



Artículo / Article

Descortezadores y sus enemigos naturales en *Abies religiosa* (Kunth) Schltdl. et Cham.

Bark beetles and their natural enemies in *Abies religiosa* (Kunth) Schltdl. et Cham.

Alicia Fonseca González¹, Armando Burgos Solorio¹, Juana Fonseca González^{2,4}, Héctor M. De los Santos Posadas³ y Juana Juárez Muñoz²

Resumen

El Parque Nacional "Lagunas de Zempoala" es un área natural protegida que se ubica en los límites de los estados Morelos y el Estado de México, en donde se eligió un oyamel sobramaduro de 20 m de alto para estudiar la distribución de insectos descortezadores, así como la presencia de sus enemigos naturales, a distintas alturas del tronco. El individuo presentó color con gradación en el follaje de amarillento a rojizo, característico del ataque por estos organismos. Se recolectaron los escarabajos presentes en el floema y el cambium provenientes de secciones de corteza extraídas previamente y cuyas dimensiones fueron de 10 x 10 cm. Las especies identificadas correspondieron a *Pseudohylesinus variegatus* y *Pityophthorus elatinus*; el primero infestó el árbol de la base a los 7 m, y el segundo a partir de los 8 m y hasta los 20 m. La densidad promedio fue de 10.57 ind m⁻², antes de los 15.16 m del fuste, al superar este punto aumentó la acumulación de escolítidos para llegar a 222 ind m⁻², en promedio. Los enemigos naturales identificados incluyeron a los hongos entomopatógenos: *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*; la bacteria, *Bacillus thuringiensis*; y parasitoides pertenecientes a la familia Pteromalidae.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis* Berliner, distribución vertical, hongos entomopatógenos, parasitoides, *Pityophthorus elatinus* Wood, *Pseudohylesinus variegatus* Blandford.

Abstract

The Zempoala Lagoons National Park is a natural protected area located in the limits of the states of Morelos and Mexico, where a 20 m tall overripe sacred fir was selected to study the distribution of bark beetles, as well as the presence of their natural enemies at various stem heights. The foliage of the individual has a color ranging from yellow to red, which is characteristic of attack by these organisms. Beetles were collected from the phloem and the cambium of previously extracted 10 x 10 cm bark sections. The identified species were *Pseudohylesinus variegatus* and *Pityophthorus elatinus*; the former infested the tree from the base to a height of 7 m, and the latter, from 8 m up to 20 m. The average density was 10.57 ind m⁻², below the stem height of 15.16 m; above this point, the accumulation of Scolytidae increased to an average of 222 ind m⁻². The identified natural enemies included the entomopathogenous fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*; the bacteria *Bacillus thuringiensis*, and parasitoids belonging to the Pteromalidae family.

Key words: *Bacillus thuringiensis* Berliner, vertical distribution, entomopathogenous fungi, parasitoids, *Pityophthorus elatinus* Wood, *Pseudohylesinus variegatus* Blandford.

Fecha de recepción/date of receipt: 15 de mayo de 2013; Fecha de aceptación/date of acceptance: 27 de mayo de 2013.

¹ Centro de Investigaciones Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Correo-e: fonsecaj@uaeh.edu.mx

² Área Académica de Ciencias Agrícolas y Forestales, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

³ Programa Forestal, Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo.

Introducción

El Parque Nacional Lagunas de Zempoala es un área natural protegida que se ubica en el estado de Morelos y Estado de México; constituye una zona importante para la conservación de los bosques de *Abies religiosa* (Kunth) Schltdl. *et* Cham.; es fuente de servicios ambientales, especialmente, de la recarga de los mantos acuíferos; sin embargo, presenta problemas por la presencia de incendios, la ganadería extensiva, y la extracción de recursos. Lo anterior ocasiona el deterioro de su condición fitosanitaria y se refleja en sitios deforestados y árboles enfermos (Conanp, 2008).

Los coleópteros que se alimentan del floema y el cambium de los individuos arbóreos son el grupo más relevante de las plagas que atacan a las coníferas; la subfamilia Scolytinae (Coleoptera: Curculionidae) (Cibrián *et al.*, 1995), de ellos, los que comúnmente parasitan *A. religiosa* son *Scolytus mundus* Wood, *Pseudohylesinus variegatus* Blandford y *Pityophthorus elatinus* Wood, insectos que contribuyen a la muerte y reincorporación de estos árboles, en especial cuando están sobremaduros o afectados (Cibrián *et al.*, 1995; Wood, 1982); aunque también pueden matar ejemplares aparentemente sanos, cuando son infestados por muchos escarabajos en un periodo corto de tiempo (Birch, 1984).

El conjunto de descortezadores se distribuye a lo largo del tronco de acuerdo con su tamaño; los de tallas mayores requieren diámetros más grandes, en donde el floema es más grueso y asegura la sobrevivencia de sus crías, en cambio los de dimensiones menores colonizan la parte superior o las ramillas (Saint-Germain *et al.*, 2004). El establecimiento de estos taxa precede el de insectos asociados como parasitoides y depredadores (Santoro *et al.*, 2001) y tienen una gran importancia, ya que controlan de manera natural las poblaciones de escolítidos, sin llegar a su exterminio, pues dependen de ellos para sobrevivir, por lo que ambas se mantienen en equilibrio (Perusquia, 1982).

Los objetivos del presente estudio fueron reconocer las especies de escolítidos asociadas a individuos de *A. religiosa* muertos, determinar su distribución a diferentes alturas del fuste e identificar sus enemigos naturales en el Parque Nacional Lagunas de Zempoala.

Materiales y Métodos

El Parque Nacional "Lagunas de Zempoala" se localiza en los municipios Huitzilac (Morelos) y Ocuilán (Estado de México). El Área Natural comprende una superficie de 4 790 ha y se ubica en el Eje Neovolcánico Transversal, entre las coordenadas 19°03'12.80" N y 99°18'46.36" O; su topografía es muy accidentada y la altitud va de 2 400 a 3 600 m (Conanp, 2008). En esta zona se seleccionó un ejemplar de oyamel (*A. religiosa*) de 20 m de altura, con follaje de coloración

Introduction

The *Zempoala* Lagoons National Park is a natural protected area located in the limits of the states of *Morelos* and *Mexico*; it is an important area for the preservation of *Abies religiosa* (Kunth) Schltdl. *et* Cham. forests; it is a source of environmental services, especially aquifer recharge. However, it raises problems due to forest fires, extensive livestock grazing, and the extraction of resources, all of which cause the deterioration of its phytosanitary conditions and is reflected in the presence of deforested sites and sick trees (Conanp, 2008).

Coleopterans that feed on the phloem and the cambium of trees are the most relevant group of pests which attack conifers; the Scolytidae subfamily (Coleoptera: Curculionidae) (Cibrián *et al.*, 1995), among which the insects *Scolytus mundus* Wood, *Pseudohylesinus variegatus* Blandford y *Pityophthorus elatinus* Wood are common parasites of *A. religiosa* and contribute to the death and reincorporation of this species, particularly when they are overripe or affected (Cibrián *et al.*, 1995; Wood, 1982); However, they can also kill seemingly healthy specimens when these are infested by a large number of beetles in a short period (Birch, 1984).

The bark beetles are distributed along the stem according to their size; larger beetles require larger diameters, where the phloem is thicker, ensuring the survival of their brood offspring, whereas smaller beetles colonize the upper part or the twigs (Saint-Germain *et al.*, 2004). The establishment of these taxa precedes that of associated insects, such as parasitoids and predators (Santoro *et al.*, 2001) and are very important because they control the Scolytidae populations naturally without exterminating them, as they depend upon them for their survival; thus, they maintain a balance (Perusquia, 1982).

The objectives of this study were to identify the species of Scolytidae associated to dead *A. religiosa* individuals, to determine their distribution at different stem heights, and to identify their natural enemies in the *Zempoala* Lagoons National Park.

Materials and Methods

The *Zempoala* Lagoons National Park is located in the municipalities of *Huitzilac* (*Morelos*) and *Ocuilán* (State of *Mexico*). The Natural Area comprises a surface of 4 790 ha and is situated in the Neovolcanic Transversal Axis, between the coordinates 19°03'12.80" N and 99°18'46.36" W; its topography is very rugged, and its altitude ranges between 2 400 and 3 600 m (Conanp, 2008). In this area, a specimen of sacred fir (*A. religiosa*) with a height of 20 m, and green-yellow to reddish brown foliage -a characteristic evidence of attack by bark beetles- was selected. The tree was felled and transported to the Vegetal Parasitology Laboratory at the Center of Biological

verde-amarillento a café rojizo, evidencia característica del ataque de descortezadores. El árbol se derribó y se transportó al laboratorio de Parasitología Vegetal del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), donde se seccionó el tronco a intervalos de 1 m de longitud y se tomaron dos muestras de corteza de 10 x 10 cm (100 cm²); para realizar el análisis fue necesario separarla del cambium y dejar al descubierto los insectos y sus galerías. Los escolítidos se separaron por estadio e identificaron a nivel de especie mediante las claves de Wood (1982).

Se calculó la superficie de la corteza que existía en cada sección del tronco, con la siguiente fórmula:

$$S_i = D_i \times l_i$$

Donde:

- S_i = Superficie de corteza de la sección i del tronco (m²)
- D_i = Diámetro promedio de la sección i del tronco en (m)
- l_i = Longitud de la sección i del tronco (m)

Para obtener la tasa de acumulación de insectos a lo largo del fuste se empleó un análisis de regresión segmentada de la forma:

$$T_i = t_{i-1} + \frac{n_i}{S_i}$$

Donde:

- T_i = Tasa de acumulación de la sección i del tronco
- n_i = Número de insectos en la sección i del tronco
- S_i = Superficie de corteza de la sección i del tronco (m²)

Con el fin de conocer si hay diferencias entre las tasas de acumulación para cada especie de descortezador, se utilizó una ecuación que representa al modelo segmentado:

$$T_i = B_0 + B_1 \times A_i + B_2 \times (A_i - J) \times l_j$$

Donde:

- B_i = Coeficientes de regresión
- A_i = Altura de la i -ésima sección del árbol a la que se tomó la muestra
- J = Altura de la i -ésima sección del árbol en la que se observó un cambio de pendiente en la curva de acumulación de los insectos
- l_j = Variable indicadora que toma el valor 1 si $A_i \geq J$ estimado, o cero en cualquier otro caso

Para separar a los entomopatógenos y los descortezadores se aislaron los individuos que presentaran hifas emergiendo del cuerpo, o polvo blanquecino y se procesaron de acuerdo con

Research of the *Universidad Autónoma del Estado de Morelos* (UAEM), where the stem was cut at intervals of 1 m in length and two 10 x 10 cm samples of the bark (100 cm²) were collected; in order to carry out the analysis, the bark had to be separated from the cambium, leaving the insects and their galleries exposed. The Scolytidae were separated by stages and identified by species using Wood's keys (1982).

The surface of the bark in each section of the stem was estimated using the following formula:

$$S_i = D_i \times l_i$$

Where:

- S_i = Bark surface of the stem section i (m²)
- D_i = Average diameter of stem section i in (m)
- l_i = Length of the stem section i (m)

In order to estimate the accumulation rate of the insects along the stem, a segmented regression analysis of the following formula was used:

$$T_i = t_{i-1} + \frac{n_i}{S_i}$$

Where:

- T_i = Accumulation rate of stem section i
- n_i = Number of insects in stem section i
- S_i = Bark surface of stem section i (m²)

The following equation, which represents the segmented model, was used to detect differences in the accumulation rates for each bark beetle species:

$$T_i = B_0 + B_1 \times A_i + B_2 \times (A_i - J) \times l_j$$

Where:

- B_i = Regression coefficients
- A_i = Height of stem section i from which the sample was taken
- J = Height of stem section i of the tree at which the accumulation curve of the insects showed a change of slope
- l_j = Marker variable which takes on the value of 1 if the estimated value of $A_i \geq J$, or zero in any other case.

In order to separate the entomopathogenic fungi from the bark beetles, individuals with hyphae emerging from their bodies or with a whitish dust on these were isolated and processed according to the methodology described by Goettel and Inglis (1997): first, the surface of the specimens was disinfected using a disinfection train with ethylic alcohol at 70 %, followed by three

la metodología descrita por Goettel e Inglis (1997): primero se desinfectó la superficie de los especímenes mediante un tren de desinfección de alcohol étílico al 70 %, seguido por tres lavados con agua destilada estéril, y se retiró el exceso de humedad con papel secante inocuo.

Los insectos se disecaron con bisturí y sembraron directamente sobre medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA); de ellos, se eligieron los que crecieron en la caja y presentaron características de hongo entomopatógeno (coloración y forma de crecimiento); se microcultivaron con el fin de observar sus esporas e identificar la especie.

Los que mostraron síntomas de infección bacteriana; es decir, apariencia constreñida y negruzca se separaron para su aislamiento; el criterio de evaluación para la existencia de posibles bacterias entomopatógenas fue su aspecto en el medio de cultivo LB; se eligieron solamente las colonias de color blanco nacarado y textura cremosa, para la obtención de colonias únicas que se observaron al microscopio estereoscópico SMZ 1500.

Se constató la existencia del cristal parasporal característico de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) (López, 1999). Se determinaron los perfiles proteicos por electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE), que permitió conocer los tamaños de las proteínas; la cuantificación de la proteína total se obtuvo por el método de Bradford (1976); en un tubo eppendorf se añadió la proteína para lograr una concentración de 10 µg, 7 µL de la mezcla lítica 4X y se aforó a un volumen final de 30 µL con agua destilada estéril, se calentó en baño María durante cuatro minutos a punto de ebullición, se centrifugó a 14 000 rpm por 15 minutos en una microcentrífuga *Spectrafuge*. El sobrenadante se separó, cuidadosamente, para no mezclarlo con la pastilla, y se colocó en un pozo del gel de poliacrilamida al 10 % que se corrió a un potencial eléctrico de 20 mA.

Resultados y Discusión

Se identificaron dos especies de descortezadores: *Pseudohylesinus variegatus* y *Pityophthorus elatinus*, de la primera se obtuvo un total de 582 organismos en los estadios de adulto y larva y se recolectaron 262 huevos; de la segunda se contabilizaron 1 467 correspondientes a larvas, pupas y adultos. Ambos taxa se consideran, generalmente, como insectos secundarios; aunque *P. variegatus* puede contribuir a la muerte de árboles, si actúa en conjunto con *S. mundus*, *Pityophthorus abiegus* Wood, *Pityophthorus acuminatus* Bright o *Gnathotrichus sulcatus* (LeConte, 1868) (Atkinson y Equihua, 1985). La recolecta se realizó en el mes de febrero y la existencia de huevecillos de *P. variegatus* discrepa con los resultados de Hernández y Cibrián (1981) en el Parque Nacional El Chico, ya que este autor consignó que la ovoposición sucede de junio a

washings with sterile distilled water, and the excess moisture was dried with innocuous blotter paper.

The insects were bisected with a scalpel and were directly sown in a potato dextrose agar (PDA) medium; those which grew in the dish and showed the characteristics of an entomopathogenous fungus (color and growth form) were chosen and microcultivated in order to observe their spores and identify the species.

Those with symptoms of a bacterial infection -i.e. with a dark, constricted appearance- were isolated; the evaluation criterion for the existence of potential entomopathogenous bacterias was their aspect in the LB culture medium. Only the colonies with a pearl white color and a creamy texture were chosen to obtain single colonies, which were observed under the stereo microscope SMZ 1500.

The existence of the parasporal crystal that is characteristic of *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) was verified (López, 1999). The protein profiles by denaturalizing polyacrylamide gel electrophoresis (SD-PAGE), which made it possible to know the size of the proteins; the quantification of the total protein was carried out using Bradford's method (1976); using an Eppendorf tube, the protein was added to achieve a concentration of 10 µg, 7 µL of the 4X lytic mixture, and diluted to the mark to a final volume of 30 µL with sterile distilled water; it was boiled in a double boiler during four minutes and centrifuged at 14 000 rpm during 15 minutes in a *Spectrafuge* microcentrifuge. The supernatant was carefully separated so as to avoid mixing it with the tablet and was placed in a well of the polyacrylamide gel at 10 %, which was run at an electric potential of 20 mA.

Results and Discussion

Two species of bark beetles were identified: *Pseudohylesinus variegatus* and *Pityophthorus elatinus*. 262 eggs and 582 specimens of the former were obtained at the adult and larval stages; of the latter, 1 467 specimens -larvae, pupas and adults- were counted. Both taxa are generally considered as secondary insects, although *P. variegatus* can contribute to tree deaths if they act in combination with *S. mundus*, *Pityophthorus abiegus* Wood, *Pityophthorus acuminatus* Bright or *Gnathotrichus sulcatus* (LeConte, 1868) (Atkinson and Equihua, 1985). The collection took place in February. The presence of *P. variegatus* eggs disagrees with the findings of Hernández y Cibrián (1981) in the *El Chico* National Park, according to whom ovoposition occurs from June to November; these differences may be attributable to the differences in the climate conditions that prevail in the two places.

The distribution of each taxon had very clear-cut boundaries: *Pseudohylesinus variegatus* infested the host from the base up to a height of 7 m, a fact that confirms the statement of Atkinson

noviembre; las diferencias, probablemente, son atribuibles a las distintas condiciones climáticas que prevalecen en los dos lugares.

La distribución de cada taxón tuvo un límite muy marcado: *Pseudohylesinus variegatus* infestó al hospedero desde la base, hasta 7 m de altura, lo que confirma lo señalado por Atkinson y Equihua (1985) quienes establecen que su localización es en la parte inferior del tronco de *A. religiosa*, tanto para individuos en pie como para derribados y tocones; por otro lado, Hernández y Cibrián (1981) lo observaron entre 7 y 25 m de altura, en diámetros de 31 a 77 cm; la zona más baja presentó colonias exclusivas de *P. variegatus*, y en la punta estuvo *S. mundus* (otro descortezador); el insecto colonizador fue *S. mundus*, y con el árbol ya debilitado se estableció *P. variegatus*, el cual se convirtió en competidor por espacio y alimento.

Pityophthorus elatinus se distribuyó de los 8 a los 20 m de altura y en troncos con diámetro de 17.5 a 40 cm; respecto a este último parámetro, Atkinson y Equihua (1985) lo registraron en algunos fustes o ramas menores o iguales a 15 cm; de acuerdo con Saint-Germain *et al.* (2004), el diámetro es uno de los factores que más influyen en la elección del huésped, por los insectos xilófagos, ya que representa la superficie sobre la cual se llevará a cabo la oviposición y esta se incrementa con el diámetro, por lo que la abundancia de neonatos es superior en árboles de mayor diámetro.

Se calculó un promedio de 10.57 ind m⁻², cantidad que se considera menor al óptimo para colonizar un individuo. Al respecto, Zhang *et al.* (1992) registran para *Ips cembrae* (Heer), en *Larix dahurica* Turcz. ex Trautv entre 87 y 139 ind m⁻². Por su parte Byers *et al.* (1984) citan que la densidad mínima requerida de *Dendroctonus brevicomis* LeConte, 1876 para matar un ejemplar de *Pinus ponderosa* Douglas ex P. Lawson & C. Lawson es de 151 ind m⁻², por lo que no se puede adjudicar la muerte del oyamel estudiado a los escarabajos, sino que se admite que arribaron, cuando ya estaba en proceso de morir.

Al aplicar el modelo matemático desarrollado y asumir que el muestreo fue completamente al azar, las proyecciones obtenidas estiman la presencia de 10 021 organismos de *Pseudohylesinus variegatus* y 27 482 de *Pityophthorus elatinus* (en todos los estadios de desarrollo) en la superficie del árbol completo.

La mortalidad larvaria en los escolítidos se atribuye a la competencia, y aumenta considerablemente al incrementarse la densidad de coleópteros (Beaver, 1977; citado por Dajoz, 2001), por lo que si varias especies comparten al huésped es fundamental definir el espacio que ocupa cada población, para evitar, en lo posible, la competencia interespecífica.

El análisis de la tasa de acumulación de ambas especies evidenció un punto de inflexión a una altura de 15.16 m; es decir,

and Equihua (1985) in the sense that it occurs in the lower part of the stem of *A. religiosa*, both for standing and felled specimens and stumps; on the other hand, Hernández y Cibrián (1981) observed it at a height of 7 to 25 m, in diameters ranging from 31 to 77 cm. Exclusive colonies of *P. variegates* occurred in the lowest area, and at the tip, *S. mundus* (another bark beetle) was the colonizing insect; also, *P. variegates* settled in the already weak tree and competed against *S. mundus* for space and food.

Pityophthorus elatinus were distributed at a height of 8 to 20 m and in stems with a diameter ranging between 17.5 and 0 cm; Atkinson and Equihua (1985) registered the presence of this species in certain stems or branches with a diameter of 15 cm or less; according to Saint-Germain *et al.* (2004), the diameter is one of the factors that most influence the choice of the host by xylofagous insects, as it represents the surface on which ovoposition will take place; it increases with the diameter size, and therefore the abundance of neonates is greater in trees with a larger diameter.

An average of 10.57 ind m⁻² -less than optimal for colonizing an individual- was estimated. In this respect, Zhang *et al.* (1992) registered for *Ips cembrae* (Heer), in *Larix dahurica* Turcz. ex Trautv, between 87 and 139 ind m⁻². For their part, Byers *et al.* (1984) cite that the minimum density of *Dendroctonus brevicomis* LeConte, 1876 required to kill a specimen of *Pinus ponderosa* Douglas ex P. Lawson & Lawson is 151 ind m⁻², and therefore the death of the studied sacred fir cannot be ascribed to the beetles, but these admittedly arrived when the tree already was in the process of dying.

Applying the mathematic model developed and assuming that the sampling was carried out totally at random, the projections obtained estimate the presence of 10 021 *Pseudohylesinus variegatus* organisms and 27 482 *Pityophthorus elatinus* specimens (in every stage of development) on the surface of the complete tree.

The larval mortality of Scolytidae is ascribed to competition and increases considerably with higher densities of coleopterans (Beaver, 1977; quoted by Dajoz, 2001); thus, when several species share the host, it is crucial to define the space occupied by each population in order to avoid interspecies competition as much as possible.

The analysis of the accumulation rate of both species evidenced a turning point at a height of 15.16 m, i.e. a change in the tendency, which increased from 54 ind m⁻² to 222 ind m⁻² (Figure 1). This is probably associated to the fact that the bark thickness and moisture favor the success of the offspring of *P. elatiuns*.

Based on the isolation and the microbiological characterization, *Bacillus thuringiensis* (Bt) was identified by its

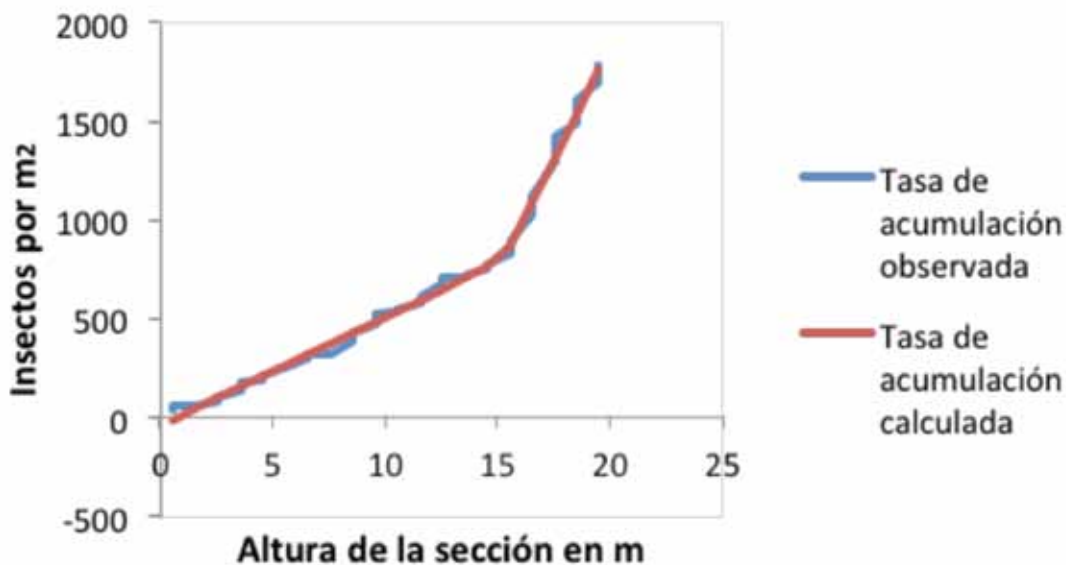


Figura 1. Tasa de acumulación de descortezadores en *Abies religiosa* (Kunth) Schltld. et Cham.
 Figure 1. Bark beetle accumulation rate in *Abies religiosa* (Kunth) Schltld. et Cham.

un cambio en la tendencia, que se incrementa de 54 ind m⁻² a 222 ind m⁻² (Figura 1). Lo anterior, posiblemente, está asociado a que la humedad y el grosor de la corteza favorecen el éxito de las crías de *P. elatinus*.

Con base en el aislamiento y la caracterización microbiológica se identificó a *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), a partir de su cristal parasporal. Se obtuvieron 1 150 insectos muertos, de ellos 1 007 por *Bt* y 143, por los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. y *Metarhizium anisoplae* (Metsch.) Sorok. Se contabilizaron 34 larvas de *Pseudohylesinus variegatus*, de las cuales 94.11 % estuvieron infectadas por *Bt*; en el caso de *Pityophthorus elatinus* se recolectaron 758 organismos sin vida con colonias de *Bt*, en 99.6 % de las muestras.

Los patrones proteicos fueron semejantes y generaron dos bandas bien definidas de 24 y de 75 KDa (Figura 2), lo cual resulta predecible, ya que los escarabajos estuvieron confinados al mismo árbol, por lo que probablemente solo actuó una cepa.

De los 143 individuos infectados por hongos entomopatógenos se obtuvieron dos aislamientos de *Metarhizium anisoplae*; la especie de inicio se determinó por su coloración verdosa y apariencia esponjosa y se corroboró mediante observación al microscopio de las esporas provenientes de los microcultivos de un adulto y un preadulto de *P. elatinus*; 98 % de las cajas sembradas no presentaron crecimiento, a pesar de la presencia de hifas.

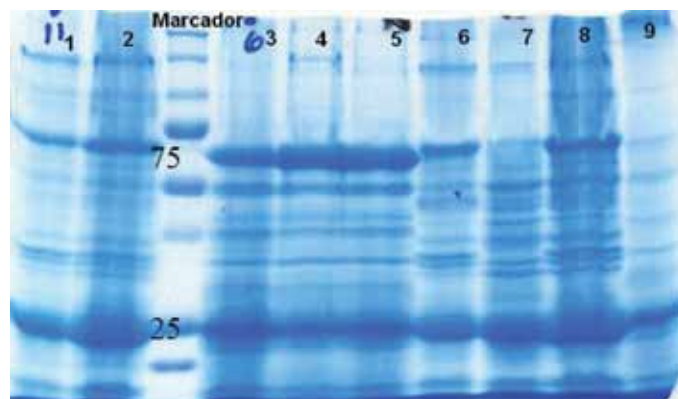
Se aislaron dos cepas de *Beauveria bassiana* y una de *M. anisoplae* derivadas de pupas de los parasitoides

parasporal crystal. 1 150 dead insects were obtained, 1 007 due to *Bt*, and 143, due to the entomopathogenous fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisoplae* (Metsch.) Sorok. 34 larvae of *Pseudohylesinus variegatus* were counted, of which 94.11 % were infected with *Bt*; on the other hand, 758 lifeless *Pityophthorus elatinus* organisms with *Bt* colonies were collected in 99.6 % of the samples.

The protein patterns were similar and generated two clear-cut bands of 24 and 75 KDa (Figure 2), which is predictable, since the beetles were confined to the same tree and therefore it is likely that only one strain was involved.

Of the 143 individuals infected with entomopathogenous fungi, two *Metarhizium anisoplae* isolations were obtained; the baseline species was determined by its greenish color and spongy appearance, and was verified through observation of spores from microcultures of a *P. elatinus* adult and a preadult under the microscope; 98 % of the sown dishes showed no growth in spite of the presence of hyphae.

Two *Beauveria bassiana* strains and one of *M. anisoplae*, derived from pupas of the parasitoids belonging to the Pteromalidae family found at a height of 12 to 18 m -parasitizing *P. elatinus* larvae and pupas- were isolated; these results agree with the findings of Perusquia (1982), who describes the insects associated to *Dendroctonus* spp. and corroborates the coexistence of a parasitoid species and the bark beetle. More than one taxon can be observed, according to the degree of coevolution with its host and to other biotic factors (Hawkins and Sheehan, 1994).



Carriles 1 a 5: Muestras de *Pseudohylesinus variegatus* Blandford; carriles 6 a 9: muestras de *Pityophthorus elatinus* Wood
 Tracks 1 to 5: Samples of *Pseudohylesinus variegatus* Blandford; tracks 6 to 9: samples of *Pityophthorus elatinus* Wood

Figura 2. Patrón proteico de *Bacillus thuringiensis* Berliner proveniente de las cepas extraídas de los descortezadores.

Figure 2. Protein pattern of *Bacillus thuringiensis* Berliner from strains extracted from bark beetles.

pertenecientes a la familia Pteromalida, existentes desde los 12 hasta los 18 m de altura, que parasitaron larvas y pupas de *P. elatinus*; resultados que coinciden con lo consignado por Perusquia (1982), quien describe los insectos asociados a *Dendroctonus* spp y corrobora la coexistencia de una especie de parasitoide con el descortezador. Es posible observar a más de un taxa, en función del grado de coevolución con su hospedero y otros factores bióticos (Hawkins y Sheehan, 1994).

A pesar del alto número de ejemplares muertos, por infección fúngica, no se obtuvieron aislamientos efectivos, posiblemente, por el desarrollo de hongos y bacterias ambientales en el árbol muerto. Es importante considerar la presencia natural de *B. bassiana* sobre los parasitoides; al respecto, se debe evaluar la virulencia de estas cepas, tanto en los parasitoides como en los escarabajos, para ello se puede tomar como referencia a De la Rosa *et al.* (1997) con su estudio sobre broca del café y su parasitoide *Cephalonomia stephanoderis* Betrem.

Conclusiones

Se observaron dos zonas bien delimitadas en la colonización de los descortezadores: *Pseudohylesinus variegatus* infesta al árbol desde la base hasta los 7 m de altura, mientras que *Pityophthorus elatinus* lo hace de los 8 a los 20 m de altura. La tendencia de acumulación de los descortezadores cambia a partir de los 15.16 m, la cual se incrementa de 54 ind m⁻² a 222 ind m⁻².

Los enemigos naturales identificados fueron *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisoplae*, *Bacillus thuringiensis* y parasitoides pertenecientes a la familia Pteromalidae. 🍄

Despite the high number of specimens that died from fungal infection, no effective isolations were obtained, perhaps due to the development of environmental fungi and bacteria in the dead tree. It is important to consider the natural presence of *B. bassiana* on the parasitoids; in this regard, the virulence of these strains must be assessed both in the parasitoids and in the beetles; for this purpose, the study by De la Rosa *et al.* (1997) on the coffee berry borer and its parasitoid *Cephalonomia stephanoderis* Betrem may be taken as reference.

Conclusions

Two clear-cut areas were observed in the colonization of the bark beetles: *Pseudohylesinus variegatus* infests the tree from the base up to a height of 7 m, while *Pityophthorus elatinus* does so at a height ranging between 8 and 20 m. The accumulation tendency of bark beetles changes above 15.16 m, increasing from 54 ind m⁻² to 222 ind m⁻².

The natural enemies identified were *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisoplae*, as well as *Bacillus thuringiensis* and parasitoids pertaining to the Pteromalidae family. 🍄



Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez por el apoyo en la identificación de los hongos entomopatógenos, al Dr. Guadalupe Peña Chora por su colaboración en el aislamiento de bacterias entomopatógenas, al Dr. Víctor López Martínez por la identificación de los parasitoides y al Biol. Ismael Anaya Calvo por la recolecta del material biológico. Este trabajo forma parte de las actividades del Cuerpo Académico de Entomología y Fitopatología de la DES de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. El estudio forma parte del proyecto EXB-48 aprobado por la SEP-PROMEP número de convenio 103.5/03/2531.

Referencias

- Atkinson, H. y A. Equihua. 1985. Lista comentada de los Coleópteros Scolytidae y Platypodidae del Valle de México. *Folia Entomológica Mexicana* 65: 63-108.
- Birch, M. 1984. Aggregation in Bark Beetles. In: Bell W., J. and R. T. Cardé (eds.). *Chemical Ecology of Insects*. Chapman and Hall. London, UK. pp. 331-335.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2): 248-254.
- Byers, J., A. Wood, J. Craig and I. Hendry. 1984. Attractive and inhibitory pheromones produced in the bark beetle, *Dendroctonus brevicomis*, during host colonization: Regulation of inter and intraspecific competition. *Journal of Chemical Ecology* 10: 861-877.
- Cibrián T., D., T. Méndez T., R. Campos B., H. O. Yates III y J. Flores L. 1995. *Insectos Forestales de México/Forest Insects of México*. Universidad Autónoma Chapingo. SARH Subsecretaría Forestal y de Fauna Silvestre de México. USDA Forest Service, Natural Resources Canada. Comisión Forestal de América del Norte FAO. México, D.F., México. 453 p.
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (Conanp). 2008. Anteproyecto Programa de Conservación y Manejo. Parque Nacional Lagunas de Zempoala. Corredor Biológico Chichinautzin, Dirección Regional Centro y Eje Neovolcánico. México, D.F., México. 161 p.
- Dajoz, R. 2001. *Entomología Forestal: Los Insectos y El Bosque. Papel y Diversidad de los Insectos en el Medio Forestal*. Mundi/Prensa. Madrid, España. 548 p.
- De la Rosa, W., J. Godínez, R. Alatorre y J. Trujillo. 1997. Susceptibilidad del parasitoide *Cephalonomia stephanoderis* a diferentes cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Southwestern Entomologist* 22 (2): 233-242.

Acknowledgments

The authors wish to express their gratitude to Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez for his support in the identification of entomopathogenous fungi; to Dr. Guadalupe Peña Chora for his collaboration in the isolation of entomopathogenous bacteria; to Dr. Víctor López Martínez for the identification of the parasitoids, and to biologist Ismael Anaya Calvo for the collection of the biological material. This work is part of the activities of the Academic Body of Entomology and Phytopathology of the DES of Natural Sciences of the *Universidad Autónoma de Morelos*. The study is part of the EXB-48 project approved by SEPPROMEP, Agreement No. 103.5/03/2531.

End of the English version

- Goettel, M. and G. Inglis. 1997. Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey, L. (ed.) *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press. California, CA, USA. pp. 213-249.
- Hawkins, B. and W. Sheehan. 1994. *Parasitoid Community Ecology*. Oxford University, Oxford, UK. pp. 1-15.
- Hernández V., E. y D. Cibrián T. 1981. Observaciones sobre la biología de *Scolytus mundus* Wood, un descortezador de *Abies religiosa* (H. B. K.) Schl. et Cham. en el Parque Nacional "El Chico", Hgo. Chapingo (31-32): 14-20.
- López M., J. E. 1999. Bacterias entomopatógenas. In: González H., H., J. L. Leyva V. y L. A. Rodríguez del B. (eds.). *Memorias del X Curso Nacional de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. 28-29 de octubre de 1999. Montecillo, Edo. de Méx., México*. pp. 111-126.
- Perusquia O., J. 1982. Insectos asociados a los descortezadores *Dendroctonus* spp. de los pinos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. México, D.F., México. Boletín técnico Núm. 83. pp. 5-7.
- Saint-Germain, M., P. Drapeau and C. Hebert. 2004. Xilophagous insect species composition and patterns of substratum use on fire-killed black spruce in central Quebec. *Canadian Journal Forest Research* 34(3): 677-685.
- Santoro, A., J. Lombardero, P. Ayres and J. Ruel. 2001. Interactions between fire and bark beetles in an old growth pine forest. *Forest Ecology Management* 144(1-3): 245-254.
- Wood, S. L. 1982. *The Bark and Ambrosia Beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae)*, a taxonomic monograph. *Great Basin Naturalist Memoirs* 6: 126-137.
- Zhang, H., A. Byers and F. Schlyter. 1992. Optimal attack density in the larch bark beetle, *Ips cembrae* (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Applied Ecology* 29: 672-678.

