
Facultad de Ciencias Agropecuarias
DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA

Trabajo de Diploma

EFFECTO DE CUATRO DOSIS DE *Beauveria bassiana* Bals
EN UN SUSTRATO CON DIFERENTES CONTENIDOS DE
HUMEDAD EN EL CONTROL DE *Aethina tumida* Murray.

Autor: Adrián Sánchez Peralta

Año, 2019

Facultad de Ciencias Agropecuarias

DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA

Trabajo de Diploma

EFECTO DE CUATRO DOSIS DE *Beauveria bassiana* Bals
EN UN SUSTRATO CON DIFERENTES CONTENIDOS DE
HUMEDAD EN EL CONTROL DE *Aethina tumida* Murray.

Autor: Adrián Sánchez Peralta
Tutor: MSc. Yander Fernández Cancio

Año, 2019

Resumen

En los meses de marzo y abril del 2019 se realizó un experimento en el Laboratorio de Agropecuaria III de la Universidad de Sancti Spíritus, con el objetivo de determinar el efecto de cuatro dosis de *B. bassiana* en un sustrato con diferentes contenidos de humedad en el control de *A. tumida*. Se empleó la cepa LBb 111 con una concentración de $2,34 \times 10^9$ UFC, refrescada sobre insectos de *Cylas formicarius* L. y multiplicadas sobre cabecilla de arroz. Las larvas de *A. tumida* fueron colectadas en la Empresa Agropecuaria Militar de Sancti Spíritus en apiarios infectados, así como el suelo utilizado para elaborar el sustrato fue Pardo sialítico sin carbonato. Se evaluó cada 24 horas y determinó el porcentaje de mortalidad de las larvas e infección de pupas, así como la cantidad de esporas germinadas por insecto. Como resultado relevante se obtuvo que en la infección de las pupas el contenido de 40 % Hbss alcanzó el mayor porcentaje con un valor superior al 50 % en 96 horas. El mayor porcentaje de mortalidad de larvas se alcanzó con las dosis de 15 g y 17,5 g con 25 % y 40 % Hbss, así como el mayor número de espora en las pupas y larvas se obtuvo con la dosis de 17,5 g.

Summary

In March and April, 2019 an experiment was carried out in the Agricultural Laboratory III at the University of Sancti Spíritus, with the main objective determination of effect to the for *B. bassiana* dose in the different basis at the control of *A. tumida*. The strain LBb 111 whit $2,34 \times 10^9$ UFC concentration was used, cooled on insects of *Cylas formicarius* L. and multiplied on a rice head. The larvae of *Aethina tumida* were collected at the Sancti Spíritus Military Agricultural Enterprice in infected apiaries, as well as the soil used to elaborate the substrate was sialitic Brown without carbonate. It was evaluated every 24 hours and determined the percentage of larval mortality and infection of pupae, as well as the amount of spores germinated per insect. As a relevant result it was obtained that in the infection of the pupae the content of 40 % Hbss reached the highest percentage with a value higher than 50 % in 96 hours. The highest percentage of mortality of larvae was reached with the doses of 15 g and 17.5 g with 25 % and 40 % Hbss, as well as the highest number of spores in the pupae and larvae was obtained with the dose of 17.5 g.

Índice

Portada

Resumen

Summary

Introducción.....	1
1-Generalidades de la producción de miel en el mundo y Cuba.....	4
1.1 La abeja y la polinización	5
1.2 Principales agentes nosivos que afectan a las abejas	6
1.3 Incidencia de <i>Aethina tumida</i>	7
1.3.1 Comportamiento del insecto.....	8
1.3.2 Características generales del pequeño escarabajo de la colmena	9
1.3.3 Factores que pueden ocasionar la presencia del pequeño escarabajo de la colmena.	13
1.4 Control.....	14
1.4.1 Control químico.	14
1.5 Potencialidades del hongo entomopatógeno (<i>Beauveria bassiana</i> Bals)...	14
2. Materiales y Métodos	17
2.1 Determinación de la incidencia del porcentaje de humedad en la efectividad de <i>Beauveria bassiana</i>	17
2.2 Evaluación de la susceptibilidad de las larvas y pupas de <i>A. tumida</i>	18
3. Resultados y Discusión	20
3.1 Efecto de las dosis y el contenido de humedad en el porcentaje de infección de las pupas de <i>Aethina tumida</i>	20

3.2 Efecto de las dosis y el contenido de humedad en el porcentaje de mortalidad de las larvas de <i>Aethina tumida</i>	25
3.3 Determinación del número de esporas del hongo germinadas sobre larvas y pupas de <i>Aethina tumida</i>	30
Conclusiones.....	32
Referencia Bibliográfica	

Introducción

La apicultura es la ciencia que estudia el manejo de la abeja *mellifera* del género *Apis* y otras subespecies (Rodríguez *et al.* 2010). Es de suma importancia para los seres vivos; ya que sin la polinización por abejas no se podría llevar a cabo el proceso de reproducción de las diversas especies. Constituyen uno de los grupos más importantes, aproximadamente el 73 % de los cultivos de frutas y semillas en el mundo son polinizados por abejas (Klein *et al.* 2007)

El consumo de miel ha experimentado en los últimos años un incremento considerable, actualmente Asia encabeza la producción mundial, tanto en rendimiento por colmena como en el volumen, con un crecimiento estable en los últimos años, mientras que otras regiones como África, Latinoamérica y el Caribe mantienen un rezago en ese sentido. Por otra parte, Europa y Estados Unidos son igualmente grandes productores, exportadores e importadores, y cuentan con un elevado índice de mecanización y tecnificación en este sector (FAO, 2018).

En los últimos años la apicultura cubana produce cerca de 8000 toneladas de miel de abeja por año, a partir de la actividad de 186 000 colmenas, con un rendimiento por cápita entre 40 y 45 kg. El 90 % de esta producción se exporta a Europa y solo el 5 por ciento se destina al mercado local. La rama dispone de 20 unidades empresariales de base, existen tres plantas de beneficio situadas en occidente, centro y oriente del país, se cuentan con cerca de 2800 apicultores asociados a diferentes formas productivas, entre ellas más de 360 CCS, 45 UBPC y 19 CPA. Además, 13 provincias practican la apicultura en las Fuerzas Armadas Revolucionarias (APICUBA, 2019).

Las poblaciones de abejas y la producción de miel a nivel mundial están siendo afectadas, debido a diferentes causas, una de estas es la Aethinosis, enfermedad provocada por la presencia del pequeño escarabajo de la colmena, *Aethina tumida* Murray (Coleóptera, Nitidulidae). Es endémico de África subsahariana, donde evolucionó en colonias de abejas africanas, *Apis mellifera capensis*. Su

distribución natural se encuentra por diversos países de África, en los cuales este escarabajo no se considera una plaga de importancia económica, ya que afecta, principalmente, a las colonias que se encuentran débiles o enfermas (Hayes *et al.* 2015).

El pequeño escarabajo fue considerado como plaga de interés al introducirse en colmenas de abejas europeas en junio de 1998, en Florida, Estados Unidos, donde se ha extendido ampliamente y ha causado pérdidas económicas de aproximadamente \$ 3 millones anuales en la industria apícola (Lóriga *et al.* 2014).

Desde entonces este insecto ha sido detectado en varios países alrededor del mundo, como Australia, Canadá, México, Cuba, Brasil e Italia, entre otros. Por lo cual se considera una especie invasora que causa serios problemas en la apicultura, especialmente en explotaciones apícolas constituidas por colmenas de abejas de tipo europeo (Palmeri *et al.* 2015).

En Cuba la presencia fue reportada por los Servicios Veterinarios en el año 2012, con informes de una prevalencia de 0,42 % en colonias de *Apis mellifera* (APICUBA, 2014); sin embargo, observaciones en el municipio de San José de las Lajas evidencian un elevado porcentaje de colmenas infestadas, pero sin hallazgos de huevos o larvas, ni indicios de afectaciones a la salud de las colmenas (Borroto y Demedio, 2014).

Mientras que el daño producido a las colonias de abejas por escarabajos adultos es relativamente escaso, estos mismos pueden causar la dispersión de las colonias es decir, que las abejas adultas abandonen completamente la colmena. Si estas no lo impiden, la conducta alimentaria de las larvas causa graves daños, que a menudo va asociada a la fermentación de la miel, además de alimentarse del polen y de las ninfas de abejas, y en ocasiones desemboca en el colapso total de la estructura de la colonia (Ellis *et al.* 2003).

El control de esta plaga con químicos tiene múltiples inconvenientes, principalmente aquellos relacionados con la susceptibilidad de las abejas a tales productos, la contaminación de la miel, la cera, y las concebidas implicaciones de la contaminación ambiental. El químico más utilizado es el ácido bórico sustancia química formada por boro, oxígeno e hidrógeno (Schaefer *et al.* 2008).

La incompatibilidad de estos químicos ha dado lugar a realizar estudios, utilizando medios biológicos como el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* cuyo efecto sobre otros insectos de este mismo orden han sido efectivo, así como la incidencia de la humedad del medio en la capacidad de infestar o controlar estados de desarrollo del insecto (Neumann *et al.* 2006).

Problema científico

¿Cuál será el efecto de cuatro dosis de *B. bassiana* en un sustrato con diferentes contenidos de humedad en el control de *Aethina tumida* Murray?

Hipótesis

Si se emplean diferentes contenidos de humedad en un sustrato con cuatro dosis de *B. bassiana*, se podría determinar el efecto sobre el porcentaje de mortalidad de larvas y la infección de las pupas del *A. tumida*.

Objetivo general

Determinar el efecto de cuatro dosis de *B. bassiana* en un sustrato con diferentes contenidos de humedad en el control de *A. tumida*.

Objetivo específico

1. Determinar la efectividad del porcentaje de humedad del sustrato en el control de *A. tumida*.
2. Evaluar la susceptibilidad de las larvas y pupas de *A. tumida* a cuatro dosis del entomopatógeno.

Revisión bibliográfica

1. Generalidades de la producción de miel en el mundo y Cuba.

La producción mundial de miel está en torno a 1 200 000 t, donde el 35 % de la producción es objeto de intercambios comerciales, dentro de las regiones con mayores producciones se encuentran Asia con un 33 % del total seguido de Europa con un 25 % de esa producción. Por otra parte se encuentra Estados Unidos el cual es un gran productor, exportador e importador del producto, además cuenta con un elevado índice de mecanización y tecnificación en esta rama (FAO, 2018).

Las producciones de miel no solo están destinadas al consumo de la población sino que también constituye parte importante de las exportaciones del producto crecientemente demandado y muy bien cotizado en el mercado internacional (APICULTURA, 2017).

La apicultura en Cuba dispone de 20 unidades empresariales de base, existen tres plantas de beneficio situadas en occidente, centro y oriente del país, se cuentan con cerca de 2800 apicultores asociados a diferentes formas productivas, entre ellas más de 360 CCS, 45 UBPC y 19 CPA. Además, 13 provincias practican la apicultura en las Fuerzas Armadas Revolucionarias. Se produce cerca de 8000 toneladas de miel de abeja por año, a partir de la actividad de 186 000 colmenas, con un rendimiento por cápita entre 40 y 45 kg (APICUBA, 2019).

El 90% de esta producción se exporta a Europa, principalmente a Alemania, Holanda, España y Suiza y solo el cinco por ciento se destina al mercado local. Además de la miel, en la isla se elaboran suplementos nutricionales apícolas conocidos comercialmente como Propomiel (miel con propóleos), Panmiel (miel con polen), Apiasmín (miel con polen y propóleos) y Propoforte (miel con jalea real, polen y propóleos), recomendados para complementar el tratamiento de anemias, trastornos prostáticos y otras enfermedades (APICUBA, 2019).

Según la directiva, el crecimiento de la apicultura está sustentado en un programa de desarrollo que prevé para el 2020 alcanzar la cifra de 10 000 toneladas, similar cantidad a la registrada en la década de 1980 a 1990, cuando se obtuvieron los mayores rendimientos, para lograr lo que se espera se requiere alcanzar los 220 mil panales y en conjunto a esto en nuestro país se criaron más de 155 000 abejas reina con el objetivo de garantizar al menos un cambio anual de la líder de cada colmena y así lograr mayor uniformidad en el desarrollo de los apiarios, y reducir la mortalidad de estos insectos (APICUBA, 2019).

1.1 La abeja y la polinización

La apicultura es de suma importancia para los seres vivos; sin la polinización por abejas no se podría llevar a cabo el proceso de reproducción de las diversas especies, y para los animales ya que en su mayoría se alimentan de plantas. Cabe recalcar que dicho proceso es vital para las abejas, ya que extraen su alimento de las flores, pero a la vez es riesgoso por los diversos factores que pueden impedir su regreso a la colmena (OIRISA-SAGARPA, 2012).

A nivel mundial, el 75 % de los cultivos dependen, de la polinización por insectos (Klein *et al.*, 2007). Aunque muchos alimentos básicos como el trigo, el maíz y el arroz, son polinizados por el viento, una gran proporción de otros alimentos como frutas, nueces y vegetales, que son fuente de micronutrientes (vitaminas y minerales) y que contribuyen a una dieta sana y equilibrada más allá de la ingesta de calorías, son dependientes de polinizadores (Eilers *et al.* 2011).

Dentro de los polinizadores, las abejas constituyen uno de los grupos más importantes (Klein *et al.* 2007). Aproximadamente el 73 % de los cultivos de frutas y semillas en el mundo son polinizados por abejas. Un buen modelo para evaluar la importancia de las abejas como polinizadores son los cultivos frutales promisorios, que son aquellos que se encuentran en estado silvestre o no están extensivamente cultivados, son sub-utilizados, pero tienen gran potencial

ecológico, para la conservación del medio ambiente y son susceptibles de un aprovechamiento ambientalmente sostenible (Minambiente-SENA, 2007).

El reconocimiento de impactos positivos como la polinización, sensibilizaría a las comunidades hacia la implementación de prácticas de conservación de las áreas naturales, en beneficio de la biodiversidad, la producción agrícola y los procesos ecosistémicos (Morandin y Winston, 2006).

1.2 Principales agentes nocivos que afectan a las abejas

Uno de los principales problemas que afecta la apicultura mundial, está relacionado con la sanidad de los apiarios. La presencia de enfermedades en las colmenas de abejas melíferas (*Apis mellifera*) reduce la producción de miel, y en ciertos casos pueden ocasionar la pérdida de la colonia, sino se controlan adecuadamente (IICA y SAG, 2009).

Al observar disminución brusca en el número de abejas, ausencia de la ovoposición, sin uniformidad, varios huevos por celda, huevos colocados en las paredes de las celdillas, larvas de color oscuro, olores ofensivos, opérculos sobresaltados, abejas poco activas, pueden ser síntomas de enfermedad o desordenes en las abejas. (IICA y SAG, 2009).

La Acariosis es causada por el ácaro *Acarapis woodi*, el cual es un parásito microscópico que afecta únicamente las abejas adultas, parasitando la parte protorácica de la tráquea. Algunas manifestaciones que podrían estar relacionadas son abejas con alas distendidas, abanicándolas sin poder volar, abdomen distendido, abejas muertas en frente de la colmena, entre otras (Ritter, 2001).

El Loque americano es una enfermedad bacteriana que afecta a la cría de las abejas melíferas. La principal característica es la putrefacción de la cría, asociada con un olor fétido, similar al pegamento, lo cual ayuda el diagnóstico de campo. Es causada por el *Paenibacillus larvae*, bacteria que forma esporas altamente

resistentes, capaces de permanecer viables en el medio por varios años, lo que favorece la dispersión y alta patogenicidad (Calderón y Zamora, 2007).

El Loque europeo es causado por un conjunto de bacterias, entre las que destaca el *Melissococcus plutonius*, el cual se considera el agente que inicia la infección. Algunos de los síntomas que se observan en panales afectados por Loque europeo son cría salteada, que ha afectado la cría abierta, olor avinagrado y la costra que se forma al morir la cría se desprende fácilmente. La nosemiosis es una enfermedad que afecta las funciones digestivas de la abeja, este parásito altera el metabolismo: hay menor digestión de las proteínas (polen), disminuyen así las energías (sustancias de reserva) y se reduce su longevidad (Moreno, 2004).

La varroasis es una parasitosis causada por el ácaro *Varroa destructor*, el cual afecta tanto a las abejas adultas como a la cría. Se alimenta de la hemolinfa de la abeja, debilitándola y ocasionándole serios problemas, como alteraciones internas y la transmisión de agentes infecciosos, principalmente virus. Los síntomas que podrían observarse son reducción de la población de la colonia, opérculos perforados, las abejas se muestran inquietas, hay mortalidad de la cría, abejas con malformaciones en las alas, entre otros (Moreno, 2004).

La polilla de la cera, también conocida como palomilla o alevilla de la cera, es un pequeño insecto que pertenece al orden Lepidóptera, familia Pyralidae, los que se caracterizan por presentar un par de alas muy desarrollado y recubiertas con escamas. Se diferencian dos tipos de polilla de la cera; la polilla de mayor tamaño corresponde a *Galleria melonella* (polilla mayor) y la más pequeña a *Achroea grisella* (polilla menor). Las larvas de la polilla son auténticas minadoras, capaces de devorar diferentes materiales blandos, como los panales de cera (Greco *et al.* 2010).

1.3 Incidencia de *Aethina tumida*

La especie *Aethina tumida* (Coleóptera: Nitidulidae) fue nombrada y descrita en 1867 por Andrew Dickson Murray en los Anales y la revista de Historia Natural de

Londres (Murray, 1867). Recibió dos muestras procedentes de la Antigua Calabar, en la costa oeste de África.

El pequeño escarabajo de la colmena es un insecto que afecta a colonias de abejas sociales nativas de África subsahariana, donde se consideran por lo general solo una plaga menor. En 1996, el pequeño escarabajo de la colmena fue descubierto fuera de su área de distribución natural en colonias de abejas de subespecie europea en el sudeste de Estados Unidos. Desde entonces, se han reportado introducciones del pequeño escarabajo de la colmena en otros países (Neumann y Ellis, 2008).

En estos nuevos rangos, los escarabajos pueden ser parásitos dañinos de las colonias de abejas de subespecie europeas y también puede dañar colonias no pertenecientes al género *Apis* como los abejorros y las abejas sin aguijón (Halcroft *et al.* 2011).

Muy rápidamente después de que *Aethina tumida* estableció poblaciones fuera de su área endémica, los efectos devastadores de este escarabajo en las colonias de abejas melíferas (dadas las condiciones climáticas y de suelos adecuados, Ellis *et al.* 2004) dio lugar a un esfuerzo activo de investigación para entender y controlar mejor esta plaga. En más de una década, *A. tumida* se ha extendido y establecido en casi todos los Estado Unidos y en toda la costa oeste de Australia (Neumann y Ellis, 2008).

1.3.1 Comportamiento del insecto

El pequeño escarabajo de la colmena es capaz de sobrevivir en climas fríos y tropicales, este coleóptero puede detectar colonias bajo estrés, a partir de una distancia de 13-16 km. Estudios han demostrado que la combinación de la miel, polen y abejas adultas, resulta atractiva para el insecto (Evans *et al.* 2003).

En términos generales, este insecto, se reproduce fácilmente en colmenas débiles o con poblaciones reducidas de abeja. Sin embargo, algunas veces, números pequeños de escarabajo, son capaces de completar el desarrollo de sus larvas, en colonias bien fortalecidas (Arbogast *et al.* 2012).

1.3.2 Características generales del pequeño escarabajo de la colmena

Etiología

Parasitosis producida por un pequeño escarabajo llamado *Aethina tumida* Murray, que afecta a las abejas y que tiene una metamorfosis que consta de cuatro estadios estos son: huevo, larva, pupa y adulto (Greco *et al.* 2010).

Taxonomía

Aethina tumida Murray, es un Coleóptero de la familia Nitidulidae, fue identificado por primera vez en Estados Unidos mediante recolecciones de escarabajos hechos a partir de colonias de abejas melíferas europeas, *Apis mellifera*, criados en Florida, EUA en junio de 1998 (Hood, 2001).

Clasificación taxonómica según Murray, (1986)

Reino: Animal

Filo: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Coleóptera

Familia: Nitidulidae

Género: *Aethina*

Especie: *A. tumida*

Morfología

Adultos

El escarabajo adulto tiene forma oval, ancha y aplanada, con dos antenas muy características terminadas en forma de mazo, tórax encorvado hacia el ano y

puntiaguda, extremidad del abdomen no recubierta por los élitros, tres pares de patas. Los adultos están cubiertos de unos finos pelos que hacen muy difícil cogerlos con la mano (Buchholz *et al.* 2008).

Los escarabajos adultos alcanzan longitudes de aproximadamente cuatro a cinco milímetros, es decir la tercera parte del tamaño de una obrera, su cubierta es dura, su color es café oscuro y finalmente negro en la madurez. Generalmente viven dentro de las colonias de abejas. Las hembras adultas son más numerosas que los machos y ligeramente más grandes. Los escarabajos adultos son voladores fuertes y se ha demostrado que pueden avanzar varios kilómetros. Los escarabajos adultos pueden sobrevivir 19 días si su alimentación es solo de agua y cera de abeja, y se han encontrado adultos que sobrevivieron 176 días alimentados con miel, pero no es probable que se reproduzcan (Buchholz *et al.* 2008).

Reproducción

El escarabajo es capaz de reproducirse en ausencia de las abejas mediante la utilización de otras dietas. Los experimentos realizados demuestran que el escarabajo es capaz de multiplicarse en frutas de diversas dietas. Estos resultados podrían tener consecuencias graves, porque la capacidad del pequeño escarabajo de reproducirse en la ausencia de las abejas puede frustrar los esfuerzos para controlar las poblaciones de las colmenas de abejas y porque facilita la expansión del escarabajo. El éxito de reproducirse es más bajo cuando las fuentes de comida son alternativas y es más alto cuando están presentes en la colonia de abejas (Arbogast *et al.* 2009).

Huevos

Los huevos *Aethina tumida* son de 1.4mm de largo x 0.26mm de ancho, de color blanco perla en su apariencia y de forma similar a los huevos de abeja, pero más pequeños, siendo aproximadamente dos tercios de longitud de los de abeja. Los huevos que las hembras ponen, son depositados en masas irregulares, en algunas grietas o cavidades dentro de la caja de la colonia pero generalmente los huevos son puestos en el área de la cría. También directamente en las fuentes de

alimentos como el polen o panales de cría o bien en lugares ocultos en masas irregulares fuera del alcance de las abejas (Ellis *et al.* 2007).

El pequeño escarabajo de las colmenas (*Aethina tumida* Murray) puede poner huevos a través del opérculo de celdas con crías sellada. No obstante, las abejas (*Apis mellifera* L.) pueden detectar esta actividad y responder eliminando el opérculo de las celdas y su contenido (Ellis y Delaplane, 2008).

La capacidad de puesta aún no se conoce con exactitud distintos trabajos estiman que una hembra de escarabajo tiene un potencial de puesta de 1000-2000 huevos durante su ciclo de vida. Se ha comprobado que dos o tres hembras adultas son suficiente para provocar un nivel de infestación que pone en riesgo la viabilidad de la colonia. Después de un corto período de incubación (tres-seis días), nacen las pequeñas larvas, que permanecen alimentándose sobre los panales de miel y polen. Incluso es posible observarlas sobre los panales de cría (pueden alimentarse de huevos y de las larvas o pupas en distinto grado de desarrollo) y en el fondo de los pisos, donde actúan como verdaderos carroñeros (Casanova, 2008).

Larva

El período de incubación del huevo varía de uno a seis días, con una duración del período más frecuente de dos a cuatro días. La larva emerge del huevo a través de una hendidura longitudinal y recién nacidas tienen cabezas relativamente grandes y numerosas protuberancias por todo el cuerpo, estas pueden efectuar la función de evitar que mueran ahogadas en la miel (Sanford, 2005). Las recién nacidas inmediatamente comienzan a alimentarse de cualquier fuente de alimento disponible, incluida la miel, el polen y crías de abejas, son las jóvenes las más activas y así ellas son responsables del daño para la mayoría de las colmenas. En términos promedio las larvas continúan alimentándose durante 13.3 días hasta que ellas están listas para la pupa (Guzman *et al.* 2009).

El tiempo de maduración de las larvas es generalmente de 10 a 14 días y varía dependiendo de la dieta. Después de la maduración completa alcanzan una longitud y ancho de 9.5 mm y 11.6 mm respectivamente. En la madurez o fase adulta dejan de comer y durante este proceso las adultas se arrastran y entran en la llamada “fase errante” y esta es cuando salen de la fuente de alimentos, migran fuera de la colonia y pupan en la tierra, por consiguiente es la condición para la realización completa para su desarrollo o supervivencia (Guzman *et al.* 2009).

Las larvas se entierran en el suelo haciendo una especie de celdilla de tierra lisa para realizar la metamorfosis. Es durante esta etapa de transición de larva a pupa cuando el insecto es más vulnerable. Se piensa que la naturaleza del suelo puede ser también una variable que incida en el éxito del desarrollo. El período que permanecen en el suelo varía grandemente de 15 a 60 días y la mayoría de los escarabajos emergen de la tierra después de tres a cuatro semanas (Hood, 2004).

Pupa

En un principio las ninfas son del color blanco nacarado, aumentando la pigmentación según se va realizando su metamorfosis predominando el perlado, comenzando por los ojos y extendiéndose por todo el cuerpo. Mientras se desarrolla el proceso se puede observar con frecuencia el movimiento de patas dentro del recubrimiento de la pupa. Más tarde en la etapa de pupa se oscurecen y su exoesqueleto se desarrolla y se endurece (Ellis *et al.* 2007).

La pupa mide tres milímetros de ancho por cinco milímetros de largo y muchas mueren enseguida en estado de ninfa, sin embargo la mortalidad es menor en los individuos con mayor rapidez de maduración. Pero si las características del suelo son favorables (prefieren suelos arenosos y húmedos), las pupas suelen encontrarse muy próximas a la piqueta (la mayoría a menos de un metro de distancia) y a escasa profundidad (6-20 cm). El tiempo que necesita el escarabajo para pupar oscila entre los 15 y 60 días, dependiendo de las condiciones ambientales, siendo más corto cuanto más suave es la temperatura. En

condiciones óptimas de temperatura y humedad el ciclo dura aproximadamente de tres a cuatro semanas. Cuando emerge el adulto emigra nuevamente al interior de la colmena. Una vez que dejan la pupa los escarabajos jóvenes surgen de la tierra en busca de alimento y entran a la colonia de abejas y la re infestan (Casanova, 2008).

1.3.3 Factores que pueden ocasionar la presencia del pequeño escarabajo de la colmena.

Meikle y Patt (2011) encontraron que existe una relación clara (más que con otros factores, como el tipo de alimentación) entre la temperatura ambiente y los tiempos tanto de eclosión de la larva (de 22 a 60 horas en temperaturas de entre 21 y 35 °C) como en el periodo de pupación (de 15 a 33 días en estas mismas temperaturas); a mayor temperatura se acorta de forma significativa el ciclo de vida del escarabajo y se detiene por debajo de 10 °C en el caso de los huevos y de 13.5 °C en el de larvas y pupas. También se ha observado relación entre la mayor sobrevivencia de las pupas en el suelo y temperaturas mayores.

Algo similar ocurre con las observaciones de humedad en el suelo. Se ha visto una relación entre ésta y la sobrevivencia de las pupas, que va desde nula en suelos secos y que se incrementa hasta cierto punto con contenidos de agua mayores hasta un óptimo de 0.56 m³ de agua por m³ de suelo, entre los tres valores del experimento (0.37, 0.56, 0.73 m³ de agua por m³ de suelo), y luego desciende cuando existe mayor humedad (Bernier *et al.* 2014).

Otros factores que ocasionan invasiones incontrolables del escarabajo y estimulan su desarrollo son: colonias débiles, colonias con exceso de panales almacenados, colonias con gran cantidad de miel no extraídas, alzas húmedas y descubiertas en almacén. Colmenas con baja población es un factor atrayente para el escarabajo (Rivera, 2005).

1.4 Control

Desde la introducción de este escarabajo en los Estados Unidos se han utilizado métodos prácticos para controlar este insecto, como el uso de químicos a través de diferentes productos o incluso trampas a base de frutas, mantener una buena higiene dentro de las colmenas y la inspección sistemática los cuales son adoptadas por muchos apicultores (Ellis *et al.* 2007).

1.4.1 Control químico

En la colonia han sido autorizadas las tiras Check Mite de Bayer por la Agencia de Protección del Medio Ambiente. En su composición, el ingrediente activo es coumafos al 10 %, un pesticida organofosforado impregnado en una tira plástica (Sanford, 2005).

En el suelo dentro del ciclo de vida del escarabajo el más vulnerable es la larva y pupa, por lo que en estas fases es donde se debe enfocar el control para lo cual menciona que la aplicación de permetrina líquida al suelo elimina pupas y adultos emergidos en un porcentaje mayor al 90 % (Sanford, 2005).

El control de esta plaga con productos químicos tiene múltiples inconvenientes, principalmente aquellos relacionados con la susceptibilidad de las abejas a tales productos, la contaminación de la miel, la cera, y las concebidas implicaciones de la contaminación ambiental. En el caso del ácido bórico es una sustancia química formada por boro, oxígeno e hidrógeno y es el más empleado en el control (Schaefer *et al.* 2008).

1.5 Potencialidades del hongo entomopatógeno (*B. bassiana* Bals)

Los hongos entomopatógenos son agentes de control biológico que tienen la capacidad de infectar activamente una gran diversidad de insectos y están ampliamente distribuidos en diferentes ecosistemas. Estos microorganismos son encontrados en desechos de cultivos, estiércol, suelo y plantas, alcanzando un

buen desarrollo en lugares frescos, húmedos y con baja luminosidad y son el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plagas (Becerra *et al.*, 2007).

El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* Bals Vuill (Moniliales: Deuteromicetes) tienen la potencialidad de infectar un amplio rango de insectos, provocando una alta mortalidad dentro de los órdenes Lepidóptera, Hymenoptera y especialmente Coleóptera, la mayoría de los cuales son plagas agrícolas (Lucero *et al.* 2006)

Se han encontrado cepas con virulencia hacia importantes plagas, tanto para la agricultura como para los humanos. En la agricultura, se ha utilizado para el combate de la cucaracha de la papa de Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*), broca del maíz (*Ostrinia nubilalis*), y la polilla (*Laspeyresia pomonella*) (Wong, 2003).

También *Anthonomus grandis* del algodón, *Cosmopolites sordidus* del banano, *Ancognatha* sp y *Phyllophaga* sp de la papa, *Compsus* sp en ornamentales, *Cosmopolites sordidus* y *Pseudococcus* sp en piña, *Loxotama elegans* en palma, *Trips* sp, ácaros en general y *Corytucha* sp en hortalizas y frutales, entre otras (EDAFON, 2005).

Estudios realizados en la Broca del Café (*Hypothenemus hampei*) en Colombia, reportó que a nivel de campo, aspersiones líquidas de 1×10^6 esporas/ml del hongo ocasiona una mortalidad de un 30 % ante *H. hampei*. Por otra parte un resultado similar comparado con la cepa colombiana *B. bassiana* 9205 (CENICAFE) y dos aislamientos nativos, lo obtuvieron Mora y Avilés, (2003). Así mismo a nivel de laboratorio, estos autores han reportado que la mortalidad del 50 % de las brocas se produce a los seis días, incluyendo más cepas nativas, revelando además, un alto grado de esporulación, ya que es mejor dispersar con esporas que con micelios, para mantener el efecto sobre el suelo (Scholte *et al.* 2004).

El efecto de la humedad en la transferencia de las esporas radica fundamentalmente en lo descrito por Charnely (2018), quien plantea que los factores que determinan la interacción hongo-artrópodo son las condiciones del medio si se logra producir una infección exitosa con la especificidad en la adhesión y germinación de los conidios en la cutícula del insecto y la evasión exitosa de las defensas del hospedador.

Este efecto de la humedad sobre el control del hongo se atribuye a lo planteado por Doberski (2017), quien afirma que la manifestación epizoótica de los hongos entomopatógenos depende de los factores bióticos y abióticos. Entre los factores abióticos que afectan la viabilidad y la persistencia de los hongos entomopatógenos en el campo se encuentran los rayos ultravioleta, la temperatura, la humedad relativa y la del medio.

2. Materiales y Métodos

En los meses de marzo y abril del 2019 se realizó un experimento en el Laboratorio de Agropecuaria III (LAIII) de la Universidad de Sancti Spíritus, con el objetivo de determinar el efecto de cuatro dosis de *B. bassiana* en un sustrato con diferentes contenidos de humedad en el control de *A. tumida*. Se empleó la cepa LBb111 con una concentración de $2,34 \times 10^9$ UFC, refrescada sobre insectos de *Cylas formicarius* L y multiplicadas sobre cabecilla de arroz en el LAIII.

Las larvas de *A. tumida* fueron colectadas en la Empresa Agropecuaria Militar de Sancti Spíritus ubicada en la carretera de Yaguajay km 2 en el municipio de Sancti Spíritus en apiarios infectados, así como el suelo utilizado para elaborar el sustrato fue Pardo sialítico sin carbonato (Hernández, 1999) y se obtuvo del mismo lugar de procedencia que las larvas.

Para evitar la contaminación con otros organismos los materiales de laboratorio fueron esterilizados en la autoclave Raypa a una temperatura de $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una presión de 1 atmósfera durante 20 minutos. Se utilizó el método del flameo para pesar, mesclar y sellar los recipientes.

2.1 Determinación de la incidencia del porcentaje de humedad en la efectividad de *B. bassiana*.

El efecto de la humedad en la efectividad del hongo sobre la mortalidad de las larvas y pupas, se realizó variando el contenido de agua en el sustrato, mediante el método gravimétrico.

El sustrato se pesó antes y después de secar durante 8 horas a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ y por diferencia se determinó el contenido de agua presente (25 %), mediante la fórmula: $P_{sh} - P_{ss} = a$, donde (P_{sh})=peso del suelo húmedo, (P_{ss})=peso del suelo seco y (a)=agua.

El porcentaje de humedad se expresó en base a suelo seco por la fórmula utilizada por Cairo y Reyes (2009) (% Hbss):

$$\%Hbss = \frac{a}{pss} \cdot 100$$

Teniendo en cuenta que 1 litro de agua es equivalente a 1000 g se variaron los volúmenes de agua hasta alcanzar el 40 % y 80 % de Hbss. Los tres porcentajes de humedad se utilizaron para las cuatro dosis y se evaluó el porcentaje de mortalidad de las larvas y la infección de las pupas en función del agua. Los volúmenes de agua por tratamiento fueron:

- 25 % Hbss: Humedad natural del suelo (12,5 mL de agua)
- 40 % Hbss: Humedad natural del suelo+20 mL de agua
- 80 % Hbss: Humedad natural del suelo+40 mL de agua

2.2 Evaluación de la susceptibilidad de las larvas y pupas de *A. tumida*.

Para la determinación de la susceptibilidad se utilizaron macetas (6,2 cm de alto x 15,5 cm de diámetro) con 400 g de sustrato y 100 g de aserrín, y se agregó a la mezcla cuatro dosis del hongo. Todos los componentes del sustrato se pesaron en una balanza digital modelo SARTORIUS.

Se emplearon tres contenidos de humedad del sustrato (25, 40 y 80 %) en las macetas y se colocaron en cada recipiente 10 larvas de *A. tumida* en estado larval L5, previamente desinfectadas con Hipoclorito de sodio al 2 %, el método utilizado fue la inmersión de los insectos en la solución y a continuación se le realizaron dos lavados en agua destilada, se utilizaron tres réplicas por tratamiento, para un total de 36 macetas.

Las dosis utilizadas fueron:

D1-*B. bassiana* 111: 10 g + (25 %, 40 % y 80 % Hbss)

D2-*B. bassiana* 111: 12.5 g + (25 %, 40 % y 80 % Hbss)

D3-*B. bassiana* 111: 15 g + (25 %, 40 % y 80 % Hbss)

D4-*B. bassiana* 111: 17.5 g + (25 %, 40 % y 80 % Hbss)

Los indicadores evaluados fueron:

Porcentajes de mortalidad de las larvas: Se realizaron evaluaciones cada 24 horas y se colectaron los insectos muertos los que se colocaron en cámaras húmedas para realizar el conteo de esporas germinadas por larvas/dosis.

Porcentajes de Infección de las pupas: Se observaron cada 24 horas y removiendo los primeros 3 cm del sustrato se colectó el 100 % de las pupas con color pardo o negro oscuro y se colocaron en cámaras húmedas para determinar el número de esporas germinadas por pupa/dosis.

Cantidad de esporas emergidas por larvas y pupas: Las larvas y pupas muertas en cámara húmeda transcurridos 14 días se colocaron en tubos de ensayo con agua destilada y tween, para separar las esporas y con la cámara de New Beager se contaron bajo el microscopio óptico NLCD-307B

Análisis estadístico

En el análisis estadístico se tuvo en cuenta que se cumpliera el supuesto de normalidad por Kolmogorov Smirnov y homogeneidad de varianzas por la prueba de Levene, estos análisis se realizaron en el paquete estadístico SPSS versión 15.0 para Windows y para el porcentaje de mortalidad de las larvas y la infección de las pupas se realizó un análisis factorial, donde se estableció una comparación entre las medias de la interacción entre las dosis de *B. bassiana* y los porcentajes de humedad del sustrato. Los valores porcentuales obtenidos se transformaron por $2 \arcsen \sqrt{p}/100$, para que se ajusten a la curva normal de probabilidad.

3. Resultados y Discusión

3.1 Efecto de las dosis y el contenido de humedad en el porcentaje de infección de las pupas de *A. tumida*.

La tabla 1 muestra el resultado de la infección de las pupas del insecto a las 48 horas de exponerlas al sustrato mezclado con las esporas del hongo, donde se observa que no hubo diferencias significativas entre la medias del porcentaje de infección en los sustratos con un 25 % y 40 % Hbss (18,69 % y 20,57 % respectivamente), pero fue significativamente superior al tratamiento de 80 % Hbss que alcanzó un 15,91 %. Las dosis empleadas difirieron estadísticamente entre ellas, y la mezcla con 17.5 g alcanzó el mejor valor con 32,86 % y la variante de 10 g del entomopatógeno resultó la más baja con solo 11,35 % de infección.

En las primeras 48 horas no hubo diferencias estadísticas en las dosis de 15 g y 17,5 g en los suelos de 25 % y 40 % Hbss con los mayores porcentajes de mortalidad superiores al resto, como muestra el análisis bifactorial de interacción de las variables (Tabla 1). Se muestra además que la menor infección fue la variante de 10 g del hongo en el suelo con 80 % Hbss.

Este resultado se corresponde con los parámetros de calidad y efectividad establecidos para los controles biológicos en general, aunque en un estudio realizado por Murrle *et al.* (2006) alcanzaron un porcentaje de mortalidad del 67 % en 24 días en adultos de esta especie con una cepa del entomopatógeno. Estudios realizados en el control de insectos de la familia Nitidulidae por Ellis *et al.* (2004) obtuvo valores superiores con concentraciones a los alcanzados en esta investigación.

Tabla 1. Infección de las pupas de *A. tumida* a las 48 horas

Dosis	10 g	12,5 g	15 g	17,5 g		
Infección de pupas de <i>A. tumida</i> 48 h						
Humedad/sustrato					Media H/S	Error Típico
25 % Hbss	13,4CD	13,3CD	28,8 B	34,0 A	18,69a	

40 % Hbss	15,1 C	16,3 C	24,8 B	37,7 A	20,57a
80 % Hbss	8,1 D	17,8 C	27,5 B	28,3 B	15,91 b
Media Dosis	11,35 d	15,56 c	26,92 b	32,86 a	0,025
Error Típico	0,057			0,032	
CV (%)					11,20

Letras mayúsculas desiguales para las medias de las interacciones difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la fila para las medias de las dosis difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la columna para las medias de las cepas difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Pasado las 96 horas de exposición de las pupas de *A. tumida* a la acción de *B. bassiana* en diferentes contenidos de agua en el sustrato no sobrepasan el 40 % de infección (Tabla 2). La tabla muestra que los tratamientos con 25 % y 40 % Hbss difieren entre ellos y con valores significativamente superiores a la variante con 80 % Hbss. El resultado del efecto independiente de las dosis sobre las pupas del insecto se comportó igual que la observación de las 48 horas, donde el tratamiento con 17.5 g del hongo con un 44,53 % fue superior al resto con diferencias entre ellos y el de menor porcentaje se obtuvo con 10 g con un 14,36 %.

A diferencia de la evaluación de las 48 horas en la tabla 2 se observa, que cuando transcurren 96 horas de iniciado el ensayo existe una interacción entre las dosis y el porcentaje de humedad, donde los mejores resultados los alcanzó la mezcla de 17,5 g en los sustratos con 40 % Hbss, con diferencias estadísticas entre ellas alcanzando un valor superior al 50 %.

Estos resultados no coinciden con los alcanzados por Vera *et al.* (2011), quienes obtuvieron en condiciones de laboratorio porcentajes superiores al 57 % en 72 horas con pupas de *H. hampei* infestadas con *B. bassiana*, pero la cepa fue aislada de forma directa para su empleo de placas Petri en un medio de cultivo de ADA. Por tanto este resultado se corresponde a lo planteado por Ellis *et al.* (2004) el cual refiere que la patogenicidad de un organismo está marcado por su raza o

cepa cuando los demás factores son homogéneos en las interacciones patógeno-insecto ya que la cepa de *B. bassiana* que se empleó se había obtenido de varios países sobre cuerpos de *Cylas formicarius*

Tabla 2. Infección de las pupas de *A. tumida* a las 96 horas

Dosis	10 g	12,5 g	15 g	17,5 g		
Infección de pupas de <i>A. tumida</i> 96 h						
Humedad/sustrato					Media H/S	Error Típico
25 % Hbss	15,1 F	23,8 E	38,7 C	50,0 B	25,96 b	
40 % Hbss	18,2 F	36,6 C	44,1BC	57,7 A	32,71 a	
80 % Hbss	11,4 G	20,6 E	30,5 D	33,3 D	20,09 c	
Media Dosis	14.36 d	25.44 c	36.89 b	44.53 a		0,007
Error Típico		0,043			0,003	
CV (%)						9,20

Letras mayúsculas desiguales para las medias de las interacciones difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la fila para las medias de las dosis difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la columna para las medias de las cepas difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

A los cinco días de exposición del insecto a las esporas del hongo se obtienen que los tratamientos con un 25 % y 40 % Hbss fueron superiores al que presentaba un 80 % Hbss difiriendo entre todos los tratamientos, alcanzando valores entre 35 y 46 % respectivamente (Tabla 3). Al igual que en las tablas anteriores el efecto de las dosis sobre las pupas del insecto difirieron entre ellas alcanzando los mejores resultados la dosis de 17,5 g con un 58,92 % siendo superior al resto. En la tabla 3 se muestra que en la interacción de los porcentajes de humedad y las dosis, la mejor combinación la obtuvo la mezcla de 17,5 g con un 40 % Hbss.

La virulencia de los hongos entomopatógenos como *B. bassiana* ha sido descrito por varios autores y con valores de mortalidad en condiciones de laboratorio superiores a los obtenidos en esta investigación, utilizando como diana a *H. hampei* (Benavides *et al.* 2012) apoyados en un mecanismo de acción general en

el cual las esporas en contacto con la superficie del insecto, penetran el exoesqueleto por acción física y enzimática degradando la cutícula (Góngora *et al.* 2011)

Tabla 3. Infección de las pupas de *A. tumida* a los 5 días

Dosis	10 g	12,5 g	15 g	17,5 g		
Infección de pupas de <i>A. tumida</i> a los 5 días						
Humedad/sustrato					Media H/S	Error Típico
25 % Hbss	18,4 F	42,3 D	52,8 C	64,0 B	35,53 b	
40 % Hbss	25,5 E	53,6 C	61,8 B	70,7 A	45,35 a	
80 % Hbss	14,1 G	27,8 E	48,5 C	47,3CD	26,90 c	
Media Dosis	18,23 d	38,32 c	53,82 b	58,92 a		0,036
Error Típico			0,019		0,038	
CV (%)						13,26

Letras mayúsculas desiguales para las medias de las interacciones difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la fila para las medias de las dosis difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la columna para las medias de las cepas difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

La evaluación de los diez días arrojó como resultado más relevante que con dosis superiores a 12.5 g del entomopatógeno se obtiene un porcentaje de infección de las pupas superior al 50 % como lo muestra la tabla 4. Para los medios biológicos, como los hongos, los valores alcanzados en condiciones semicontroladas expresan su potencial para el control de insectos. En esta tabla se muestra el porcentaje de infección de las pupas en la evaluación de los diez días, donde la mejor interacción de los indicadores evaluados lo alcanzaron las dosis de 15 g y 17,5 g con 40 % Hbss. Se observa además que la humedad del sustrato tuvo diferencias estadísticas entre ellos siendo el mejor la variante con 40 % Hbss con un porcentaje de infección de 64,10 %

Contrario de la evaluación de los cinco días, se observa que no hay diferencia significativa entre las medias del porcentaje de infección con las dosis de 15 g y

17,5 g, así como entre la dosis de 15 g y 12,5 g. Las mejores dosis fueron las de 15 g y 17,5 g y la de menor resultado en el control de las pupas fue la variante con 10 g para un 36,15 % de infección.

Este resultado corrobora lo planteado por Alves *et al.* (2002), quienes afirmaron que el periodo requerido para matar al insecto es variable, dependiendo de la cantidad de esporas que se depositen sobre el mismo, temperatura, especie, tamaño y edad del insecto, pero en la mayoría de las condiciones la muerte ocurre posterior a las 72 horas en el caso de las larvas de coleópteros.

Los resultados demuestran que los tratamientos de *B. bassiana* fueron virulentos sobre *A. tumida*, ya que provocaron más del 50 % de mortalidad en esta forma de aplicación, lo que indica alto grado de patogenicidad, concordando con resultados obtenidos por otros investigadores (Alves *et al.* 2002)

Tabla 4. Infección de las pupas de *A. tumida* a los 10 días

Dosis	10 g	12,5 g	15 g	17,5 g		
Infección de pupas de <i>A. tumida</i> a los 10 días						
Humedad/sustrato					Media H/S	Error Típico
25 % Hbss	38,1 F	62,0 C	65,8 C	74,6 B	56,35 b	
40 % Hbss	43,6 E	71,3 B	76,5 AB	80,9 A	64,10 a	
80 % Hbss	29,6 G	49,3ED	52,7 D	57,6CD	44,24 c	
Media Dosis	36,15 c	59,47 b	63,49ab	69,56 a		0,014
Error Típico			0,028		0,008	
CV (%)						11,09

Letras mayúsculas desiguales para las medias de las interacciones difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la fila para las medias de las dosis difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la columna para las medias de las cepas difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

3.2 Efecto de las dosis y el contenido de humedad en el porcentaje de mortalidad de las larvas de *A. tumida*.

La tabla 5 muestra el resultado de la mortalidad de larvas del insecto a las 72 horas de exponerlas al sustrato, donde se observa que hubo diferencias significativas entre las medias en los sustratos con un 25 % y 40 % Hbss con valores de 30,92 % y 36,59 % de larvas muertas, pero significativamente superior al tratamiento de 80 % Hbss que alcanzó un 21,94 %. Las dosis empleadas difirieron estadísticamente entre ellas, y la mezcla con 17,5 g alcanzó el mejor valor para un 39,47 % y la variante de 10 g del entomopatógeno resultó la más baja con solo 21,90 % de mortalidad de larvas de *A. tumida*.

En las primeras 72 horas hubo diferencias en la interacción de las variables evaluadas, donde la dosis de 17,5 g en el sustrato de 40 % Hbss fue la de mayor porcentaje de mortalidad superior al resto, como muestra el análisis bifactorial (Tabla 5). Se muestra además que la menor infección fue la variante de 10 g del hongo en el sustrato con 80 % Hbss.

Los valores alcanzados coinciden con los reportes de virulencia de este entomopatógeno, ya que según Murrle *et al.* (2006), la relativa rapidez con que causan la muerte a los insectos hospedantes del orden coleóptera varía entre 48 y 72 horas en su medio natural (se inician cambios motores), además de la alta variabilidad de su acción ha conllevado a su empleo como control biológico en el manejo integrado de plagas.

Estos valores superiores a la acción sobre las pupas en igual periodo de tiempo se debe a que en el factor encuentro Hongo-insecto, la flacidez de la larva así como el contenido graso permite mayor acción del patógeno con una expresión inmediata de movimientos lentos y descoordinación en los movimientos, efectos descritos por Murrle *et al.* (2006).

Tabla 5. Mortalidad de las larvas de *A. tumida* a las 72 horas

Dosis	10 g	12,5 g	15 g	17,5 g		
Mortalidad de larvas de <i>A. tumida</i> 72 h						
Humedad/sustrato					Media H/S	Error Típico
25 % Hbss	23,6 E	28,9 D	34,5 C	42,8 B	30,92 b	
40 % Hbss	27,2 F	35,1 C	41,3 B	50,4 A	36,59 a	
80 % Hbss	17,3 F	20,9 E	22,8 E	30,5CD	21,94 c	
Media Dosis	21,90 d	27,04 c	30,90 b	39,47 a		0,013
Error Típico		0,047			0,039	
CV (%)						7,24

Letras mayúsculas desiguales para las medias de las interacciones difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la fila para las medias de las dosis difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la columna para las medias de las cepas difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Pasada las 96 horas de exposición de las larvas de *A. tumida* a la acción de *B. bassiana* en diferentes contenidos de agua en el sustrato sobrepasaron el 50 % de mortalidad con la dosis de 17,5 g. En esta tabla se muestra que los tratamientos con 25 % y 40 % Hbss difieren entre ellos con valores superiores a la variante con 80 % Hbss. El resultado del efecto independiente de las dosis sobre las pupas del insecto se comportó igual que la observación de las 72 horas, donde la dosis con 17,5 g del hongo con 55,35 % fue superior al resto con diferencias entre ellos y el de menor porcentaje se obtuvo con 10 g con un 33,36 %.

Al igual que la evaluación de las 72 horas en la tabla 6 se observa, que cuando transcurren 96 horas de iniciado el ensayo en la interacción entre las dosis y el porcentaje de humedad, el mejor resultado lo alcanzó la mezcla de 17,5 g en los sustratos con un 40 % Hbss, con diferencias respecto a los demás, siendo superior alcanzando valores de 66,2 % de mortalidad.

Estos resultados se asemejan a los alcanzados por Ellis *et al.* (2004), los que obtuvieron un porcentaje de mortalidad del 67 % en insectos de la familia

Nitidulidae en 96 horas, lo que demuestra que la calidad de esta cepa o la patogenicidad sobre esta especie de insecto es baja con respecto a las empleadas por estos autores. Es importante resaltar que, aunque estos resultados son menores se justifica su empleo por ser los primeros de su tipo en Cuba para esta cepa y el segundo para este hongo en el manejo de *A. tumida*.

Tabla 6. Mortalidad de las larvas de *A. tumida* a las 96 horas

Dosis	10 g	12,5 g	15 g	17,5 g		
Mortalidad de larvas de <i>A. tumida</i> 96 h						
Humedad/sustrato					Media H/S	Error Típico
25 % Hbss	34,8 F	41,6 D	52,3 C	60,0 B	45,16 b	
40 % Hbss	37,3 E	50,0 C	61,3 B	66,2 A	51,13 a	
80 % Hbss	29,1 G	38,0 DE	39,2 DE	44,6 D	36,82 c	
Media Dosis	33,36 d	42,64 c	49,22 b	55,35 a		0,032
Error Típico			0,008		0,021	
CV (%)						14,08

Letras mayúsculas desiguales para las medias de las interacciones difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la fila para las medias de las dosis difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la columna para las medias de las cepas difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

La tabla 7 muestra el resultado de la mortalidad de larvas transcurrido cinco días del experimento, donde se observa que las combinaciones de 15 g y 17,5 g con un 40 % Hbss alcanzó el mayor porcentaje con 78,6 % y 82,3 % respectivamente, existiendo diferencias estadísticas con los demás tratamientos. Las restantes variantes evaluadas mostraron diferencias entre ellas y el porcentaje más bajo se obtuvo cuando se interrelacionaron la variable de 10 g y 80 % Hbss con solo un 44 % de mortalidad.

Por su parte en un análisis de las medias del contenido de humedad se observaron diferencias estadísticas entre todas las medias y con un valor de 72,16

% de mortalidad; el sustrato con 40 % Hbss fue superior al resto (Tabla 7). Esta tabla muestra además que no hubo diferencias entre las dosis de 15 g y 17,5 g, donde la dosis de 17,5 g mostró el mejor valor de mortalidad, con un 75,90 % y el menor porcentaje lo obtuvo la dosis con 10 g para un 50,29 % de mortalidad.

Este resultado es similar al obtenido por Samuels *et al.* (2018), quienes determinaron que el tiempo promedio para la aparición de los primeros individuos muertos es de 3 a 5 días posteriores a la exposición de los insectos a la acción del hongo.

Los valores de mortalidad de las larvas del insecto fueron inferiores a los de los adultos coincidiendo con lo planteado por Hernández y Grillo (2014), quienes afirman que es más efectivo el control de las larvas que el de adultos por sus características de infección y en este caso específico se garantiza el factor encuentro con el insecto.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo observado por Kassa *et al.* (2002) quienes en su experimento con *B. bassiana* sobre *S. zeamais* encontraron mortalidad superior al 90 % con un tiempo medio de supervivencia del insecto de entre 2,85 y 4,05 días respectivamente.

Tabla 7. Mortalidad de las larvas de *A. tumida* a los 5 días

Dosis	10 g	12,5 g	15 g	17,5 g		
Mortalidad de larvas de <i>A. tumida</i> a los 5 días						
Humedad/sustrato					Media H/S	Error Típico
25 % Hbss	50,6 E	61,2 D	72,0BC	76,3 B	63,39 b	
40 % Hbss	58,3 D	74,6BC	78,6AB	82,3 A	72,16 a	
80 % Hbss	44,0 F	52,4 E	68,3CD	70,1 C	56,56 c	
Media Dosis	50,29 c	61,43 b	72,72ab	75,90 a		0,016
Error Típico			0,021		0,039	
CV (%)						4,68

Letras mayúsculas desiguales para las medias de las interacciones difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la fila para las medias de las dosis difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la columna para las medias de las cepas difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

En la tabla 8 se muestra el porcentaje de mortalidad de las larvas a los diez días de iniciada la investigación. En la medida que se incrementó el tiempo de acción del hongo disminuyó las diferencias entre los tratamientos evaluados, donde las interacciones de 12,5 g, 15 g y 17,5 g en el sustrato con 25 % y 40 % Hbss no difirieron entre ellos y alcanzaron valores superiores al 80% de mortalidad.

En las interacciones se muestra además (Tabla 8) que el porcentaje más bajo lo obtuvo el sustrato con 80 % Hbss y 10 g del hongo para un 59,7 %. En esta misma tabla se observa que las medias de las dosis la de 15 g y 17,5 g no arrojaron diferencias estadísticas entre ellos pero sí con las demás dosis evaluadas. El mejor porcentaje se alcanzó con 17,5 g (86 %) y el valor más bajo con la dosis de 10 g (64,46 % de mortalidad).

Estos resultados muestran la importancia de las aplicaciones de hongos entomopatógenos en el manejo de especies de la familia Nitidulidae (Góngora *et al.* 2011), ya que según Hernández y Grillo (2014), esto se debe a que se pueden ocasionar diferentes efectos deletéreos sobre sus hospederos, que pueden ir desde reducción en la fecundidad, esterilidad y longevidad; disminución en la actividad, retraso en el desarrollo, cambios fisiológicos, morfológicos y de comportamiento y hasta la muerte.

Tabla 8. Mortalidad de las larvas de *A. tumida* a los 10 días

Dosis	10 g	12,5 g	15 g	17,5 g		
Mortalidad de larvas de <i>A. tumida</i> a los 10 días						
Humedad/sustrato					Media H/S	Error Típico
25 % Hbss	66,3 D	74,1BC	83,7 AB	88,3 A	77,14ab	

40 % Hbss	68,0CD	81,6 AB	86,4 A	88,1 A	80,18 a
80 % Hbss	59,7 E	72,5 C	80,3 AB	82,5AB	72,57 b
Media Dosis	64,46 c	75,86 b	83,39ab	86,21 a	0,042
Error Típico	0,033			0,020	
CV (%)					12,02

Letras mayúsculas desiguales para las medias de las interacciones difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la fila para las medias de las dosis difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

Letras minúsculas desiguales en la columna para las medias de las cepas difieren para $p \leq 0,05$ según prueba de rangos múltiples de Tukey

3.3 Determinación del número de esporas del hongo germinadas sobre larvas y pupas de *A. tumida*.

Un indicador evaluado en este ensayo fue el número de esporas germinadas por pupa y en la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos, donde se observa que la dosis de 17,5 g con un 40 % Hbss fue la de mayor porcentaje de esporulación por individuo con un valor de $1,56 \times 10^8$ UFC. Este valor es inferior al alcanzado por autores como Ellis *et al.* (2004), quienes, en un ensayo durante 14 días con dicho entomopatógeno obtuvieron $3,48 \times 10^8$ UFC esporas germinadas sobre cuerpos de coleópteros de la familia nitidúlidos.

Por su parte los valores más bajos se alcanzaron con las dosis de 10 g, la cual solo obtuvo $0,17 \times 10^8$ UFC esporas por individuo. En este indicador solo se evaluó el efecto de las dosis y no el de la humedad del sustrato, teniendo en cuenta que según Butt *et al.* (2017), el factor más importante en la fase germinativa del hongo es factor de exposición del hospedante (Insecto-hongo).

Autores como Samuels *et al.* (2018), obtuvieron $3,5 \times 10^8$ UFC esporas por individuos, a partir de insectos sumergidos en un estudio de susceptibilidad donde se depositaron los insectos en una lámina de agua con esporas de este hongo.

Tabla 9. Cantidad de esporas totales de *B. bassiana* emergidas de las pupas por tratamiento

Humedad/sustrato	Dosis			
	10 g	12,5 g	15 g	17,5 g
25 % Hbss	0,28x10 ⁸ f	1,23x10 ⁸ c	1,36x10 ⁸ bc	1,40x10 ⁸ b
40 % Hbss	0,15x10 ⁸ g	0,89x10 ⁸ e	1,12x10 ⁸ d	1,56x10 ⁸ a
80 % Hbss	0,17x10 ⁸ g	0,87x10 ⁸ e	1,22x10 ⁸ c	1,35x10 ⁸ bc
Error Típico	0,33			
CV (%)	15,31			

En la tabla 10 también se muestra que el número de esporas por individuo fue bajo y la mejor dosis fue la de 17,5 g y 25 % Hbss con 1,33x10⁹ UFC, pero bajos con respecto a los alcanzados por autores como Murrle *et al.* (2006).

Al igual que en la cepa 111 los valores del número de esporas por individuos fueron inferiores a los alcanzados por autores como Hernández *et al.* (2007), los cuales obtuvieron diferencias entre dos cepas de este hongo en el porcentaje de esporulación sobre el insecto, pero superiores a 2,4x10⁹ UFC.

El valor de esporas observadas fue inferior al alcanzado por autores como Ellis *et al.* (2003), los que demostraron que independientemente a la fase de desarrollo del insecto la patogenicidad de los hongos entomopatógenos está marcado en gran medida por la calidad de obtención de las cepas.

Tabla10. Cantidad de esporas totales de *B. bassiana* emergidas de las larvas por tratamiento

Humedad/sustrato	Dosis			
	10 g	12,5 g	15 g	17,5 g
25 % Hbss	0,06x10 ⁹ e	0,36x10 ⁹ d	1,25x10 ⁹ b	1,33x10 ⁹ a
40 % Hbss	0,07x10 ⁹ e	0,20x10 ⁹ d	1,04x10 ⁹ c	1,24x10 ⁹ b
80 % Hbss	0,07x10 ⁹ e	0,13x10 ⁹ e	1,02x10 ⁹ c	1,22x10 ⁹ b
Error Típico	0,26			
CV (%)	12,33			

Conclusiones

1. En la infección de las pupas el contenido de 40 % Hbss alcanzó el mayor porcentaje con un valor superior al 50 % en 96 horas.
2. El mayor porcentaje de mortalidad de larvas se alcanzó con las dosis de 15 g y 17,5 g con 25 % y 40 % Hbss.
3. El mayor número de espores en las pupas y larvas se obtuvo con la dosis de 17,5 g.

Referencia Bibliografía:

Alves, S. B., Rossi, L.S., López, R.B., Tamai M.A. y Pereira, R.M. (2002). *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) Journal of. Invertebrate Pathology Vol. 81 (2): 70-77

APICUBA, (2014). Informe Resumen, Balance de Trabajo, Año 2013. Grupo Empresarial de Agricultura de Montaña (GEAM), Ministerio de la Agricultura. 21 de febrero, La Habana, Cuba. 14 pp.

APICUBA, (2019). Informe cierre año 2018. Ministerio de la Agricultura, La Habana. Cuba.

APICULTURA, (2017). Revista electrónica, abril-mayo ISSN: 4682 2782 34

Arbogast, R.T. y Torto, B. (2009). Monitoring the small hive beetle, *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae), with baited flight traps: effect of distance from bee hives and shade on the numbers of beetles captured. Florida Entomologist Vol.92 No.1 pag.165-166.

Arbogast, R.T., Torto, B., Willms, S., Fombong, A.T., Duehl, A., Teal, P.E.A. (2012). Estimating reproductive success of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) in honey bee colonies by trapping emigrating larvae. Environmental Entomology 41(1):152-158.

Becerra, V., Paredes, M., Rojo, C. y France, A. (2007). RAPD E ITS detectan variación molecular en poblaciones chilenas de *Beauveria bassiana* Agricultura técnica (Chile) 67(2):115-125

Benavides, M., P., Góngora, C. E., Bustillo P., A. E. (2012). IPM Program to control coffee berry borer *Hypothenemus hampei*, with emphasis on highly pathogenic

mixed strains of *Beauveria bassiana*, to overcome insecticide resistance in Colombia, *Insecticides - Advances in Integrated Pest Management* (Ed.). ISBN: 978-953-307-780-2

Bernier, M., Fournier, V. and Giovenazzo, P. (2014). "Pupal Development of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) in Thermo-Hygrometric Soil Conditions Encountered in Temperate Climates", en: *Journal of Economic Entomology*. 107(2), pp. 531-537. Entomological Society of America.

Borroto, H., Chan, S., Demedio, J. (2014). Diagnóstico de *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae) en colmenas (*Apis mellifera* L.) de Mayabeque. Memorias Jornadas Científicas por el 122 Aniversario del Sabio de la Medicina Veterinaria Cubana Dr. Ildefonso Pérez Viguera. Universidad de Ciencias Médicas - Consejo Científico Veterinario. Pinar del Río, Cuba.

Buchholz, S., Schafer, M.O., Spiewok, S., Pettis, J.S., Duncan, M., Ritter, W., *et al.* (2008). Alternative Food Sources of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) *Journal of Apicultural Research* Vol.47 Vol.3 pag. 202-209.

Butt, T. M., Jackson, C., Magan, N. (2017). Fungi as biological control agent: progress, problems and potencial. In: Butt, T. M.; Jackson, C.; Magan, N. (Eds.). *Fungias biocontrol agents*. Wallingford: CABI International, p. 1-8. <http://dx.doi.org/10.1079/9780851993560.0001>

Calderón, R.A., Zamora, L.G. (2007). Presencia de Loque americana en colmenas de abejas africanizadas en Costa Rica, pp. 87. In: Memorias del IX Congreso Nacional de Apicultura.

Casanova, R.A. (2008). La apicultura y la Entomofauna Asociada. Inseparable Relación. En memoria del 15º. Congreso Internacional de Actualización Apícola,

Asociación Nacional de Médicos Veterinarios Especialistas en Abejas, A.C. pag.144-149.

Charnley, A. K., Collins, S. A. (2018). Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: KUBICEK, C. P.; DRUZHININA, I. S. (Eds.). 2. ed. **The Mycota**. Heidelberg: Springer-Verlag, vol. IV: environmental and microbial relationships.

Doberski, J. W. (2017). Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: effect of temperature and humidity on infection by *beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 37, n. 2, p. 195-200, disponible: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(81\)90075-6](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(81)90075-6)

EDAFON. (2005). Fundación Agroecológica. Consultado 26 noviembre 2005. Disponible en: <http://www.controlbiologico.com/bassianil.htm>

Eilers, E.J., Kremen, C., Greenleaf, S.S., Garber, A.K., Klein, A.M. (2011). Contribution of Pollinator-Mediated Crops to Nutrients in the Human Food Supply. PLoS ONE 6 (6): e21363.doi:10.1371/journal.pone.0021363.

Ellis, J. D., Hepburn, R., Luckman, B. y Elzen, P.J. (2004) "Effects of Soil Type, Moisture, and Density on Pupation Success of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae)", *Environmental Entomology*. 33(4), pp. 794-798.

Ellis, J.D. y Delaplane, K.S. (2008). Comportamiento de puesta del pequeño escarabajo de las colmenas (*Aethina tumida*) en celdas de crías operculadas con notas sobre la eliminación del contenido de las celdas por abejas europeas (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research* Vol.47 No.3 pag.210-215.

Ellis, J.D., Hepburn, H.R., Delaplane, K., Neumann, P. & Elzen, P.J. (2003). The effects of adult small hive beetles, *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae), on

nests and flight activity of Cape and European honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, **34**, 399–408.

Ellis, M.A., Ellis, J.D.A. y Hodges, C.A. (2007). Small Hive Beetle *Aethina tumida* Murray: Nitidulidae: Coleoptera. Florida Department of Entomology, North Carolina State. Publication Number: 0018. Publication Date: January 2007.

Evans, J.D., Pettis, J.S., Hood, H., Shimanuki, H. (2003). Tracking an invasive honey bee pest: Mitochondrial DNA variation in North American small hive beetles. *Apidologie*. 34: 103-109.

FAO. (2018)- Estadísticas FAOSTAT <http://www.fao.org/faostat/es/#data>. Consultada en los meses de Junio y Julio de 2018.

Góngora, B.C.E., Marín M.P., Benavides, M.P. (2011) Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico. *Avance técnico* 348. (Ed.). ISSN: 2849-3561. 8 págs.

Greco, M.K., Hoffmann, D., Dollin, A., Duncan, M., Spoonerhart, R., Neumann, P. (2010). The alternative Pharaoh happroach: stingless bees mummify beetle parasites alive. *Naturwissenschaften* 97:319-323.<http://dx.doi.org/10.1007/s00114-009-0631-9>

Guzman, L.I., Frake, A.M. y Rinderer, T.E. (2009). Comparative resistance of Russian and Italian Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) to Small Hive Beetles (Coleoptera: Nitidulidae). *Apiculture and Social Insects* Vol. 102, No.1 pag.13-19.

Halcroft, M., Spooner-Hart, R., Neumann, P. (2011). Behavioral defense strategies of the stingless bee, *Austroplebeia australis*, against the small hive beetle, *Aethina tumida*. *Insectes Sociaux* 58:245-253. <http://dx.doi.org/10.1007/s00040-010-0142-x>.

Hayes, R., Rice, S., Amos, B. & Leemon, D. (2015). Increased attractiveness of honeybee hive product volatiles to adult small hive beetle, *Aethina tumida*,

resulting from small hive beetle larval infestation. *Entomol. Exp. Appl.* 155: 240-248. doi: 10.1111/eea.12304

Hernández, A., Pérez, J., Bosch, D., Rivero, L., Camacho, E., Ruiz, J., *et al* (1999). Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. 1ra ed. Ciudad de La Habana: AGRINFON Ministerio de la Agricultura. p. 64. ISBN 959-246-022-1.

Hernández, D. y Grillo, H. (2014). Susceptibilidad de *A. tumida* a *Beauveria bassiana* y *Heterorabditis indica*. Tesis de Diploma, Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas.

Hernández, G., Hernández, R., Sánchez, A. y Alatorre, R. (2007). Inefectividad, edad y humedad relativa relacionados con la susceptibilidad de ninfas y adultos de *Periplaneta americana* a *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *ENTOMOTROPICA*. México. Vol. 22(1): 27-36. ISSN 1317-5262.

Hood, W.M. (2001). Panorama general sobre el pequeño escarabajo de la colmena *Aethina tumida*, en Estados Unidos. Trad. Lizandro Pinto. *Apitec* Julio/Agosto No. 28.

Hood, W.M. (2004). The small hive beetle, *Aethina tumida*: A review. *Bee World*. Vol.85 No 3 pág. 51-59.

IICA: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura SAG: Secretaría de Agricultura y Ganadería. (2009). *Manual de Enfermedades Apícolas*. Recuperado de <http://repiica.iica.int/docs/B0754e/B0754e.pdf>

Kassa, A., Zimmermann, G., Stephan, D. y Vidal, S. (2002). Susceptibility of *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Prostephanous*

truncatus (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) to Entomopathogenic fungi from Ethiopia. *Biocontrol Science and Technology* Vol.12, 727–736

Klein, A.M., Vaissiere, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of Royal Society B* 274: 303–313.

Lóriga, W., Fonte, L. y Demedio, J. (2014). Reporte de *Aethina tumida* Murray (Coleoptera, Nitidulidae) en colonias de la abeja sin aguijón *Melipona beecheii* Bennett de Matanzas y Mayabeque. *Rev. Salud Anim.* 36: 201-204.

Lucero, A.M., Peña, L.A., Curtid, L. y Bolaños, M.A. (2006). Manejo integrado de chisas en fincas de minifundio del departamento de Nariño (Colombia) *Revista Corpoica –Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 7(1): 70-72

Meikle, W. G. y Patt, J.M. (2011). “Temperature, diet and other factors on development, survivorship and oviposition of the Small Hive Beetle, *Aethina tumida* Murray (Col: Nitidulidae)”, en: *Journal of Economic Entomology*. 104, pp. 753-763.

Ministerio del Medio Ambiente, Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA). (2007). Estrategia de transferencia de tecnología ambiental sobre especies promisorias de la fauna y flora silvestres. En: <http://www.banrepcultural.org/blaavirtual/ciencias/sena/cursosdecapacitacion/estrategia/indice.htm> (Fecha de consulta: Mayo de 2012).

Mora, J., Avilés, J. (2003). Resumen: Evaluación de la patogenicidad de aislamientos de *B. bassiana* para el control de la broca del café en Costa Rica / Eficacia de dos aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* para el combate de la broca del café (*Hypothenemus hampei*). Instituto de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), MAG. V Congreso Nacional de Fitopatología, V Congreso Iberoamericano de Agroplasticultura, IV Congreso Nacional de Suelos.

Alianza Tecnológica para la Agricultura con Calidad. Costa Rica. Consultado 9 octubre 2005. Disponible en: http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a01-8385_memoria.pdf

Morandin, L.A., Winston, M.L. (2006). Pollinators provide economic incentive to preserve natural land in agroecosystems. *Agriculture Ecosystems and Environment* 116 (3-4): 289–292.

Moreno, E.A. (2004). Manual Control de enfermedades Apícolas (Descripción, Diagnóstico y Tratamiento). Red Nacional Apícola. Chile. 60 p.

Murray, A. (1867). List of Coleoptera received from Old Calabar, on the west coast of Africa. *The Annals and Magazine of Natural History* 19: 167.

Murrle, T. M., Dames, J. F., Hepburn, H. R., Hill, M.P. and Neumann, P. (2006). Susceptibility of Adult *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) to Entomopathogenic Fungi. *APICULTURE AND SOCIAL INSECTS. J. Econ. Entomol.* 99(1):1-6

Neumann, P., Ellis, J.D. (2008). The small hive beetle (*Aethina tumida* Murray, Coleoptera: Nitidulidae): distribution, biology and control of an invasive species. *Journal of Apicultural Research* 47(3):180-183. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.47.3.1>

Neumann, P., Hill, M.P., Hepburn, H.R., Murrle, T.M., Dames, J.F. (2006). Susceptibility of Adult *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) to Entomopathogenic Fungi. *APICULTURE AND SOCIAL INSECTS. J. Econ. Entomol.* 99(1):1-6

Oirisa-Sagarpa. (2012). Patología, Diagnóstico y Control de las Principales Enfermedades y Plagas de las Abejas Melíferas. Organismo Internacional

Regional de Sanidad Agropecuaria y Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. México. 165 p.

Palmeri, V., Scirtò, G., Malacrinò, A., Laudani, F. y Campolo, O. (2015). A scientific note on a new pest for European honeybees: first report of small hive beetle *Aethina tumida*, (Coleoptera: Nitidulidae) in Italy. *Apidologie*. 46: 527-529. doi: 10.1007/s13592-014-0343-9

Ritter, W. (2001). Enfermedades de las abejas. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España. 146 p.

Rivera, R. (2005). Control y Biología del Escarabajo Pequeño de la Colmena. Presentación para Reunión del Comité Sistema Producto-Miel Tamaulipas México. Abril 14 del 2005. USDA-ARS/HoneyBeeResearchLab, Weslaco, Texas, USA.

Rodríguez, R., Mondragón, P.M, Ulloa, J.A., Reséndiz, J.A., Ulloa, P.R. (2010). La miel de abeja y su importancia. Revista Fuente Año 2, No. 4, Septiembre 2010 ISSN 2007 – 0713. Universidad Autónoma de Nayarit. México.

Samuels, R. I., Coracini, D. L. A., Martins Dos Santos, C. A., Gava, C. A. T. (2018). Infection of *Blissus antillus* (Hemiptera: Lygaeidae) eggs by the Entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. **Biological control**, v. 23, n. 3, p. 269-273. <http://dx.doi.org/10.1006/bcon.2001.1009>

Sanford, M. T. (2005) (en línea). Featured Creatures. Small hive beetle: *Aethina tumida* (Murray) (Insecta: Coleoptera: Nitidulidae). University of Florida, USA (<http://www.entnemdept.ufl.edu/creatures/index.htm>) (consulta el 10 de abril del 2011).

Schaefer, M., Pettis, J.S., Ritter, W., Neumann, P. (2008). A simple method for quantitative diagnosis of small hive beetles, *Aethina tumida*, in the field. *Apidologie*, 39, 564–565.

Scholte, E., Knols, B., Samsom, R., Taken, W. (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *Journal of Insect Science*. 4(19): 24 pp.

Vera, J.T., Montoya, E.C., Benavides, M.P., Góngora, C.E. (2011) Valuation of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as a control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytinae) emerging from fallen, infested coffee berries on the ground, *Biocontrol Science and Technology* 21 (1): 1-14.

Wong, H. (2003). Molecular biology of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: Insect-cuticle degrading enzymes and Development of a new selection marker for fungal transformation. Tesis de Doctorado. Universidad de Ruperto-Carola de Heidelberg. Alemania.147 p.