homocigotos. Los valores de  $F_{ST}$  de 0 a 0.05 se interpretan como poca diferenciación

genética, entre 0.05 a 0.015 la diferenciación es moderada y de 0.015 a 0.25 la diferenciación es fuerte (Hartl y Clark 1997). Para las frecuencias alélicas se obtuvieron los

errores estándar (E.E.) mediante la fórmula  $\pm 2\sqrt{\frac{(p_i + P_{ii} + 2p_i^2)}{2N}}$ , donde  $p_i$  es la frecuencia del alelo en cuestión;  $P_{ii}$ , es la frecuencia de homocigotos observados para el alelo  $i$ , y  $N$  es el número de individuos analizados. Los E.E. se suman y restan a su respectiva frecuencia alélica para obtener los intervalos de confianza al 95% (Hedrick 2000).

## RESULTADOS

### Crecimiento del maíz

En Alj6 la tasa de crecimiento m1s alta se observ6 en el tratamiento con composta, mientras que en Los Olivos y San Nicol1s se encontr6 en los testigos (Figura 6). El an1lisis de varianza mostr6 que las diferencias en crecimiento fueron estadisticamente significativas entre tratamiento y entre localidades (Cuadro 1).

La tasas de mayor crecimiento se observ6 en los tratamientos con composta en la evaluaci6n hecha en mayo-junio en todas las localidades (Figura 7). La tasa de crecimiento m1s baja se observ6 de mediados de agosto a principios de septiembre en las localidades de Alj6 y San Nicol1s mientras que en Los Olivos fue a mediados y finales de julio (Figura 7).

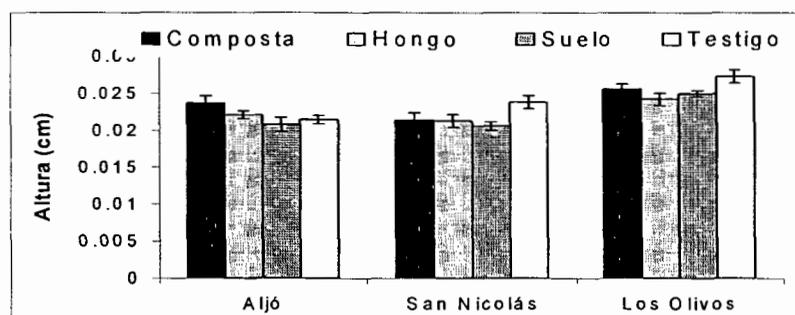


Figura 6. Tasa de crecimiento final del ma1z en tres localidades del municipio de Amatenango del Valle, Chiapas. La tasa de crecimiento se estim6 mediante la formula  $T = \frac{\ln(M2/M1)}{d}$ . Donde  $M1$  = medici6n inicial,  $M2$  = medici6n final y  $d$  = d1as transcurridos entre cada medici6n.

Cuadro 1. An1lisis de varianza de la tasa de crecimiento final del ma1z (GL. grados de libertad, SC. suma de cuadrados).

	GL.	SC	F	P
LOCALIDAD	2	0.00060979	30.757	<.0001
TRATAMIENTOS	3	0.00014546	4.891	0.0028
LOCALIDAD *TRATAMIENTOS	6	0.00015699	2.639	0.0181
ERROR	164	0.00161581		

—○— Composta —□— Hongo —△— Suelo —○— Testigo

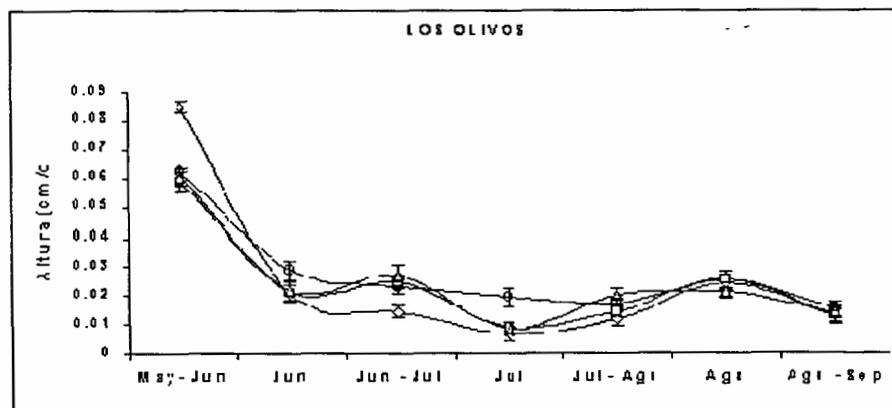
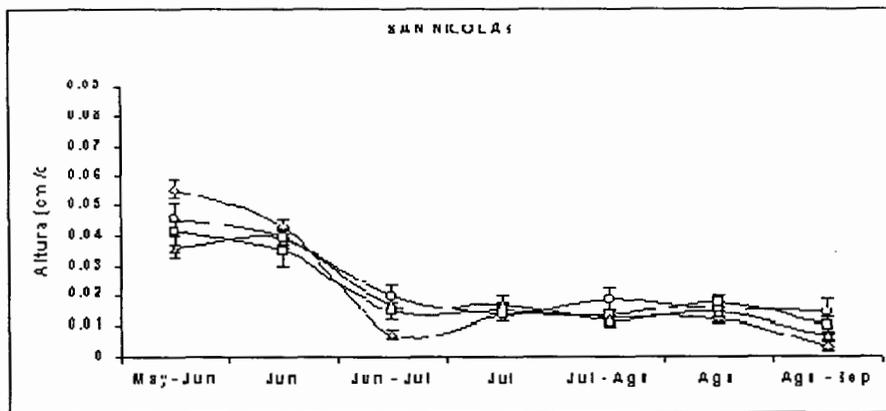
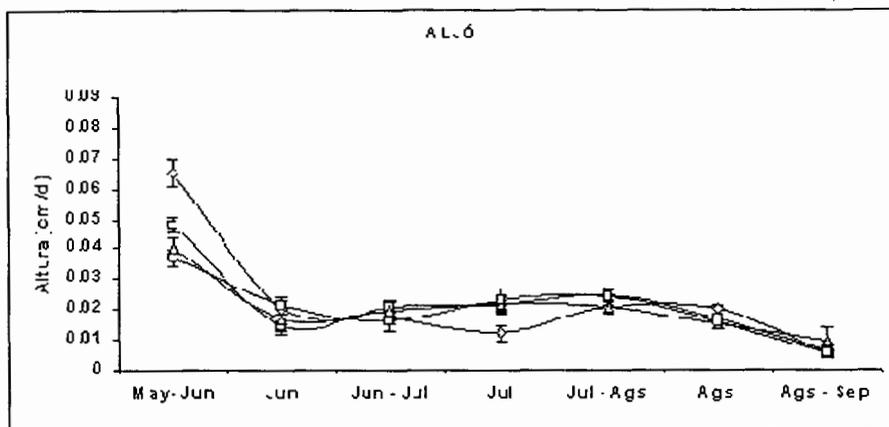


Figura 7. Curvas de crecimiento del maíz en tres localidades del municipio de Amatenango del Valle, Chiapas. La tasa de crecimiento en cada tiempo de evaluación se calculó mediante la fórmula  $T = \frac{\ln(M2/M1)}{d}$ . Donde  $M1$  = medición inicial,  $M2$  = medición final y  $d$  = días transcurridos entre cada medición.

### Mortalidad de adultos y huevos en laboratorio

Se encontraron un total de 69 huevos pertenecientes a solo 8 de 30 parejas que se observaron en laboratorio. De los 69 huevos, 12 fueron de dos parejas inoculadas con el hongo y ninguno paso al estadio larval. De los 57 huevos restantes nacieron 22 larvas en el transcurso de 15 días, lo que representó el 55% de sobrevivencia. Se observó que las hembras realizan varias puestas, una grande (10 a 20 huevos ) y varias pequeñas (1 a 3 huevos). Algunas hembras sólo depositaron 1 huevo. Una pareja inoculada con el hongo depositó 11 huevos, pero no se encontraron en la siguiente revisión. Los huevos de parejas infectadas con hongo murieron en el transcurso de 7 días mientras que los huevos de parejas no infectadas murieron en el transcurso de 15 días. Todos los adultos inoculados por el hongo murieron a los 10 días y los libres de hongo llegaron a vivir hasta 21 días. Los machos inoculados por el hongo murieron en el plazo de 5 días, en contraste las hembras murieron a los 10 días. Los machos no inoculados murieron 7 días antes que los machos no inoculados.

### Sobrevivencia de larvas en campo

No se encontraron larvas de *Phyllophaga obsoleta* en las macetas del tratamiento testigo de ninguna localidad. En el resto de los tratamientos se registraron un total 109 larvas. El mayor número de larvas se encontró en la localidad de Los Olivos (78). Se encontraron 41, 40, y 28 larvas en los tratamientos hongo, suelo y composta respectivamente conjuntado las tres localidades. En Aljó el mayor número de larvas se encontró en el tratamiento con composta (13). En San Nicolás se encontraron larvas en los tratamientos de composta y suelo (6 y 5). En Los Olivos el tratamiento con hongo, con 32 larvas, presentó la mayor número de larvas (Cuadro 2, Figura 8).

Cuadro 2. Número total de larvas encontradas en los tratamientos de cada localidad.

	COMPOSTA	HONGO	SUELO	TOTAL
Aljó	13	4	3	20
San Nicolás	6	0	5	11
Los Olivos	9	37	32	78
Total	28	41	40	109

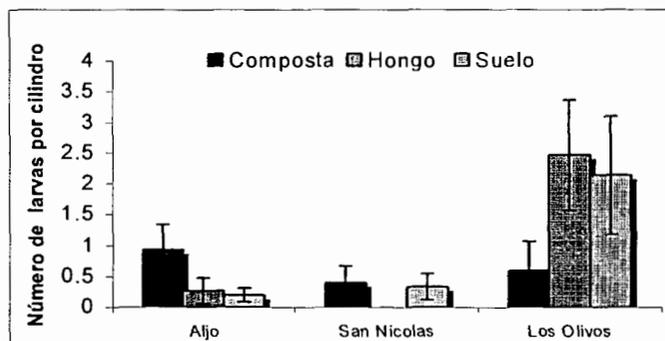


Figura 8. Número de larvas promedio en cada cilindro, por localidad y por tratamiento.

El análisis de varianza mostró diferencias significativas en el número promedio de larvas entre los tratamientos, entre las localidades y la interacción de tratamientos y localidades (Cuadro 3). Consistentemente la prueba de  $\chi^2$  mostró que el número de larvas se asocia con la localidad y con el tratamiento. Este mismo análisis ( $\chi^2$ ) aplicado para los datos obtenidos en cada localidad detectó que en Aljó y San Nicolás el número de larvas fue independiente del tratamiento, cosa contraria sucede en la localidad de Los Olivos (Cuadro 4).

Cuadro 3. Análisis de varianza sobre el número de larvas encontrados por tratamiento por localidad

	GL.	SC	F	P
LOCALIDAD	2	0.004	7.407	<0.0001
TRATAMIENTOS	3	.002	2.660	0.049
LOCALIDAD*TRATAMIENTOS	6	0.004	2.739	0.014
ERROR	164	0.040		

Cuadro 4. Análisis de  $\chi^2$ . General (análisis del número de larvas entre tratamiento y localidad). Aljó, San Nicolás y Los Olivos (análisis del número de larvas por localidad).

	GL	$\chi^2$	P
General	6	32.5	$1.40 \times 10^{-6}$
ALJO	3	6.50	0.089
SAN NICOLAS	3	6.66	0.083
LOS OLIVOS	3	11.73	0.008

## Genética de larvas

Se analizaron las larvas encontradas en cada tratamiento y se revelaron exitosamente los loci EST, GOT-1, GOT-2, EM-1 y EM-2. El locus EST presentó tres alelos para la población superviviente de larvas de *Phyllophaga obsoleta*. A pesar de que en la población de origen (adultos de Amatenango) sólo se registró un alelo para el locus EM-1, en las larvas se registraron dos alelos para este locus. El Locus GOT-2 presentó dos alelos en la población de Los Olivos y en el tratamiento con hongo, mientras que en el resto este locus presento un alelo. En general se observó una mayor frecuencia del alelo rápido en todos los loci (alelo 3 para EST y alelo 2 para el resto de los loci). Para el locus EM-2 la frecuencia entre alelos fueron semejante (Cuadro 5).

Los marcadores genéticos que mostraron diferencias genéticas entre las poblaciones de adultos de Amatenango y larvas al considerar los intervalos de confianza al 95 % fueron EST y EM-1. También se observó que difieren las frecuencias alélicas de estos mismo loci entre los adultos y los tratamientos suelo y composta. Los tratamientos composta y hongo difieren en los loci EST, GOT-1, GOT-2 y EM-1. Los tratamientos hongo y suelo difieren en EST y GOT-1, mientras que entre composta y hongo solo difieren GOT 1. Sólo GOT-1 difiere al hacer cualquier comparación entre tratamientos. Todas las comparaciones entre localidades difieren en EST. Al comparar los Olivos con San Nicolás y Aljó todos los marcadores difieren, mientras, que entre Aljó y San Nicolás sólo la EST es diferente (Cuadro 5).

El polimorfismo promedio para los tratamientos es de 66.6% mientras que para las localidades es de 73.3%. El mayor polimorfismo (80%) fue registrado en las localidades de Aljó y San Nicolás y en el tratamiento de composta (sin considerar las localidades). La heterocigosidad varía de 0.28 para las larvas de Aljó hasta los 0.318 para las larvas del tratamiento hongo (Cuadro 6).

Cuadro 5. Frecuencias alélicas  $\pm$  E.E. (error estándar para obtener los intervalos de confianza al 95 %) de cinco loci de los adultos de *Phyllophaga obsoleta* capturados en Amatenango del Valle (población de origen de los padres de las larvas) y de las poblaciones de larvas de la misma especie sobrevivientes por localidad y por tratamiento.

Locus	Alelo	TRATAMIENTOS										LOCALIDAD					
		Adulto	E.E.	Larvas	E.E.	Composta	E.E.	Hongo	E.E.	Suelo	E.E.	Aljo	E.E.	San Nicolás	E.E.	Los Olivos	E.E.
Est	1	0.228	$\pm$ 0.033	0.251	$\pm$ 0.031	0.352	$\pm$ 0.068	0.164	$\pm$ 0.038	0.032	$\pm$ 0.042	0.15	$\pm$ 0.051	0.454	$\pm$ 0.12	0.274	$\pm$ 0.036
	2	0.456	$\pm$ 0.037	0.328	$\pm$ 0.035	0.278	$\pm$ 0.071	0.346	$\pm$ 0.058	0.342	$\pm$ 0.056	0.25	$\pm$ 0.083	0.318	$\pm$ 0.097	0.349	$\pm$ 0.042
	3	0.316	$\pm$ 0.038	0.366	$\pm$ 0.039	0.37	$\pm$ 0.081	0.487	$\pm$ 0.059	0.342	$\pm$ 0.059	0.6	$\pm$ 0.091	0.227	$\pm$ 0.099	0.377	$\pm$ 0.043
Got-1	1	0.04	$\pm$ 0.023	0.042	$\pm$ 0.017	0.107	$\pm$ 0.053	0.026	$\pm$ 0.018	0.013	$\pm$ 0.013	0.075	$\pm$ 0.04	0.227	$\pm$ 0.118	0.007	$\pm$ 0.007
	2	0.96	$\pm$ 0.023	0.958	$\pm$ 0.016	0.893	$\pm$ 0.053	0.974	$\pm$ 0.018	0.987	$\pm$ 0.013	0.925	$\pm$ 0.04	0.773	$\pm$ 0.118	0.993	$\pm$ 0.007
Got-2	1	0.06	$\pm$ 0.027	0.031	$\pm$ 0.014	0	$\pm$ 0	0.026	$\pm$ 0.025	0	$\pm$ 0	0	$\pm$ 0	0	$\pm$ 0	0.013	$\pm$ 0.013
	2	0.94	$\pm$ 0.028	0.969	$\pm$ 0.02	1	$\pm$ 0	0.974	$\pm$ 0.026	1	$\pm$ 0	1	$\pm$ 0	1	$\pm$ 0	0.986	$\pm$ 0.014
Em-1	1	0	$\pm$ 0	0.093	$\pm$ 0.034	0.25	$\pm$ 0.082	0.103	$\pm$ 0.049	0.158	$\pm$ 0.059	0.35	$\pm$ 0.107	0.273	$\pm$ 0.134	0.095	$\pm$ 0.034
	2	1	$\pm$ 0	0.907	$\pm$ 0.022	0.75	$\pm$ 0.082	0.897	$\pm$ 0.049	0.842	$\pm$ 0.059	0.65	$\pm$ 0.107	0.727	$\pm$ 0.134	0.905	$\pm$ 0.034
Em-2	1	0.475	$\pm$ 0.015	0.47	$\pm$ 0.012	0.446	$\pm$ 0.029	0.474	$\pm$ 0.018	0.474	$\pm$ 0.018	0.452	$\pm$ 0.033	0.409	$\pm$ 0.058	0.486	$\pm$ 0.01
	2	0.525	$\pm$ 0.015	0.53	$\pm$ 0.013	0.554	$\pm$ 0.029	0.526	$\pm$ 0.018	0.526	$\pm$ 0.018	0.575	$\pm$ 0.04	0.513	$\pm$ 0.088	0.513	$\pm$ 0.01

Cuadro 6. Heterocigosidad y polimorfismo en la población de adultos de *Phyllophaga obsoleta* capturados en Amatenango del Valle y de las poblaciones de las larvas de la misma especie sobrevivientes por localidad y por tratamiento.

	Heterocigosidad Observada	Heteoicigosidad Esperada	Polimorfismo
Adultos	0.294	0.267	60
Larvas	0.307	0.308	60
Tratamientos			
Composta	0.281	0.351	80
Hongo	0.318	0.283	60
Suelo	0.316	0.295	60
Localidad			
Aljo	0.280	0.336	80
San Nicolás	0.291	0.392	80
Los Olivos	0.318	0.276	60

El análisis de Hardy-Weinberg, con estadístico de  $\chi^2$ , mostró que en los tratamiento suelo y hongo los loci EST y GOT-1 se encuentran en EHW. (Cuadro 7). El estadístico  $F_{ST}$  indica poca diferenciación de larvas de *Phyllophaga obsoleta* por tratamiento y moderada diferenciación para los loci EST, GOT-2 Y EM-2 cuando las larvas son analizadas por localidad. Los estadísticos  $F_{IT}$  (para el total de larvas) y  $F_{IS}$  (para alguna población) muestran, en los tratamientos, un exceso de heterocigotos para los loci EST, GOT-1, GOT-2 y EM-1. Cuando las larvas son conjuntadas por localidad, el estadístico  $F_{IT}$  (para el total de larvas) muestran un exceso de heterocigotos en los loci EST, GOT-1 y GOT-2, y el estadístico  $F_{IS}$  (para alguna población) muestran un exceso de heterocigotos para los loci EST, GOT-1, GOT-2 y EM-1. Se encontró un exceso de homocigotos en el locus EM-2 sin importar su agrupación (Cuadro 8).

Cuadro 7. Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg por locus para los adultos de *Phyllophaga obsoleta* capturados en Amatenango del Valle y para las larvas de la misma especie sobrevivientes por tratamientos.

	Adultos		Larvas		Composta		Hongo		Suelo	
	P	$\chi^2$	P	$\chi^2$	P	$\chi^2$	P	$\chi^2$	P	$\chi^2$
EST	0.004	13.389	<b>0.064</b>	<b>7.254</b>	0.026	9.250	<b>0.428</b>	<b>2.770</b>	<b>0.734</b>	<b>1.280</b>
GOT-1	<0.001	75.000	<0.001	18.484	0.001	10.996	<b>0.869</b>	<b>0.027</b>	<b>0.935</b>	<b>0.007</b>
GOT-2	<0.001	58.317	<0.001	105.00	X	X	<0.001	39.000	X	X
EM-1	X	X	<0.001	105.00	<0.001	28.000	<0.001	39.000	<0.001	38.000
EM-2	<0.001	58.432	<0.001	80.391	<0.001	18.210	<0.001	31.761	<0.001	30.780

Cuadro 8. Estadísticos  $F$ 's por loci para la población del larvas *Phyllophaga obsoleta* sobrevivientes por tratamiento y localidad.

LOCUS	TRATAMIENTO			LOCALIDAD		
	$F_{IT}$	$F_{ST}$	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$	$F_{IS}$
EST	-0.121	0.005	-0.127	-0.083	0.065	-0.159
GOT-1	-0.025	0.006	-0.030	-0.002	0.045	-0.049
GOT-2	-0.012	0.008	-0.020	0.015	0.055	-0.042
EM-1	-0.217	0.007	-0.226	-0.196	0.036	-0.241
EM-2	0.418	0.011	0.412	0.044	0.076	0.394
Promedio	-0.034	0.007	-0.043	-0.006	0.047	-0.066

El análisis de distancia genética muestra que las larvas de *Phyllophaga obsoleta* de composta y suelo tienen una diferenciación genética de cero mientras que la distancia genética de las larvas del tratamiento con el hongo con respecto a las dos anteriores es de 0.0049. Asimismo, la población adulta de *P. obsoleta* de Amatenango del Valle (población de origen de los padres de las larvas) tiene una diferenciación de 0.0111 respecto a las larvas sobrevivientes a cada tratamiento (Figura 9).

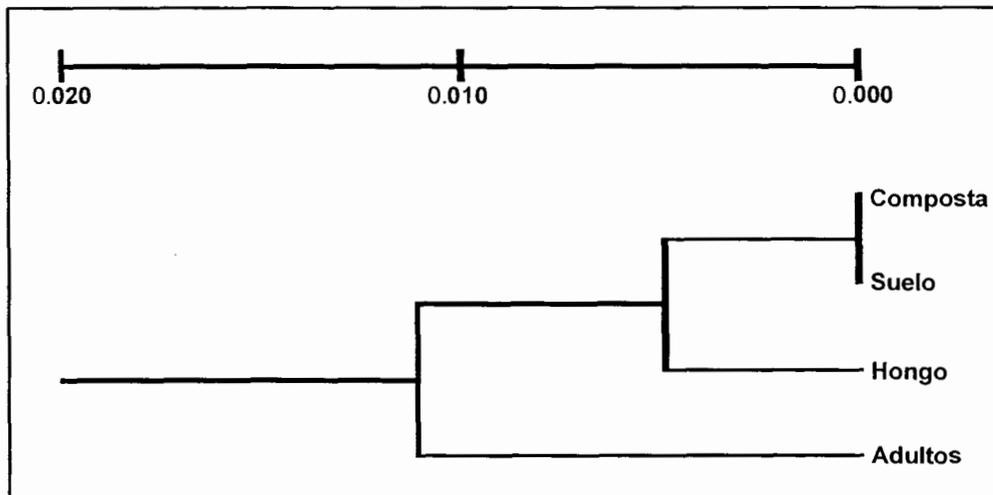


Figura 9: Distancia genética de las larvas sobrevivientes por tratamiento considerando los adultos de la localidad Amatenango del Valle.

## Genética de adultos

Se analizaron 242 adultos de *Phyllophaga obsoleta*. Para la localidad de Amatenango se analizaron 50 hembras y 30 machos, para Aljó 27 hembras y 30 machos, para San Nicolás 30 hembras y 25 machos y para Los Olivos 24 hembras y 26 machos. Se revelaron exitosamente cinco loci EST, GOT-1, GOT-2, EM-1 y EM-2. A nivel de toda la población (machos y hembras juntos) el locus EST presentó tres alelos en todas las poblaciones. El locus GOT-1 registró tres alelos en San Nicolás y Los Olivos, en Amatenango y Aljó solo dos (alelos 1 y 2). Los loci GOT-2 y EM-2 presentaron los alelos 1 y 2 en todas las poblaciones. La EM-1 presentó los alelos 1 y 2 en las poblaciones de Aljó, San Nicolás y Los Olivos, pero el alelo 2 de este mismo locus se encontró fijo en Amatenango. Para las hembras de las poblaciones de San Nicolás y Los Olivos se registraron 3 alelos del locus GOT-1, sólo se encontraron los alelos 1 y 2 en Amatenango y Aljó. En machos de la población de Aljó el alelo 2 del locus GOT-1 se encontró fijo, y en el resto de las poblaciones de machos se registraron los alelos 1 y 2. Asimismo, se encontró fijo en las hembras de San Nicolás el alelo 2 del locus GOT-2. También el alelo 2 del locus EM-1 se encontró fijo en machos y hembras de Amatenango, para hembras de Aljó y de San Nicolás, y para machos de Los Olivos. Se observó una mayor frecuencia del alelo 2 en la mayoría de los loci, excepto en Los Olivos donde la frecuencia de los dos alelos es la misma y en los machos de Amatenango donde el alelo 1 es el más frecuente (Cuadro 9).

Los marcadores genéticos que mostraron diferencias en las frecuencias alélicas entre machos y hembras de San Nicolás, al comparar sus intervalos de confianza con 95 %, fueron EST, GOT-1 y GOT-2. En las poblaciones de Amatenango sólo el marcador EM-2 fue diferente entre machos y hembras. En Los Olivos, machos y hembras difieren para EM-1 y para GOT-1, puesto que los machos no exhibieron el alelo 3 del locus GOT-1. Al realizar la comparación entre localidades se encontró que en Amatenango con Los Olivos (EST y EM-1) y Aljó con San Nicolás (EST y GOT-1) son los que presentan un menor número de loci que difieren significativamente. Todas las demás comparaciones difieren en tres loci. Asimismo, las hembras de las localidades de Amatenango y Aljó solo difieren en la EM-1 y los de Amatenango y San Nicolás difieren en los marcadores EST, GOT-1, GOT-2

y EM-2. Las localidades de machos con menor número de marcadores que difieren entre sí son Amatenango y San Nicolás (GOT-1) y las localidades que difieren en más marcadores es Aljó y San Nicolás (GOT-1, GOT-2, EM.1 y EM-2) (Cuadro 9).

Para hembras el polimorfismo mayor se registró en Los Olivos (80%) mientras que el menor fue en Amatenango (40%). Para machos y para la población total (hembras y machos) el mayor polimorfismo se registro en San Nicolás (80%), mientras que el menor de 40% fue en Aljó. El polimorfismo promedio para los adultos de *Phyllophaga obsoleta* fue de 60%. La heterocigosidad varió de 0.251 (machos de Amatenango) hasta 0.32 (hembras de Amatenango; Cuadro 10).

El análisis de Hardy-Weinberg mostró que sólo la población de *Phyllophaga obsoleta* de Aljó está en equilibrio para el locus EST (Cuadro 11). El estadístico  $F_{ST}$  muestra poca diferenciación de las poblaciones analizadas de *Phyllophaga obsoleta* en machos y hembras. Los estadísticos  $F_{IT}$  (para el total de adultos) y  $F_{IS}$  (para cada población) señalan que las hembras analizadas tienen exceso homocigotos en el locus EM-2 y exceso de heterocigotos en los loci EST, GOT-1, GOT-2 y EM-1. Los machos muestran exceso de heterocigotos en los loci GOT-1, GOT-2 y EST, y exceso de homocigotos en los loci EM-1 y EM-2 (Cuadro 12).

El análisis de distancia genética en cada una de las poblaciones completas (hembras y machos) reveló que los adultos de *Phyllophaga obsoleta* de las localidades de Amatenango y Los Olivos se encuentran estrechamente relacionadas con una distancia genética de 0.0001, es decir con muy poca o prácticamente nula diferenciación. La población de Aljó tiene una menor relación con las anteriores comunidades (0.0014). San Nicolás presenta una distancia genética de 0.0050 respecto a las otras poblaciones. Las hembras muestra un patrón entre poblaciones similar, sin embargo las distancias genéticas resultantes son de 0.0000, 0.0019 y 0.0128 entre Amatenango/Los Olivos, Amatenango- Los Olivos/Aljó y estas tres con San Nicolás respectivamente. Al medir la distancia genética entre machos se obtuvo que las comunidades de Amatenango, San Nicolás y Los Olivos no presentan diferenciación alguna (0.0000) mientras que Aljó presentó una diferenciación genética de 0.0022 con respecto a las tres localidades (Figura 10)

Cuadro 9: Frecuencias alélicas  $\pm$  E.E. (error estándar para obtener los intervalos de confianza al 95 %) de cinco loci enzimáticos de cuatro poblaciones de adultos de *Phyllophaga obsoleta* del municipio de Amatenango del Valle, Chiapas, México. Cada población fue analizada por sexo separados y como una sola población.

Locus	Alelo	AMATENANGO						ALJO						SAN NICOLÁS						LOS OLIVOS					
		Pob	EE	Hem	EE	Mach	EE	Pob	EE	Hem	EE	Mach	EE	Pob	EE	Hem	EE	Mach	EE	Pob	EE	Hem	EE	Mach	EE
Est	1	0.228 $\pm$ 0.033		0.23 $\pm$ 0.035		0.232 $\pm$ 0.067		0.317 $\pm$ 0.049		0.283 $\pm$ 0.065		0.35 $\pm$ 0.071		0.356 $\pm$ 0.048		0.431 $\pm$ 0.068		0.283 $\pm$ 0.065		0.25 $\pm$ 0.043		0.208 $\pm$ 0.058		0.283 $\pm$ 0.061	
	2	0.456 $\pm$ 0.037		0.45 $\pm$ 0.059		0.482 $\pm$ 0.075		0.408 $\pm$ 0.053		0.471 $\pm$ 0.066		0.4 $\pm$ 0.076		0.483 $\pm$ 0.051		0.517 $\pm$ 0.071		0.45 $\pm$ 0.072		0.509 $\pm$ 0.056		0.542 $\pm$ 0.083		0.483 $\pm$ 0.076	
	3	0.316 $\pm$ 0.038		0.32 $\pm$ 0.044		0.286 $\pm$ 0.071		0.475 $\pm$ 0.037		0.3 $\pm$ 0.061		0.25 $\pm$ 0.07		0.161 $\pm$ 0.037		0.052 $\pm$ 0.028		0.167 $\pm$ 0.059		0.241 $\pm$ 0.047		0.25 $\pm$ 0.066		0.233 $\pm$ 0.066	
Got-1	1	0.04 $\pm$ 0.023		0.044 $\pm$ 0.031		0.034 $\pm$ 0.033		0.013 $\pm$ 0.016		0.033 $\pm$ 0.033		0 $\pm$ 0		0.149 $\pm$ 0.043		0.111 $\pm$ 0.048		0.183 $\pm$ 0.069		0.102 $\pm$ 0.038		0.063 $\pm$ 0.045		0.133 $\pm$ 0.057	
	2	0.96	0.023	0.956	0.03	0.965	0.034	0.953	0.039	0.967	0.033	1	0	0.186	0.071	0.815	0.075	0.817	0.069	0.88	0.041	0.896	0.059	0.876	0.054
	3	— $\pm$ —		— $\pm$ —		— $\pm$ —		— $\pm$ —		— $\pm$ —		— $\pm$ —		0.035 $\pm$ 0.024		0.074 $\pm$ 0.05		— $\pm$ —		0.018 $\pm$ 0.018		0.042 $\pm$ 0.041		— $\pm$ —	
Got-2	1	0.06 $\pm$ 0.027		0.044 $\pm$ 0.031		0.086 $\pm$ 0.048		0.033 $\pm$ 0.021		0.05 $\pm$ 0.036		0.017 $\pm$ 0.017		0.053 $\pm$ 0.03		0 $\pm$ 0		0.1 $\pm$ 0.055		0.037 $\pm$ 0.026		0.042 $\pm$ 0.041		0.033 $\pm$ 0.033	
	2	0.94 $\pm$ 0.028		0.956 $\pm$ 0.03		0.914 $\pm$ 0.054		0.967 $\pm$ 0.032		0.95 $\pm$ 0.043		0.983 $\pm$ 0.029		0.947 $\pm$ 0.03		1 $\pm$ 0		0.9 $\pm$ 0.055		0.963 $\pm$ 0.026		0.958 $\pm$ 0.041		0.967 $\pm$ 0.033	
Em-1	1	0 $\pm$ 0		0 $\pm$ 0		0 $\pm$ 0		0.017 $\pm$ 0.017		0 $\pm$ 0		0.034 $\pm$ 0.034		0.017 $\pm$ 0.017		0.033 $\pm$ 0.033		0 $\pm$ 0		0.038 $\pm$ 0.026		0.083 $\pm$ 0.056		0 $\pm$ 0	
	2	1 $\pm$ 0		1 $\pm$ 0		1 $\pm$ 0		0.983 $\pm$ 0.017		1 $\pm$ 0		0.965 $\pm$ 0.034		0.983 $\pm$ 0.017		0.967 $\pm$ 0.033		1 $\pm$ 0		0.962 $\pm$ 0.026		0.917 $\pm$ 0.056		1 $\pm$ 0	
Em-2	1	0.475 $\pm$ 0.015		0.51 $\pm$ 0.01		0.414 $\pm$ 0.034		0.421 $\pm$ 0.027		0.37 $\pm$ 0.05		0.467 $\pm$ 0.023		0.418 $\pm$ 0.028		0.45 $\pm$ 0.036		0.38 $\pm$ 0.043		0.5 $\pm$ 0		0.5 $\pm$ 0		0.5 $\pm$ 0	
	2	0.525 $\pm$ 0.015		0.49 $\pm$ 0.01		0.586 $\pm$ 0.033		0.579 $\pm$ 0.024		0.63 $\pm$ 0.042		0.533 $\pm$ 0.023		0.582 $\pm$ 0.028		0.55 $\pm$ 0.036		0.62 $\pm$ 0.043		0.5 $\pm$ 0		0.5 $\pm$ 0		0.5 $\pm$ 0	

Cuadro 10: Heterocigosidad y polimorfismo de cuatro poblaciones adultas de *Phyllophaga obsoleta* colectadas en el municipio de Amatenango del Valle, Chiapas, México. Cada población fue analizada por sexo separados y como una sola población.

Población Sexo	Heterocigosidad observada	Heterocigosidad esperada	Polimorfismo
Amatenango	0.294	0.267	60
Hembras	0.320	0.265	40
Machos	0.251	0.273	60
Aljó	0.263	0.257	40
Hembras	0.261	0.261	60
Machos	0.260	0.254	40
San Nicolás	0.262	0.312	80
Hembras	0.263	0.289	60
Machos	0.259	0.325	80
Los Olivos	0.304	0.299	60
Hembras	0.311	0.308	80
Machos	0.300	0.290	60

Cuadro 11. Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg por locus para las cuatro poblaciones de adultos de *Phyllophaga obsoleta* colectadas en el municipio de Amatenango del Valle, Chiapas, México.

	Amatengo		San Nicolás		Aljó		Los Olivos	
	P	$\chi^2$	P	$\chi^2$	P	$\chi^2$	P	$\chi^2$
EST	0.004	13.389	0.003	14.036	<b>0.209</b>	<b>4.535</b>	0.025	9.386
GOT-2	< 0.001	75.000	< 0.001	60.000	< 0.001	106.344	< 0.001	80.135
GOT-2	< 0.001	58.317	0.002	13.983	< 0.001	57.000	< 0.001	54.000
EM-1	X	X	< 0.001	59.000	< 0.001	57.000	< 0.001	53.000
EM-2	< 0.001	58.432	< 0.001	30.149	< 0.001	22.182	< 0.001	50.000

Cuadro 12. Estadísticos  $F'_s$  de cuatro poblaciones adultas de *Phyllophaga obsoleta* colectadas en el municipio de Amatenango del Valle, Chiapas, México. Cada población fue analizada por sexos separados y como una sola población.

LOCUS	$F_{IT}$			$F_{ST}$			$F_{IS}$		
	Pob	H	M	Pob	H	M	Pob	H	M
EST	-0.184	-0.188	-0.173	0.011	0.012	0.017	-0.197	-0.202	-0.193
GOT-1	-0.101	-0.159	-0.035	0.004	0.019	-0.006	-0.105	-0.181	-0.029
GOT-2	-0.045	-0.083	-0.000	0.010	0.020	0.002	-0.055	-0.105	-0.002
EM-1	-0.011	-0.070	0.054	0.009	0.018	0.002	-0.020	-0.089	0.053
EM-2	0.446	0.383	0.530	0.010	0.021	-0.001	0.440	0.370	0.051
Promedio	-0.025	-0.083	0.042	0.007	0.019	-0.002	-0.034	-0.108	0.048

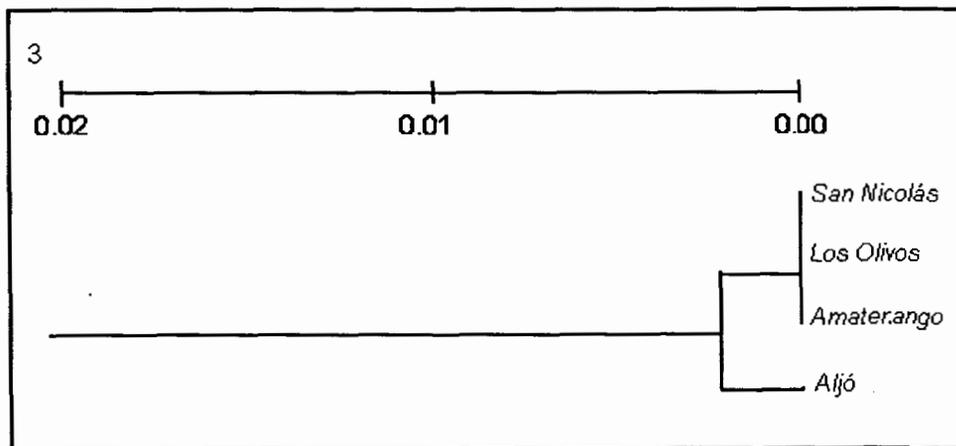
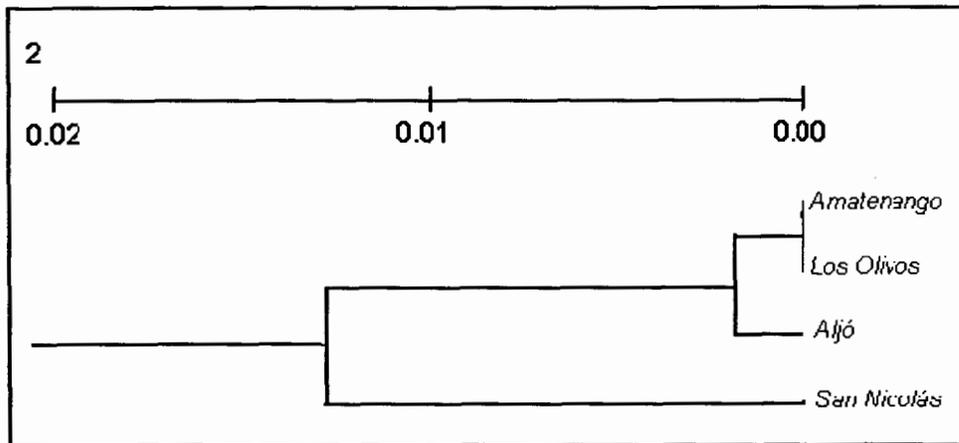
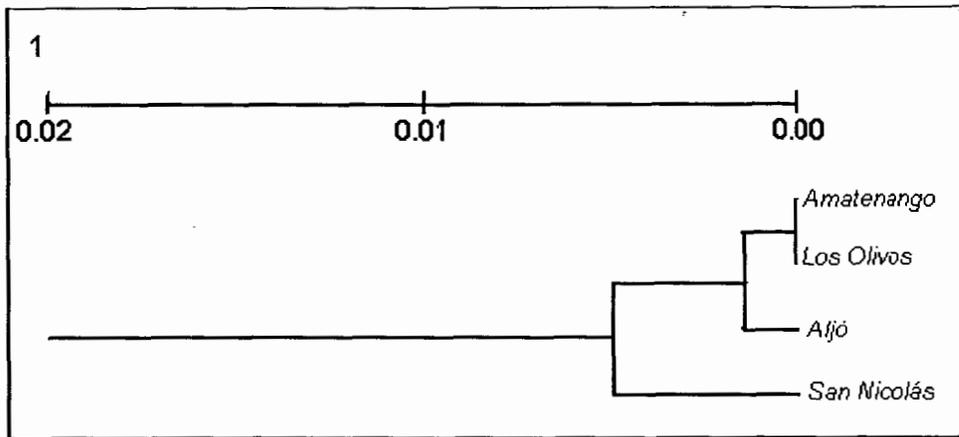


Figura 10: Distancia genética de las cuatro poblaciones de adultos de *Phyllophaga obsoleta*. 1. Población total (machos y hembras), 2. Población de hembras, 3. Población de Machos.

## DISCUSIÓN

### Crecimiento del maíz

El análisis de varianza mostró que las diferencias en crecimiento fueron estadísticamente distintas entre tratamiento y entre localidades. Así, El mayor crecimiento entre las localidades se presentó en Los Olivos y el mayor crecimiento entre tratamientos se dio en los testigos de San Nicolás y Los Olivos(Figura 6). El mayor crecimiento en Los Olivos pudo deberse a su mayor cantidad de materia orgánica (Los Olivos; 8.4%, San Nicolás; 6.9% y Aljó 4.4%) o a la falta de lluvias en la región (una planta de maíz requiere de 160 a 200 litros de agua para su desarrollo; Curtis *et al.* 2000), que afecto en mayor medida a San Nicolás y a Aljó, ya que en Los Olivos se observó una mayor humedad causada por la precipitación horizontal (condensación del agua de la neblina sobre la vegetación). Sin embargo, esto no es consistente con el rendimiento menor del tratamiento composta y hongo en las localidades de San Nicolás y Los Olivos respecto a sus testigos. Probablemente, lo anterior se deba a que en los testigos no se encontraron larvas y el maíz no pudo ser afectados por las mismas, pero el bajo número de larvas encontradas en los tratamientos (composta, hongo y suelo; Figura 8 ) no permite mostrar si estas tuvieron una influencia importante en el desarrollo del maíz También influyo que el testigo no se cubrió con tul, ya que este afecta la retención superficial del agua y la captación de luz para la fotosíntesis.

La tasa de crecimiento final del maíz del tratamiento composta fue mayor que en los tratamientos de hongo y suelo en las tres localidades. La tasa de los tratamientos hongo y suelo fueron muy similares en todas las localidades (Figura 6). Esto indica que la composta proporciona nutrimentos a la planta aumentando el rendimiento de las plántulas. Al observar las Figura 7 es evidente que existe un crecimiento acelerado en las primeras etapas de desarrollo y que es favorecido por la adición de composta, pero al seguir las curvas de las tasas de crecimiento no se aprecian grandes diferencias entre cada tratamiento. Así, aunque dos testigos tuvieron la mayor tasa de crecimiento final la composta tuvo un efecto importante en la primera etapa de desarrollo del maíz .

### **Sobrevivencia de larvas (mortalidad en laboratorio, sobrevivencia en campo y genética)**

El número promedio de larvas entre tratamientos fueron estadísticamente diferentes dentro y entre localidades. Sin embargo, el bajo número de larvas no permite mostrar si el hongo tuvo el efecto esperado en su mortalidad. Además, la sobrevivencia de larva no fue homogénea entre tratamientos ni entre localidades, lo que indica que la mortalidad de las larvas estuvo asociada a factores distintos a los que se consideraron en el presente estudio (Cuadros 2, 3, y 4). Es probable que la baja frecuencia de larvas se debió a que el periodo de sequía fue lo suficientemente prolongado para producir la muerte de las larvas que hayan eclosionado o a que las hembras murieron antes de dejar descendencia.

En Los Olivos se registró el mayor número de larvas sobrevivientes y el tratamiento con hongo de esta localidad fue el que mostró mayor número de larvas (Cuadro 2 y Figura 8). Régnière (1981) observó que la humedad del suelo es una característica importante que afecta la sobrevivencia y la abundancia de insectos rizófagos. King (1994) encontró que las raíces vivas y los suelos ligeramente ácidos parecen ser cruciales para la sobrevivencia de la especie durante su vida edáfica y que las hembras de *Phyllophaga* tienen una preferencia notable por depositar sus huevos en suelos ricos en humus y en áreas con gramíneas. Así, el mayor número de larvas en Los Olivos pudo deberse a que en esta se registró mayor precipitación horizontal, lo que proporcionó mayor humedad del suelo. Asimismo, Los Olivos es la localidad que presentó menor pH (7.2), mayor concentración de materia orgánica (8.4%) y su suelo se cubrió rápidamente de hierbas rastreras, cuyas raíces, le proporcionaron alimento a las larvas.

Aunque no se observó en campo el patrón de número de larvas esperado, menor número de larvas en el tratamiento hongo, no se descarta como medida de control. Las observaciones en el laboratorio sugieren que el hongo incrementa la mortalidad de adultos y huevos de *Phyllophaga obsoleta*. Probablemente el hongo no tuvo el efecto que se esperaba en campo debido a que la mayor actividad del hongo (incidencia de larvas atacadas) aumenta hacia los últimos meses del año (octubre- noviembre), posterior al nacimiento de larvas, al

daño a los cultivos y a la finalización del experimento (Castro-Ramírez y Ramírez-Salinas 1999, Ramírez-Salinas y Castro Ramírez 2000). Por lo tanto, es posible que la aplicación del hongo, en una parcela determinada, tenga efecto en la abundancia de larvas de *P. obsoleta* en el siguiente ciclo agrícola. También es factible que el efecto se incremente si el hongo es aplicado directamente al suelo una vez que las larvas han eclosionado.

Por otra parte, los análisis genéticos sugieren que el hongo tuvo efecto sobre la genética de las larvas. Si el hongo es un factor de mortalidad no aleatoria de las larvas, es decir selectivo sobre las larvas, se esperaría (1) una reducción en la diversidad genética (menor heterocigosidad y polimorfismo), (2) loci en desequilibrio de HW, (3) diferenciación entre poblaciones, (4) diferencias en la estructura genética de hongo respecto a otros tratamientos y la población adulta de Amatenango, (5) una mayor distancia genética de las larvas del tratamiento con hongo con respecto a los otros tratamientos (Hartl y Clark 1997, Eguiarte 1999).

La heterocigosidad esperada y el polimorfismo en las poblaciones de larvas sugiere que hubo un efecto de los tratamientos composta y hongo sobre las larvas sobrevivientes, pero en sentidos opuestos, ya que mientras que en la composta aumentó la heterocigosidad y el polimorfismo respecto a la población adulta, el tratamiento con hongo disminuyó la heterocigosidad. Las larvas de la población del tratamiento suelo tuvieron el mismo porcentaje de polimorfismo y valores parecidos de heterocigosidad si se comparan también con la población de adultos. Al parecer, la composta mejoró las condiciones de cada cilindro en el aspecto de disponibilidad de alimento (propicio el crecimiento de pequeñas raíces) lo que aumentó la probabilidad de superviviencia de genotipos diferentes y por ende el polimorfismo y de heterocigosidad aumentaron. La población de larvas del tratamiento suelo, al estar sujeto a condiciones similares que sus antecesores, seleccionó los mismos fenotipo, por lo que su diversidad genética no vario. Los hongos al actuar causaron la muerte de las larvas susceptibles y quedaron las resistentes, actuando así la selección natural (Cuadro 6).

Sin embargo, se encontraron dos loci en EHW en el tratamiento con hongo y suelo mientras que en el de composta no se encontró ninguno (Cuadro 7) y los estadísticos  $F'st$  muestran que existe poca diferenciación entre los distintos tratamientos (Cuadro 8). Aun así, las diferencias en las frecuencias alélicas (comparadas por sus IC) muestran que las poblaciones de larvas sobrevivientes a los tratamientos de composta y suelo son iguales, pero existe mayor distancia genética de estas dos poblaciones con respecto a la de hongo. Así, aunque la población de los adultos difiere en menor medida a la población del tratamiento hongo que a las otras poblaciones, es evidente que los tratamientos composta y suelo estuvieron bajo fuerzas genéticas distintas al de la población del tratamiento hongo. Asimismo, El análisis de distancia genética es consistente con los patrones en las diferencias en frecuencias alélicas (Figura 9). Posiblemente estas diferencias están dadas por los tratamientos y también por las diferencias ambientales que hay entre localidad y que anteriormente fueron mencionadas. Resaltan principalmente las diferencias en condiciones del tratamiento hongo y de la localidad de Los Olivos. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la diferenciación genética es promovida por los tratamientos y por las condiciones particulares de cada localidad

Para poder conocer más a detalle el efecto del hongo y la composta en la diversidad y estructura genética de la especie es necesario que en futuros estudios se incorporen un mayor número de loci y diseñar experimentos que permitan la colecta de un mayor número de individuos. Esto evitará el sesgo que podría causar un número bajo de individuos analizados con un número reducido de loci. También es importante diseñar experimentos donde la mayoría de las condiciones puedan ser controladas y medidas para conocer con mayor precisión cuáles son los fenómenos que actúan sobre las mortalidad y la diversidad genética de las larvas. Asimismo, sería interesante estudiar el efecto de interacción composta y hongo puesto que la combinación podría ser una opción ecológica y económicamente aceptable.

## Genética de adultos

El nivel de diversidad genética que tienen las poblaciones de Amatenango del Valle puede considerarse alto. El polimorfismo, estimador de diversidad genética, tuvo valores por arriba del observado en otras especies de coleópteros. González-Rodríguez *et al.* (2000) encontró 23.3 % en *Acanthoscelides obvelatus* Bridwell. Asimismo, el polimorfismo encontrado en *Phyllophaga obsoleta* (60%) fue similar al de las poblaciones de *A. obtectus* Say (72.2%) y *Chrysomela tremula* Fabricius (71%) estudiadas por González-Rodríguez *et al.* (2000) y Génissel *et al.* (2000). También, la heterocigosidad promedio fue relativamente alta en las poblaciones de *P. obsoleta* (0.28) al compararla con la presentada en poblaciones de *A. obvelatus* (0.09) estudiadas por González-Rodríguez *et al.* (2000). No obstante, los valores estuvieron cercanos al reportado para invertebrados en general (0.30; Kimura 1983; citado por Falconer y Mackay 2001) y para especies plaga como *A. obtectus* y *Chrysomela tremula* (0.26) estudiadas por González-Rodríguez *et al.* (2000) y Génissel *et al.* (2000).

Los estadísticos  $F_{IT}$  y  $F_{IS}$  muestran que existe un exceso de heterocigotos para las poblaciones estudiadas (Cuadro 12). Según Falconer y Mackay (2001) los altos niveles de heterocigosidad promueven altos niveles de polimorfismo. Esta relación ocurrió en las poblaciones de *Phyllophaga obsoleta*. Es posible que los altos niveles de diversidad genética de *P. obsoleta* se asocie con la variación del ambiente (a nivel físico y biótico). Así mismo, según los resultados de baja diferenciación genética entre poblaciones puede existir un amplio flujo genético entre ellas. La migración ocasiona la homogeneización de las poblaciones, siempre y cuando la selección natural no actúe en contra de los individuos migrantes (Eguiarte 1999). Es posible que la especie, durante la búsqueda de la pareja, de alimento y lugar donde depositar sus huevos, propicie el flujo genético entre las poblaciones. Esto es congruente con que la mayoría de los loci se encuentran en desequilibrio HW (Cuadro 11), lo cual quiere decir que las poblaciones de *Phyllophaga obsoleta* se encuentran bajo la influencia de la migración, mutación, selección natural, apareamiento no aleatorio o deriva génica (Hartl y Clark 1997). De hecho, los altos niveles de heterocigotos indican que hay fenómenos que actúan a su favor. Es importante que en un futuro se establezcan la asociación de la diversidad genética con los factores ambientales

Sin embargo, lo anterior no explica que el loci EST en Alj6 este en EHW y tampoco explica que en machos, la poblaci6n de Alj6 es la 6nica que muestra distancia gen6tica respecto al resto (Cuadro 11 y Figura 10). Es posible que esta mayor distancia gen6tica y el EHW de la enzima EST en Alj6 pueden ser el producto del aislamiento geogr6fico de la localidad (Ap6ndice 1). Este aislamiento puede provocar una menor migraci6n entre poblaciones teniendo por resultado una mayor tendencia a que los loci permanezcan en EHW y una mayor distancia gen6tica.

Es importante notar que la estructura gen6tica difiere entre machos y hembras. Las localidades que presentan mayor n6mero de marcadores cuyas frecuencias difieren entre las poblaciones de hembras fue Amatenango y San Nicol6s, mientras que entre machos estas poblaciones difieren e menor n6mero de marcadores, como se esperar6 por la cercan6a. En las localidades de Amatenango y Alj6 se describe un efecto similar ya que para machos se tiene tres marcadores que difieren y en hembras solo uno. La diferenciaci6n resulta aun mas evidente en el locus GOT-1 ya que el alelo m6s lento no se expres6 en machos. Es posible que los factores ecol6gicos y/o evolutivos no inciden de la misma manera sobre ambos sexos y que en el locus GOT- 1 ocurra herencia ligada al sexo (Cuadro 9).

La mala resoluci6n de los acetatos podr6 ocasionar errores al coleccionar los resultados. Sin embargo, la resoluci6n de los acetatos fue considerada adecuada en los an6lisis de este trabajo. Tambi6n, el n6mero reducido de loci analizados para cada una de las poblaci6nes podr6 sesgar los resultados por lo que es recomendable, en futuros estudios, aumentar en n6mero de loci analizados y el n6mero de individuos coleccionados.

## CONCLUSIONES

- La diferencia en el crecimiento del maíz entre localidades fue ocasionada por las características climáticas y edáficas, mientras que la diferencia entre tratamientos fue ocasionada por el efecto inicial de la composta en el maíz y por el testigo.
- El bajo número de larvas encontradas en campo no permite mostrar si el hongo tuvo el efecto esperado en la mortalidad de larvas, sin embargo, en laboratorio el hongo incremento la mortalidad de larvas y adultos de *Phyllophaga obsoleta*.
- El hongo y la composta tuvieron diferentes efectos sobre la diversidad genética de larvas, puesto que la aplicación de la composta la aumentó, el hongo la redujo y el suelo mantuvo los niveles respecto a la población adulta.
- Los cambios en la estructura y diversidad genética de larvas no fueron suficientes para que se observara una diferenciación genética relevante.
- La diferenciación entre las poblaciones de adultos de *Phyllophaga obsoleta* es baja pero mantienen altos niveles de diversidad genética.
- Hay factores que provocan el desequilibrio HW en la mayoría de los loci en las cuatro localidades, estos factores actúan a favor de los heterocigotos.
- La población de Aljó presenta algún grado de aislamiento, puesto que sus machos fueron los únicos que mostraron diferenciación genética respecto a las otras localidades.
- La estructura de machos y hembras es diferente. Esta diferenciación puede relacionarse a herencia ligada al sexo o a la existencia de selección sexual.
- Es necesario realizar investigaciones para diferenciar las poblaciones de *Phyllophaga obsoleta* y evaluar la intensidad del cambio en la estructura genética producto de los diferentes sistemas de control en las distintas poblaciones

## LITERATURA CITADA

- Albert, L.A., F. Badillo y C. Bárcenas. Los Piretroides. Pp 163-173. En: Albert, L.A. (Coord.). 1990. Los Plaguicidas el Ambiente y la Salud. Centro de Ecodesarrollo, México.
- Alpuche, G.L. Los Carbamatos. Pp 139-155. En: Albert, L.A. (Coord.). 1990a. Los Plaguicidas el Ambiente y la Salud. Centro de Ecodesarrollo, México.
- Alpuche, G.L. Los Insecticidas Organofosforados. Pp 121-138. En: Albert, L.A. (Coord.). 1990b. Los Plaguicidas el Ambiente y la Salud. Centro de Ecodesarrollo, México.
- Aragón, G.A., M.A. Morón, J.F. 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 Zoológica Mexicana 21: 87-99.
- Aranda, E.H. El Manejo Integrado de Plagas: Origen, Conceptos, Herramientas y su Aplicación en México. Pp 275-284. En: Albert, L.A. (Coord.). 1990. Los Plaguicidas el Ambiente y la Salud. Centro de Ecodesarrollo, México.
- Bárcenas, P.C. Las Piretrinas. Pp 157-162. En: Albert, L.A. (Coord.). 1990. Los Plaguicidas el Ambiente y la Salud. Centro de Ecodesarrollo, México.
- Carter, A.M.C., J.L. Robertson, R.A. Haack, R.K. Lawrence, J.L. Hayes. 1996. Genetic Relatedness of North American Populations of *Tomicus piniperda* (Coleoptera: Scolytidae). Journal of Economic Entomology 89:1345-1353.
- Castro-Morales, C. y R. Zamora-Basillio. 2000. Control Biológico y Químico de *Phyllophaga* sp. en Pastos del Museo la Avispa de Chipalcingo, Guerrero, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Guerrero. México.
- Castro-Ramírez, A.E. y C. Ramírez-Salinas. 2001. Enemigos Naturales de *Phyllophaga obsoleta* en San Cristóbal de las Casas, Chiapas. Pp 103. En: Camargo, S.G.S., A.M. Moreno, J.P. Ramírez M.I. González (Comp.). Memorias del XXXVI Congreso Nacional de Entomología. Sociedad Mexicana de Entomología A.C. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Querétaro. Querétaro. México.
- Castro-Ramírez, A.E., C. Ramírez-Salinas y L. Ruiz-Montoya. 1998. Evaluación del Daño del Maíz Causado por "Gallina Ciega" (Coleoptera: Melolonthidae) en Amatenango del

- Valle, Chiapas, México. Pp 07-120. En: Morón, M.A. y A. Aragón (Eds.). Avances en el Estudio de la Diversidad, Importancia y Manejo de los Coleópteros Edafícolas Americanos. Publicación Especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y la Sociedad Mexicana de Entomología, A.C. Puebla, México.
- Castro-Ramírez, A.E., J.A. Cruz-López, R.H. Perales, C. Ramírez-Salinas y L. Hernández-López. 2001. Composta y Rizofagia de Cuatro Especies de *Phyllophaga* Bajo Invernadero. 4 pp. En: V Reunión Latinoamericana de Scarabaeoidología. Quito Ecuador.
- Castro-Ramírez, A.E., J.A. Cruz-López, C. Ramírez-Salinas, H.P. Rivera, y J.A. Gómez M. 2003. Manejo de Gallina Ciega (Coleoptera: Melolonthidae) Con Trampas de Luz en Chiapas, México. Pp 81-86. En: Onore, G. y P. Reyes-Catillo (Comp.). Escarabeidos de Latinoamérica: Estado del Conocimiento. Volumen 3. Monografías Tercer Milenio. Sociedad Entomológica Aragonesa.
- Castro-Ramírez, A.E., C. Ramírez-Salinas y C. Pacheco-Flores. 2004. Guía Ilustrada Sobre: "Gallina Ciega" en la Región de los Altos de Chiapas. El Colegio de la Frontera Sur, San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México.
- Castro-Ramírez, A.E., L. Ruiz-Montoya, C. Ramírez-Salinas, C. Pacheco-Flores y M de J. Méndez-Aguilar. 2004. Introducción al Manejo Integrado de Plagas Insectiles del Maíz, con Énfasis en "Gallina Ciega". Manual: Curso de Capacitación. ECOSUR y PRODUCE, Chiapas.
- COESPO (Consejo Estatal de Población). 2002. Diagnóstico Sociodemográfico y Económico. Amatenango del Valle, Chiapas, México.
- COVECA (Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria). 2002. Perfil del Maíz. En: <http://www.coveca.gob.mx/documentos/maíz.pdf#search='maíz%20chiapas%20toneladas'>.
- Cruz-López, J.A. 1999. Alternativas de Manejo de "Gallina Ciega" (Coleoptera: Melolonthidae) en Maíz en Amatenango del Valle, Chiapas. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad de Ciencias y Artes del Estado de Chiapas, Escuela de Biología. Tuxtla Gutiérrez, Chipas, México.

- Cruz-López, J.A., A.E. Castro-Ramírez, C., Ramírez-Salinas y B.G., Gómez. 2001. Supresión Manual de Adultos de *Phyllophaga* spp. y *Anomala* spp. en Maíz en México. Manejo Integrado de Plagas 59:41-47.
- Curtis, H., S. Barnes, A. Schnek, G. Flores. 2000. Biología. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- DeBach, P. 1978. Alcance del Control Biológico. Pp 31-48. En: DeBach, P. (Comp.). Control biológico de Plagas de Insectos y Malas Hierbas. Continental. Argentina.
- Dubois, T., E.A. Hajek, H. Jiafu, y Z. Li, 2004. Evaluation the Efficiency of Entomopathogenic Fungi Against the Asian Longhorned Beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae), by Using Cages in the Field. Environmental Entomology 33:62-74.
- Eguiarte, L.E. 1999. Una Guía Para Principiantes a la Genética de Poblaciones. Pp 35-50. En: Núñez-Farfán, J. y L.E. Eguiarte (Comp.). Evolución Biológica. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Falconer, D.S. y T.F.C. Mackay. 2001. Introducción a la Genética Cuantitativa. Acribias. Zaragoza, España.
- Flores, A.G., W. De la Rosa, J.C. Rojas, y A.E. Castro- Ramírez. 2002. Evaluation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Mistosporic) Against Species of the "White Group Complex" in the South of México. Southwestern Entomologist 27:73-83.
- Génissel, A., F. Viard y D. Bourguet. 2000. Population Genetic of *Chrysomela tremulae*: a First Towards Management of Transgenic *Bacillus thuringiensis* poplar *Populus tremula* x *P.tremuloides*. Hereditas 133:85-93.
- Gómez, B., F.J. Villalobos y L. Ruíz-Montoya. 1999a. Observaciones Sobre la Biología de Melolontidos (Coleoptera: Scarabaeoidea) en una Localidad de los Altos de Chiapas, México. Acta Zoológica Mexicana 78:173-177.
- Gómez, B., F.J. Villalobos, L. Ruíz-Montoya, A.E. Castro-Ramírez y J. Valle. 1999b. El Complejo Gallina Ciega (Coleoptera: Melolonthidae) en Maíz en los Altos de Chiapas, México: Su Relación con el Tiempo de Uso Agrícola y la Materia Orgánica del Suelo. Folia Entomológica Mexicana 107:1-20.

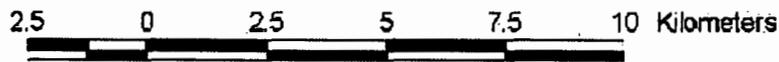
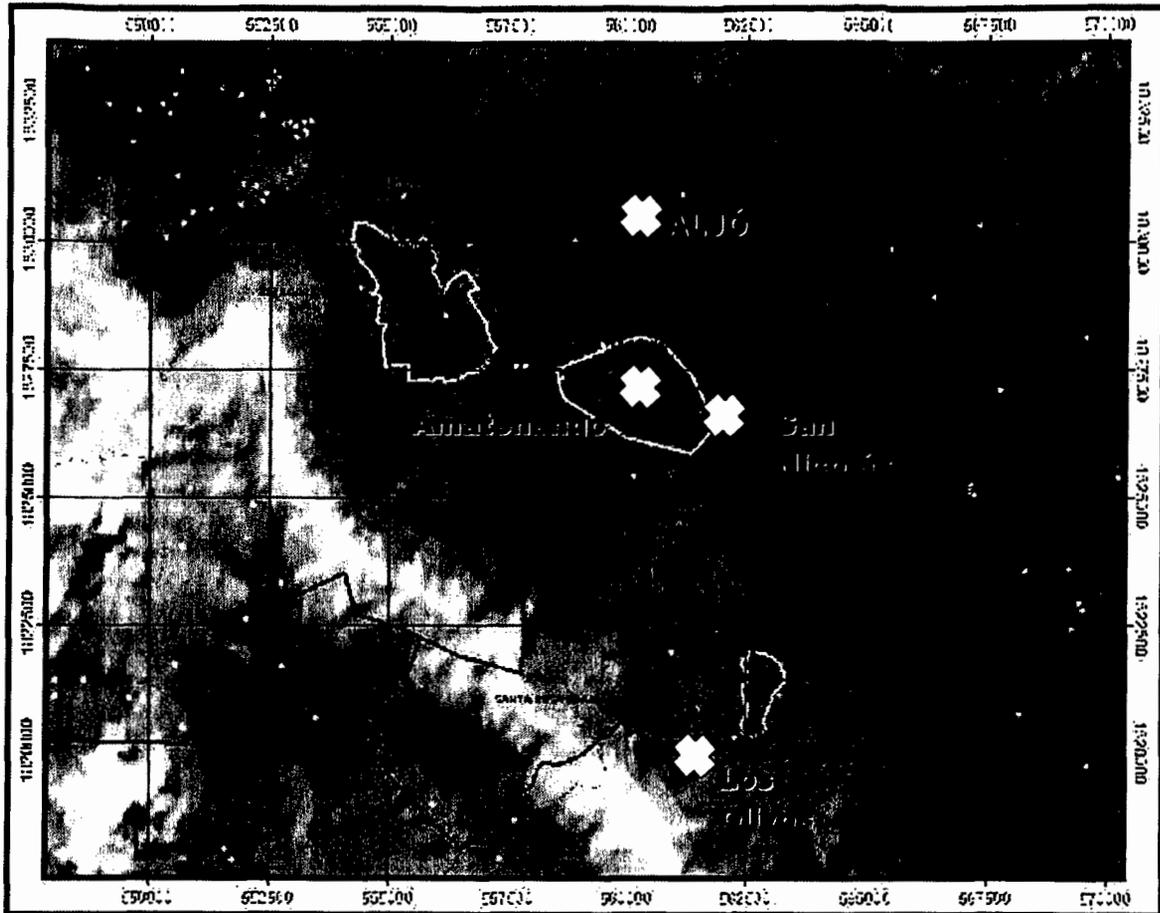
- González-Rodríguez, A., B. Bemrey, A. Castañeda y K. Oyama. 2000. Population Genetic Structure of *Acanthoscelides obtectatus* and *A.obvelatus* (Coleoptera: Bruchidae) from Wild and Cultivated *Phaseolus sp.* (Leguminosae). *Ecology and Population Biology* 93:1100-1107.
- Hartl, D.L. y A.G. Clark. 1997. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
- Hebert, P.D.N. y M.J. Beaton. 1993. *Methodologies for Allozyme Analysis Using Cellulose Acetate Electrophoresis*. Technical Manual of Cellulose Acetate Electrophoresis. Helena Laboratories, Texas, U.S.A.
- Hedrick, W. P. 2000. *Genetics of populations*, Second Edition. Jones and Bartlett Publishers. Massachusetts, U.S.A.
- Kim, K.C. 1993. Insect Pest and Evolution. Pp 3-26. En: Kim, K.C. y B.A. McPherson (Comp.). *Evolution of Insect Pest*. Jon Wiley and Sons Inc. New York, U.S.A.
- King, A.B.S. 1994. Biología e Identificación de (*Phyllophaga*) de Importancia Económica en América Central. Pp 33-43. En: Shannon, J.P., y M. Carballo (Comp.). Seminario-Taller Centroamericano Sobre la Biología y Control de *Phyllophaga sp.*
- Martins, E. y E.P.B. Contel. 2001. African Dung Beetle *Onthophagus gazella* Fabricius (Coleoptera: Scarabaeidae) Esterase Isozymes. *Brazilian Journal of Biology* 61:645-650.
- McEvoy, B.P. 1996. Host specificity and Biological Pest Control. *BioScience* 46:401-405.
- Méndez-Pérez, C.G. 2003. Efecto del Complejo "Gallina Ciega" (Coleoptera: Melolonthidae) en Maíz en Aguacatenango, Chiapas. Tesis de Licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Escuela de Biología. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
- Miller, M.P. 1997. *Tools for Populations Genetic Analices (TFGA)*. Ver. 1.3. A Window Program for the Analysis of Allozymes and Molecular Population Genetic Data. Northern Arizona University, U.S.A.
- Morón, M.A. 1986. El género *Phyllophaga* en México. Morfología, Distribución y Sistemática Supraespecífica. (Insecta: Coleoptera). Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz. México, D. F.

- Morón, M.A. 1996. Melolonthidae (Coleoptera). Pp 287-306. En: Llorente, J.B., A. García-Aldrete y E. González (Comp.). Biodiversidad, Taxonomía y Biogeografía de Artrópodos de México: Hacia una Síntesis de su Conocimiento. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Morón, M.A. 1997. Melolonthinae. Diagnósis, generalidades, hábitos y distribución. Pp 205-264. En: Morón, M.A., B.C. Ratcliffe y C. Deloya. Atlas de Escarabajos de México. Coleoptera: Lamellicornia. Vol. I. Familia Melolonthidae. CONABIO, Sociedad Mexicana de Entomología, México.
- Morón, M.A. 2001. Larvas de Escarabajos del Suelo en México (Coleoptera:Melolonthidae). Acta Zoológica Mexicana. 1:111-130.
- Morón, M.A. 2003. Diversidad Distribución e Importancia de las Especies de *Phyllophaga* Harris en México (Coleoptera: Melolonthidae). Pp 1-27. En: Aragón, G.A., M.A. Morón y A. Marín J. (Eds.). Estudios Sobre Coleópteros del Suelo en América. Publicación Especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- Mosso, J.M. y J.A.T. Gutiérrez. 2000. Aislamiento, Identificación y Pruebas de Parasitismo de Hongos Entomopatógenos en Insectos Plaga del Valle de Tuxtla, Guerrero, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Guerrero. México.
- Nájera-Rincón, M.B. 1993. Coleópteros Rizófagos Asociados al Maíz de Temporal en el Centro del Estado de Jalisco, México. Pp 217-233. En: Morón, M.A. (Comp.). Diversidad y Manejo de Plagas Subterráneas. Sociedad Mexicana Entomológica. Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz. México.
- Pérez-Moreno, I. 2000. Fundamentos Teóricos del Manejo Integrado de Plagas. ARACNET 27: 127-133.
- Pite, J. A. y W. H. Cheliak. 1984. Effect of Extraction Buffers on Characterization of Isoenzymes from Vegetative Tissues of Five Conifer Species: a User's Manual. Canadian Forestry Service Information Report PI-X-34. Petawawa National Forestry Institute, Petawawa, Ontario, Canada.
- Ramírez-Salinas, C y A.E. Castro-Ramírez.. 1998. Estudio Morfológico del Estado Larval de Seis Especies de *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae) en la Región Altos de Chiapas, México. Pp 37-50. En: Morón, M.A. y A. Aragón (Eds.). Avances en el Estudio de la Diversidad, Importancia y Manejo de los Coleópteros Edaficotas

- Americanos. Publicación Especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y la Sociedad Mexicana de Entomología, A.C. Puebla, México.
- Ramírez-Salinas, C y A.E. Castro-Ramírez. 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* 79:17-14.
- Ramírez-Salinas, C., I.A. Hernández y A.E. Castro-Ramírez. 1999. Biología y Comportamiento de *Phyllophaga (Phytalus) obsoleta*, en la Región Altos de Chiapas, México, 1993-1995. Pp 177-182. En: Bautista-Martínez, N., O. Morales-Galván y C. Ruiz-Montiel (Eds.). *Memorias del XXXIV Congreso Nacional de Entomología*, Aguascalientes, México.
- Ramos-Muñoz, D.E. 2002. El Peso de la Tradición: Las Alfareras de Amatenango del Valle, Chiapas, Ante Una Evaluación de Calidad. *L'Ordinaire Latino Americain* 189:58-74.
- Rendón-von Osten, J. Los Insecticidas Organoclorados. Pp 99-120. En: Albert, L.A. (Coord.). 1990. *Los Plaguicidas el Ambiente y la Salud*. Centro de Ecodesarrollo, México.
- Richardson, B.J., P.R. Baverstock y M. Adams. 1986. *Allozyme Electrophoresis, a Handbook For Animal Systematic and Population Studies*. Academic Press, Australia.
- Roderik, G.K. 1996. Geographic Structure of Insect Population: Gene, Flow, Phylogeography, and Their Uses. *Annual Review Entomology* 41:325-352.
- SAS Institute, 1988. *SAS user'guide*: SAS Institute Cary, North, Carolina.
- Shannon, P.J., S.M. Smith y E. Hidalgo. 1993. Evaluación en el Laboratorio de Aislamiento Costarricenses y Exóticos de *Metharhizium* y *Beauveria* Contra Larvas de *Phyllophaga* (Coleoptera: Scarabaeidae). Pp. 203-216. En: Morón M.A (Comp.). *Diversidad y Manejo de Plagas Subterráneas*. Sociedad Mexicana Entomológica. Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz, México.
- Vásquez, L. 2003. Evaluación de la Fecundidad de Hembras de *Phyllophaga obsoleta* Capturadas con Trampas de Luz en la Esperanza, Honduras. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 69:62-65.
- Wilson, S.D. y D. Tilman. 1991. Components of Plants Competition Along Experimental Gradient of Nitrogen Availability. *Ecology* 72:1050-1065.

- Yeh, F. Ch.-H. y D. O'Malley. 1980. Enzyme Variations in Natural Populations of Douglas-fir. *Pseudotsuga menziessii* (Mirb.). Franco. from British Columbia. Genetic Variation Patterns in Coastal Populations. *Silvae Genética* 29:83-92.
- Zhuo, X., M.E. Scharf, S. Parimi, L.J.Meinke, R.J. Wright, L.D. Chnadler y B.D. Siegfried.2002. Diagnostic Assays Based on Esterase-Mediated Resistance Mechanisms in Western Corn Rootworms (Coleoptera:Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology* 95:1261-1266.

# APÉNDICE 1



- Simbología**
- Cinturón de protección de la zona
  - Carretera asfaltada toda el año de construcción
  - Carretera transitable todo el tiempo
  - Bosque
  - Cafetal
  - Calle
  - Ferretería de servicio público
  - Pantanos
  - Calle Murto pa co
  - Municipio

**LEYENDA**

500-600	1400-1450
600-700	1450-1500
700-800	1500-1550
800-900	1550-1600
900-1000	1600-1650
1000-1100	1650-1700
1100-1200	1700-1750
1200-1300	1750-1800
1300-1400	1800-1850
1400-1500	1850-1900
1500-1600	1900-1950
1600-1700	1950-2000
1700-1800	2000-2050
1800-1900	2050-2100
1900-2000	2100-2150
2000-2100	2150-2200
2100-2200	2200-2250
2200-2300	2250-2300
2300-2400	2300-2350
2400-2500	2350-2400
2500-2600	2400-2450
2600-2700	2450-2500
2700-2800	2500-2550
2800-2900	2550-2600
2900-3000	2600-2650
3000-3100	2650-2700
3100-3200	2700-2750
3200-3300	2750-2800
3300-3400	2800-2850
3400-3500	2850-2900
3500-3600	2900-2950
3600-3700	2950-3000
3700-3800	3000-3050
3800-3900	3050-3100
3900-4000	3100-3150
4000-4100	3150-3200
4100-4200	3200-3250
4200-4300	3250-3300
4300-4400	3300-3350
4400-4500	3350-3400
4500-4600	3400-3450
4600-4700	3450-3500
4700-4800	3500-3550
4800-4900	3550-3600
4900-5000	3600-3650
5000-5100	3650-3700
5100-5200	3700-3750
5200-5300	3750-3800
5300-5400	3800-3850
5400-5500	3850-3900
5500-5600	3900-3950
5600-5700	3950-4000
5700-5800	4000-4050
5800-5900	4050-4100
5900-6000	4100-4150
6000-6100	4150-4200
6100-6200	4200-4250
6200-6300	4250-4300
6300-6400	4300-4350
6400-6500	4350-4400
6500-6600	4400-4450
6600-6700	4450-4500
6700-6800	4500-4550
6800-6900	4550-4600
6900-7000	4600-4650
7000-7100	4650-4700
7100-7200	4700-4750
7200-7300	4750-4800
7300-7400	4800-4850
7400-7500	4850-4900
7500-7600	4900-4950
7600-7700	4950-5000
7700-7800	5000-5050
7800-7900	5050-5100
7900-8000	5100-5150
8000-8100	5150-5200
8100-8200	5200-5250
8200-8300	5250-5300
8300-8400	5300-5350
8400-8500	5350-5400
8500-8600	5400-5450
8600-8700	5450-5500
8700-8800	5500-5550
8800-8900	5550-5600
8900-9000	5600-5650
9000-9100	5650-5700
9100-9200	5700-5750
9200-9300	5750-5800
9300-9400	5800-5850
9400-9500	5850-5900
9500-9600	5900-5950
9600-9700	5950-6000
9700-9800	6000-6050
9800-9900	6050-6100
9900-10000	6100-6150
No Data	No Data

## APÉNDICE 2

(\*1 Obtenidos de Richardson *et al.* 1986. \* 2 Obtenidos de Hebert y Beaton 1993.)

### Recetas de Tinción

#### EST<sup>\*1</sup>

- 2 ml de Tris - Maleato pH 5.3
- 400  $\mu$ l de Solución  $\alpha$ -Naphthyl Acetate
- 10 Gotas de Solución Saturada de Fast Blue BB Salta
- Aforar con  $\cong$  10 ml de Agar

#### IDH<sup>\*1</sup>

- 1 ml de Tris- HCl pH 7.0
- 1.5 ml de NADP
- 1 ml de DL- Isocitric Acid
- 8 Gotas de MgCl<sub>2</sub>
- 5 Gotas de MTT
- 5 Gotas de PMS
- Aforar con  $\cong$  10 ml de Agar

#### GOT<sup>\*1</sup>

- 3 ml de Solución # 1
- 10 Gotas de Solución Saturada de Fast Blue BB Salta
- Aforar con  $\cong$  10 ml de Agar

#### EM<sup>\*1</sup>

- 0.6 ml de Tris - HCl pH 8.0
- 1.5 ml NADP
- 1 ml de Solucion de Malic Sustrate
- 5 Gotas de MgCl<sub>2</sub>
- 5 Gotas de MTT
- 5 Gotas de PMS
- Aforar con  $\cong$  10 ml de Agar

### Preparación amortiguadores del Sistema

#### 0.02 M Phosphato pH 7<sup>\*2</sup>

- 4.14 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 12 H<sub>2</sub>O
- 1.16 gr NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> • H<sub>2</sub>O
- 1 Litro de Agua Destilada

#### 0.05 M Tris- Maleato 7.8<sup>\*2</sup>

- 6.06 gr Trisma Base
- 2.32 gr de Maleic Acid
- 1 Litro de Agua Destila

### Amortiguadores de extracción para ABIES

( $\frac{3}{4}$  de amortiguador YO y  $\frac{1}{4}$  de amortiguador VEG II)

#### Amortiguador YO (Yeh & O'Malley 1980)

- 10 ml de solución Tris-ácido cítrico
- 1.57 g Trizma base, 0.83 g de ácido cítrico
- Aforar a 100 ml con H<sub>2</sub>O destilada
- Ajustar el pH a 7.0
- 0.05 g de NADP

- 0.05 g de NAD
- 0.018 g de ácido ascórbico
- 0.034 g de EDTA
- 0.10 g de albúmina sérica
- 0.33 ml de 2-Mercaptoetanol
- Aforar a 100 ml con H<sub>2</sub>O destilada

Amortiguador VEG II (Pitel & Cheliak 1984)

- 0.31 g de ácido bórico
- 2 ml de tergitol 15-S-9
- 2 g de PEG 8000
- 7 g de PVP 40
- 1 g de PVP 360
- 0.88 g de ácido ascórbico
- 0.02 g de NAD

- 0.1 g de albúmina sérica bovina
- 0.005 g de pyridoxal 5 fosfato
- 0.27 g de sucrosa
- 0.19 g de Cisteína-HCl
- 0.66 ml de 2-Mercaptoetanol
- Aforar a 100 ml con H<sub>2</sub>O destilada
- Ajustar el pH a 7.1 con NaOH

**Preparacion Reactivos**

Fast Blue BB Saturado \*<sup>2</sup>

- Se añade el reactivo en una cantidad dada de Agua Destilada hasta que este no se diluya

0.1 M Sodium Phosphate pH 7.0 \*<sup>2</sup>

- 1.42 gr de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 1.38 gr de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> • H<sub>2</sub>O
- 50 ml de Agua Destilada

MIT \*<sup>2</sup>

- 10 mg/ ml

0.09 M Tris HCl pH 7.0 \*<sup>2</sup>

- 1.1 gr Trisma Base
- 6.2 ml de HCl
- 100 ml de Agua Destilada

MgCL<sub>2</sub> \*<sup>2</sup>

- 29 mg/ ml

NADP \*<sup>2</sup>

- 2 mg / ml

0.09 M Tris HCl pH 8.0 \*<sup>2</sup>

- 1.1 gr Trisma Base
- 8.75 ml de HCl
- 100 ml de Agua Destilada

PMS \*<sup>2</sup>

- 2 mg / ml

0.1M Tris Malete pH 5.3 \*<sup>2</sup>

- 1.2 gr Trisma Base
- 2.4 gr de Maleic Acid
- 100 ml de Agua Destilada

DL- Isocitric Acid \*<sup>2</sup>

- 100 mg/ ml

Alfa- Naphthyl Acetate \*<sup>2</sup>

- 10 ml Agua Destilada
- 10 ml Acetona
- 0.2 gr de Alfa Naphthyl Acetate

Solución # 1 p H 7.4 (GOT) \*<sup>2</sup>

- 100 ml de 0.1M Sodium Phosphate Ph 7.0
- 10 mg Pyridoxal- 5- Phosphate
- 460 mg L- Aspartic Acid
- 260 mg de Alfa - Ketoglutamic A

Malic Substrate pH 8.0 \*<sup>1</sup>

- 50 mg/ ml de L-malic Acid