



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

OCURRENCIA DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS
EN SUELOS DE COCOTEROS, CARACTERIZACIÓN
FISIOLÓGICA Y PATOGENICIDAD HACIA
Rhynchophorus palmarum

Tesis que presenta

AUGUSTO JAVIER PEÑA PEÑA

En opción al título de

DOCTORADO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: OPCIÓN BIOTECNOLOGÍA)

Mérida, Yucatán, México

2023

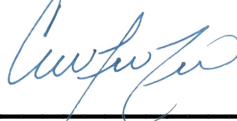
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Augusto Javier Peña Peña** titulado “**Ocurrencia de hongos entomopatógenos en suelos de cocoteros, caracterización fisiológica y patogenicidad hacia *Rhynchophorus palmarum***”, fue realizado en la unidad de Biotecnología, en la línea de investigación de Agrobiotecnología, en el laboratorio de Cocotero del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del **Dr. Carlos Mariano Oropeza Salín** perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro, dentro de la opción de Biotecnología, y la Codirección del **Dr. Carlos Freddy Ortiz García**, del Colegio de Postgraduados.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 03 de octubre de 2023

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de: Materiales y Métodos, Resultados y Discusión de este documento, proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que, a razón de lo anterior, y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y se registrarán, en todo caso, por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____

Nombre: Augusto Javier Peña Peña

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. Carlos M. Oropeza y codirector Dr. Carlos Fredy Oriz García

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los mexicanos que con el pago de sus impuestos financian al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) quien asigno la beca para la realización de mis estudios de Posgrado.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por permitirme continuar con mi formación profesional como Doctor en Ciencias.

Al Colegio de Postgraduados Campus Tabasco (COLPOS) por las facilidades otorgadas en realizar la estancia de investigación durante la pandemia.

Al Dr. Carlos Oropeza por su apoyo y guía en el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Carlos Fredy Ortiz por las facilidades otorgadas para poder trabajar en su laboratorio y su guía en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr Jhony Enríquez por sus asesorías y observaciones durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Luis Saenz por su tiempo y comentarios durante mi estancia en el CICY.

A la Dra. María Narvaez-Cab por su apoyo técnico en el laboratorio.

A mis compañeros del Laboratorio de Fitopatología del Colegio de Posgraduados (Alejandro Jiménez, Isai Quevedo y Marilyn Izquierdo) por sus apoyo y buenos ratos durante mi estancia de investigación.

A mis compañeros del Laboratorio de Cocotero del CICY (Carmen, Pablo, Nataly, Grecia y Jade) por su amistad en los pocos momentos que compartimos en el laboratorio.

A mi familia en Tabasco (David Palma López, Judith Cancino, David Palma, Edith Castillo, Pablo y Naybi) por recibirme con mucho cariño y las atenciones que tuvieron para mi durante esta estancia.

A mi familia en Sinaloa por su apoyo moral durante este proceso (Cacho, Martita, Richi, Alex, Faby, y a mi abuelita Chilo).

LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS

Artículo

Peña-Peña A.J., Ortiz-Garcia C.F., Enriquez-Vara J.N. Oropeza C. (2023) Occurrence of entomopathogenic fungi in coconut soils, identification, physiological characterization and pathogenicity towards *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Dryophthoridae). Biocontrol Science and Technology. <https://doi.org/10.1080/09583157.2023.2259638>

Capitulo de Libro

Ortiz CF, Ramos E, Silverio C, **Peña-Peña A.J**, Narváez M, Oropeza C. "Pests and diseases affecting coconut". In: "The Coconut: Botany, Production and Uses". S. Adkins, J. Biddle, S. Kalaipandian and A. Bazrafshan (Editors). CABI (<https://www.cabidigitallibrary.org/>) (2023). In press.

Congreso

Augusto Javier Peña-Peña, Carlos Oropeza-Salin, Carlos Fredy Ortiz-Garci, y Jhony Nava Enríquez-Vara (2022). INCIDENCIA DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS ASOCIADOS A PLANTACIONES DE COCOTERO EN LAS COSTAS DE TABASCO. In: Jalareño-Teniente, J., Laureano-Ahuelican.;B.-y-Hernández-Romero., (Edes). Memorias del III Congreso- Nacional de Entomología aplicada realizado del 31 de agosto al-02 de septiembre de 2022 en Oaxtepec, Morelos, México. AMEA.214-217p
https://www.entomologiaaplicada.com/files/ugd/f6b6c4_68eef4f7ecec43b084626114e4466491.pdf

Peña-Peña, A.J., Ortiz-Garcia C.F., Oropeza C. Estrategias y Alternativas Para el Manejo del Picudo de la Palma (*Rhynchophorus palmarum*). En la Expo-Feria Nacional del Coco: Alimentación, Salud y Belleza. Acapulco, Guerrero, México (2019)

DEDICATORIAS

Este trabajo esta dedicado con mucho cariño a la memoria de mi abuelo Gelacio Peña de quien aprendí el valor de los agricultores en el campo mexicano.

A mi esposa Davira Palma por motivarme a ser mejor persona un día la vez.

A mi madre Miroslava Peña quien me obliga ser mejor persona todos los días.

Augusto Peña

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	5
ANTECEDENTES	5
1.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL COCO	5
1.2 RHYNCHOPHORUS PALMARUM.....	5
1.2 1. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA.....	7
1.2 2. CICLO DE VIDA	7
1.3 ENFERMEDAD DEL ANILLO ROJO.....	8
1.4 ESTRATEGIA DE MANEJO.....	8
1.5 ENEMIGOS NATURALES DE <i>RHYNCHOPHORUS PALMARUM</i>	9
1.6 METARHIZIUM	10
1.6.1 FACTORES EDÁFICOS QUE INFLUYEN LA PRESENCIA DE METARHIZIUM.....	12
JUSTIFICACIÓN	15
HIPÓTESIS	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	16
CAPÍTULO II	19
OCCURRENCE OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI IN COCONUT SOILS,	

**IDENTIFICATION, PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION AND PATHOGENICITY
TOWARDS *RHYNCHOPHORUS PALMARUM* (COLEOPTERA: DRYOPHTHORIDAE)..... ¡ERROR!**

MARCADOR NO DEFINIDO.

2.1. INTRODUCTION	19
2.2. MATERIALS AND METHODS	19
2.2.1. SOIL SAMPLING	20
2.2.2. BAITING PROCEDURES.....	22
2.2.3. MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI ISOLATES	23
2.2.4 EFFECT OF TEMPERATURE ON GROWTH OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI ISOLATES.	26
2.2.5. PATHOGENICITY TEST OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI ISOLATES AGAINST TENEBRIO MOLITOR.....	26
2.2.6. PATHOGENICITY TEST OF <i>METARHIZIUM ROBERTSII</i> AGAINST <i>RHYNCHOPHORUS PALMARUM</i>	27
2.2.7. STATISTICAL ANALYSIS.....	28
2.3. RESULTS.....	29
2.3.1. CHARACTERIZATION OF SOIL SAMPLES FROM COCONUT CULTIVATION SITES	29
2.3.2. NATIVE ISOLATES OBTAINED.....	30
2.3.3. MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION	30
2.3.5. PATHOGENICITY OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI ISOLATES AGAINST TENEBRIO MOLITOR.....	35
2.3.6. PATHOGENICITY OF <i>METARRHIZIUM ROBERTSII</i> AGAINST <i>RHYNCHOPHORUS PALMARUM</i>	35

2.4. DISCUSSION	37
CAPÍTULO III	41
DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	41
3.1. DISCUSIÓN	41
3.2. CONCLUSIONES GENERALES	43
3.3. PERSPECTIVAS	43
BIBLIOGRAFÍA.....	45
ANEXO(S)	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figure 2. 1 Location of the sampled area (upper box). Geographic location of sampling sites in Tabasco, Mexico (bottom box)..... 21

Figure 2. 2 A): Distribution based on the main components that relate the morphological characteristics of the isolates obtained B): Dendrogram of the groups formed by the characteristics of the *Metarhizium* strains found in coconut soils. G1= Group 1, G2 = Group two, G3 = Group 3 and G4 = Group four. Location of the sampled area (upper box). Geographic location of sampling sites in Tabasco, Mexico (bottom box)2.3.4. Effect of Temperature on Growth of Entomopathogenic Fungi Isolates..... 32

Figure 2. 3 Dendrogram for *Metarhizium* constructed with the sequences of the ITS region (ITS1- 5.8S-ITS4 of rDNA) based on the Maximum Parsimony method. The numbers in the dendrogram represent the bootstrap values. The sequences used as reference for the phylogenetic placement of the isolates were obtained from the GenBank, the accession numbers are shown. 32

Figure 2. 4 Growth rate of the isolates obtained from the Cárdenas plot. a) Growth rate at 25 °C of the native isolates of *Metarhizium* expressed in mm. b) Growth rate at 30°C of the native isolates of *Metarhizium* expressed in mm. 34

Figure 2. 5 Growth rate of the strains obtained from the Cunduacán plot. a) Growth rate at 25 °C of the native isolates of *Metarhizium* expressed in mm. b) Growth rate at 30°C of the native isolates of *Metarhizium* expressed in mm. 34

Figure 2. 6 Growth rate of the strains obtained from the Cunduacán plot. a) Growth rate at 25 °C of the native isolates of *Metarhizium* expressed in mm. b) Growth rate at 30°C of the native isolates of *Metarhizium* expressed in mm. 35

Figure 2. 7 A) Percentage of cumulative mortality of *R. palmarum* adults at 21 days with the *M. robertsii* strains. B) Mean survival curves of *R. palmarum* exposed to the concentration of 1×10^9 of *M. robertsii* conidia at 21 days. Horizontal line indicates 50% mortality. 36

Figure 2. 8 A) Conidia of *Metarhizium robertsii*. B) *Rhynchophorus palmarum* infected with

strain PAL 731.1. C) Sporulation observed in pygidium of *R. palmarum* D) Sporulation observed in scutellum of *R. palmarum* E) Sporulation observed in the head of *R. palmarum*..... 37

ÍNDICE DE TABLAS

Table 2. 1 List of coconut plantations where the soil was taken for the sampling of entomopathogenic fungi.....	21
Table 2. 2 List of isolates obtained from <i>Metarhizium</i> and sequences for phylogenetic analysis.....	24
Table 2. 3 Distribution of the presence of entomopathogenic fungi, soil properties of the sampled sites and Chi-square analysis.....	29

RESUMEN

Rhynchophorus palmarum es una plaga importante de *Cocos nucifera* en el continente americano. Por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo buscar y caracterizar aislamientos de hongos entomopatógenos para el control de *R. palmarum* en condiciones de laboratorio. Sesenta y tres aislados de *Metarhizium* spp. se obtuvieron de muestras de suelo de diferentes plantaciones de coco en cuatro regiones de Tabasco, México. Los sitios fueron caracterizados edáficamente, y la presencia de *Metarhizium* fue casi nula en los sitios con 90% de arena. Se analizó la región ITS del ADN de once aislados, y *M. robertsii* y *M. anisopliae* s.l. fueron identificados. Se evaluó el crecimiento micelial (MG) de 38 aislados, los cuales fueron incubados a 25°C, 30°C y 35°C en Agar Papa Dextrosa con Levadura durante 14 d. El crecimiento óptimo para algunas cepas fue a 25 °C y 30 °C; para otros, a 35 °C las colonias de MG eran pequeñas (< 1 cm) e irregulares. La patogenicidad de las cepas se evaluó en larvas de *Tenebrio molitor* durante 14 d con una suspensión de 1×10^8 conidios/mL. Todas las cepas fueron patógenas para *T. molitor*. Sin embargo, sólo dos cepas (PAL 231.1, PAL 733.1) identificadas como *M. robertsii* alcanzaron una mortalidad acumulada superior al 60%. Luego, estas dos cepas fueron probadas en adultos de *R. palmarum* durante 21 días con tres concentraciones de conidios (10^7 , 10^8 , 10^9 conidios/mL). A una concentración de 1×10^9 conidios/mL, el aislamiento PAL 733.1 mostro una mayor mortalidad de los adultos del picudo del cocotero en comparación con el aislamiento PAL 231.1. Se encontró una mortalidad acumulada del 60% y LT_{50} a los 17 d para el aislamiento PAL 733.1. Por lo tanto, se propone al aislamiento PAL 733.1 como potencial agente de control microbiano de *R. palmarum*.

ABSTRACT

Rhynchophorus palmarum is a significant pest of *Cocos nucifera* on the American continent. Therefore, this work aimed to search and characterize entomopathogenic fungi isolates to control *R. palmarum* under laboratory conditions. Sixty-three isolates of *Metarhizium* spp. were obtained from soil samples from different coconut plantations in four regions in Tabasco, México. The sites were edaphically characterized, and the presence of *Metarhizium* was almost null in the sites with 90% sand. The ITS region of the DNA of eleven isolates was analysed, and *M. robertsii* and *M. anisopliae* s.l. were identified. The mycelial growth (MG) of 38 isolates was evaluated, which were incubated at 25°C, 30°C, and 35°C on Potato Dextrose Agar with Yeast for 14 d. The optimal growth for some strains was at 25 °C and 30 °C; for others, at 35 °C. The MG colonies were small (< 1 cm) and irregular. The pathogenicity of the strains was evaluated in *Tenebrio molitor* larvae for 14 d with a conidia suspension 10^8 (conidia/mL). All the strains were pathogenic to *T. molitor*. However, only two strains (PAL 231.1, PAL 733.1) identified as *M. robertsii* reached cumulative mortality of over 60%. Then, these two strains were tested in adults of *R. palmarum* for 21 d with three conidia concentrations (10^7 , 10^8 , 10^9 conidia/mL). The suspension 10^9 conidia/mL of PAL 733.1 was the most pathogenic, with cumulative mortality of 60% and LT_{50} at 17 d. Therefore, the strain PAL 733.1 is proposed as a potential biological control agent against *R. palmarum*.

INTRODUCCIÓN

La importancia agronómica del cultivo del coco se debe a las múltiples aplicaciones que puede llegar a tener el fruto del coco que varían desde la obtención de fibras para uso textil, la obtención de combustible entre otros subproductos. En México, el estado de Guerrero es el principal productor de este cultivo a nivel nacional con el 80% de la producción, esto para el año 2021 (SIAP, 2023). Para ese mismo año (2021) se obtuvo una producción de más de 191 mil toneladas de copra (SIAP, 2023). Lamentablemente, la producción de cocos se ve disminuida por las plagas que se presentan.

El picudo negro *Rhynchophorus palmarum* se consideran como una de las principales plagas del cocotero (FAOSTAT, 2022). El daño lo ocasionan las larvas, que se barrenan el tejido interno de la palma (Giblid-Davis, 2006). Además, este insecto se le considera un vector del nematodo *Bursaphelenchus cocophilus* agente causal de la enfermedad anillo rojo, así ambos ocasionan la muerte a las palmas en un lapso de dos a tres meses (Cid del-Prado-Vera *et al.*, 2018). En México, se estima que la producción puede disminuir en un 45% si no se realiza ninguna estrategia de manejo (del-Prado-Vera *et al.*, 2018). El manejo de *R. palmarum* se enfoca en dos estrategias: (a) en la reducción de insectos adultos utilizando trampas con feromona (*Rhynchophorol*) y cebo alimenticio con insecticida (Oehlschlager *et al.*, 2002); (b) en la eliminación de palmas infestadas con larvas (Moscoso-Ramírez, *et al.* 2002). El uso indiscriminado de insecticidas como principal estrategia de control ha ocasionado daños al medio ambiente y a la salud humana. Una alternativa para mitigar estos problemas es el uso de agentes de control biológico microbiano como los hongos entomopatógenos (Khan *et al.*, 2012). La finalidad de utilizar estrategias de control biológico es regular las poblaciones de las plagas de tal manera que la densidad de los insectos no afecte el rendimiento de los cultivos agrícolas sin efectos dañinos para la salud humana y el medio ambiente (Khan *et al.*, 2012).

El género *Metarhizium* son hongos entomopatógenos que tienen un papel ecológico importante en los ecosistemas y agroecosistemas. Actúan como reguladores naturales de las poblaciones de insectos, controlando los brotes de plagas y manteniendo el equilibrio ecológico (Rehner y Kepler 2017). En los agroecosistemas, las especies de *Metarhizium* se emplean como agentes de control biológico, como alternativas ecológicas para el

INTRODUCCIÓN

manejo de plagas. Su modo de acción contra los insectos implica la unión de un conidio a la cutícula seguida de la germinación y penetración de la cutícula, por último, la diseminación interna en el insecto (Vega *et al.*, 2012). El uso de bioinsecticidas a base de *Metarhizium* tiene varias ventajas ecológicas sobre el uso de insecticidas químicos tradicionales como tener una especificidad contra insectos plaga, persistencia en el medio ambiente, y recientemente se ha demostrado que podría ser un promotor del crecimiento de las plantas (Patel, 2020).

Se estima que hay alrededor de 200 especies de *Metarhizium* (Patel, 2020), lo que nos indica de la gran diversidad que este género puede presentar. Para el complejo grupo *M. anisopliae* consta de 14 especies las cuales son crípticas y solo se pueden distinguir con análisis moleculares (Luz *et al.*, 2019; Vega *et al.*, 2012). Estas especies pueden variar en su rango de huéspedes, adaptabilidad ambiental y patogenicidad lo que ofrece oportunidades para el manejo integrado de *R. palmarum*

De manera natural, a *Metarhizium* se puede encontrar en todo el mundo dentro de diferentes hábitats, bosques o tierras de cultivo, sobre insectos muertos o en el suelo cerca de la rizosfera (Rehner y Kepler 2017). Previamente se han obtenido aislamientos de *Metarhizium* en suelos agrícolas (Uzman *et al.*, 2019; Huerta-Ramírez *et al.*, 2018; Hernández-Domínguez *et al.*, 2015;). La incidencia de HE en el suelo puede estar determinada por múltiples factores edáficos como el pH, la humedad relativa, la estructura del suelo, la disponibilidad de nutrientes, la temperatura y los rayos UV (Sharma *et al.*, 2021; Bueno-Pallero *et al.*, 2020; Veta *et al.*, 2012; Quesada-Moraga *et al.*, 2007). Por lo que es necesario estudiar estas características y las adaptaciones ecológicas que pueden tener los aislamientos de cada región para desarrollar estrategias de control microbiano de plagas.

La patogenicidad de HE sobre *R. palmarum* es un aspecto fundamental para su efectividad como agente de control biológico. Se ha reportado la susceptibilidad de *R. palmarum* al hongo *M. anisopliae* (León-Martínez *et al.*, 2019) y *B. bassiana* (Gaviria *et al.*, 2020) con una mortalidad del 100%. Por otro lado, es limitada la información sobre la diversidad de hongos entomopatógenos asociadas a plantaciones de *Cocos nucifera*.

El objetivo de este trabajo, fue estudiar el efecto que tienen algunos factores bióticos y abióticos sobre los hongos entomopatógenos obtenidos de suelos de cocotero en Tabasco y su patogenicidad sobre adultos *R. palmarum*. Como primer paso, se obtuvieron el aislamiento de hongos entomopatógenos de suelos de diferentes plantaciones de cocotero usando la técnica del insecto-cebo trampa y se caracterizaron las propiedades físico-químicas de los sitios muestreados. Los aislamientos se caracterizaron morfológicamente e identificaron mediante la amplificación de la región ITS. Además, se midió el crecimiento *in vitro* de las cepas a diferentes temperaturas en condiciones de laboratorio. También, se evaluó la patogenicidad de las cepas sobre larvas *Tenebrio molitor* en condiciones de laboratorio. Por último, con los aislamientos más virulentas se calculó el TL₅₀ sobre adultos de *R. palmarum* en condiciones de laboratorio.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. Importancia económica del coco

El cultivo de la palma de coco (*Cocos nucifera* L.) es de gran importancia en zonas tropicales, esto se debe a la gran diversidad de subproductos que se pueden obtener de este cultivo. Recientemente, se incrementado el consumo del agua de embotellada de coco, por el interés de la gente en adotar hábitos más saludables, por ejemplo, bebida naturales refrescante sin alto contenido de azúcares sintéticos y sabor natural (Audelo, 2012). De los tejidos del fruto de coco se obtienen fibras para uso textil, la cascara se puede usar como recipiente, de la pulpa se obtienen aceites para la industria de oleoquímicos y la copra. Los troncos y las hojas se emplean para materiales de construcción. Además, las hojas se usan para artesanías (Granados-Sánchez y López-Ríos, 2002). Asimismo, se tiene que mencionar que a partir de aceite de coco se puede obtener biodiesel que, por sus bajos costos de producción y mayor eficiencia energética lo convierten en una alternativa para abastecer las necesidades energéticas de combustibles (Marquínez *et al.*, 2020).

En México, se estima una producción de más de 232 mil toneladas a de copra de coco que representa un valor de producción de más de \$2 mil millones de pesos (SIAP, 2023). Los principales estados productores del cultivo de coco son, Campeche, Colima, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Tabasco y Veracruz, donde podemos resaltar al estado de Guerrero como el estado de mayor productor a nivel nacional, con el 80% de la producción, para el año 2021 (SIAP, 2023). Al igual que ha afectado a productores de palmas ornamentales en México (Murguía-González *et al.*, 2017; Landero-Torres *et al.*, 2015b). Sin embargo, el rendimiento del cultivo del coco se ve mermado por la muerte de palmas debido al ataque de *R. palmarum* (del-Prado-Vera *et al.*, 2018

1.2 *Rhynchophorus palmarum*

Los picudos de las palmas son una de las plagas de mayor importancia agronómica para los productores de coco a nivel mundial. Éstos son escarabajos conocidos, que

pertenece al orden Coleóptera, familia Dryophthoridae y género *Rhynchophorus* con nueve especies de las cuales seis se alimentan de las palmas (Giblin-Davis, 2006). Algunas de las especies de mayor impacto son *Rhynchophorus cruentatus*, *R. phoenicis*, *R. bilineatus*, *R. distinctus*, *R. lobatus*, *R. ritcheri*, *R. ferrugineus*, y *R. palmarum* (Milosalvjevic et al., 2019; Giblin-Davis, 2006). Cada una de estas especies puede llegar a ser un problema en la zona geográfica donde se encuentran, siendo las especies de mayor impacto *R. ferrugineus* nativo del sureste de Asia que ha podido adaptarse a la región del mediterráneo. Mientras que, para el continente americano, *R. palmarum* es el más dañino (Chinchilla, 1992; Gerber y Giblin-Davis, 1990).

A *R. palmarum*, se le conoce con varios nombres comunes dependiendo de la región en la que se encuentre, algunos de estos son: picudo americano de las palmas, picudo negro, picudo del cocotero, gorgojo negro, gorgojo de palma, entre otros. Este escarabajo pertenece al orden Coleóptera, familia Dryophthoridae (Morrone 2000; Watanapongsiri, 1966). Este insecto se desarrolla en los bosques neotropicales y en los agroecosistemas que explotan la palma de coco. Se distribuye a lo largo del continente americano, desde el sureste de California, Texas en EUA, en todo México y Centroamérica, hasta Sudamérica, reportado en países como Argentina, Brasil, y Colombia (García-Hernández et al., 2003). Se alimenta de 35 especies repartida 12 familias diferentes, sin embargo, se encuentran una preferencia por individuos de la familia Arecaceae, siendo los principales hospederos *Cocos nucifera*, *Elaeais guineensis*, *Euterpe edulis*, *Metroxylon sagu*, *Phoenix canarensis* y *Phoenix dactylifera* (Restrepo et al, 1982). Aunque se puede alimentar de otras especies cultivadas como caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), papaya (*Carica papaya*) y mango (*Mangifera indica*) sin llegar a tener mucha relevancia como plaga (Hagley, 1965).

Si bien tradicionalmente *R. palmarum* es considerada una plaga de importancia agronómica, trabajos recientes han destacado los beneficios del uso de *R. palmarum* como insecto comestible (Cerdeira et al., 2001; Choo et al., 2009). Los estudios han demostrado que *R. palmarum* es rico en proteínas, ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales (Cerdeira et al., 2001). Su composición nutricional se compara favorablemente con las fuentes de proteínas convencionales y ofrece beneficios para la salud (Cerdeira et al., 2001). En diferentes culturas de las amazonas han incorporado *R. palmarum* en sus dietas de manera tradicional (Choo et al., 2009).

1.2 1. Descripción morfológica

R. palmarum se caracteriza por tener un cuerpo de color negro, aunque se pueden observar algunas variaciones de color rojo algo semejante al color del picudo rojo *R. ferrugineus*, siendo éstas muy raras (Löhr *et al.*, 2015). Los adultos de *R. palmarum* llegan a medir de 2.9 a 4.4 cm de largo, con una anchura de 1.1 a 1.8 cm con un cuerpo de forma alargado-ovalada. El rostrum es robusto de perfil, ligeramente arqueado en el ápice; en los machos se presentan setas gruesas, erecta (; OEPP/EPPO, 2007; Restrepo *et al.*, 1982; González, 1972; Watanapongsiri, 1966). Los huevos son de color marrón amarillento, liso, brillante, delgado, cilíndrico con extremos redondeados; con un promedio de 0.9 por 2.5 mm es muy pequeño, considerando el tamaño de la hembra adulta. El corion muy fino y hialino; membrana vitelina marrón amarillento. Las larvas con una longitud corporal 4.4 a 5.7 cm, anchura de 2.2 a 2.5 mm. Cuerpo de forma de piriforme, apoda, de color blanco cremoso a marfil, cápsula cefálica de color marrón rojizo a marrón negro brillante. Cuerpo ligeramente curvado. El último instar es de 36 a 47 mm de largo por 15 a 19 mm de ancho (Restrepo *et al.*, 1982; González, 1972; Watanapongsiri, 1966). Las pupas miden de 7 a 9 cm de longitud y de 3 a 4 cm de diámetro. El capullo es de color café, muy característica por estar formada con las fibras de la planta hospedante y al interior revestida por una capa impermeable originada por la solidificación de una mucosidad segregada por la prepupa (Restrepo *et al.*, 1982; González, 1972; Watanapongsiri, 1966).

1.2 2. Ciclo de Vida

Los adultos suelen refugiarse en el cogollo, las axilas de las hojas y las capas de tejido fibroso que envuelven al estipe de las palmas de coco y suelen dispersarse caminando o volado dentro de las plantaciones de cocotero (Watanapongsiri, 1966; González, 1972). La hembra al alimentarse con su rostrum, generan pequeñas cavidades que posteriormente las usan para ovipositar, en el interior de la planta a una profundidad no mayor de 3.25 mm (Giblin-Davis, 2006). Una sola hembra puede llegar a colocar hasta 924 huevos durante toda su vida con un máximo de 63 por día (González, 1972), los cuales necesitan tres días de incubación para eclosionar. Las larvas se desarrollan en el interior de la palma, pasan por 9 estadios larvales los cuales, en conjunto tienen una duración de 60 días (Vásquez-Ordóñez, 2020; Restrepo *et al.*, 1982). Para el estado de

pupa, la larva forma un capullo o cocón con la fibra de la palma, y en su interior transcurre un lapso de 10 a 14 días. Un adulto puede llegar a vivir hasta tres meses (; Rastrepo *et al.*, 1982).

1.3 Enfermedad del Anillo Rojo

El anillo rojo del cocotero es una de las principales enfermedades que daña la producción de cocotero en el continente americano. Esta enfermedad es ocasionada por el nematodo *Bursaphelenchus cocophilus* que es transmitido por el picudo negro (*R. palmarum*) (Chinchilla y Escobar, 2007). La presencia de *B. cocophilus* en las palmas ha sido asociada a un complejo de síntomas que dependiendo de la variedad son los síntomas que se presentan. Algunas palmas presentan un amarillamiento en las hojas más viejas, iniciando de las puntas, sin embargo, está etapa suele ser muy corta, apenas perceptible. Otro síntoma inicial suele ser el necrosamiento de las hojas basales, posteriormente, los síntomas avanzan de manera ascendente a las hojas más jóvenes; las cuales mueren y se desprenden a los pocos días (Moscoso *et al.*, 2002). El marchitamiento continúa de forma ascendente hasta la muerte palma y el colapso del cogollo (Moscoso *et al.*, 2002). Las palmas mueren en un lapso no mayor de 3 meses (Chinchilla, 1992; Salas, 1980). Sin embargo, el síntoma más característico se encuentra internamente en el tallo. Esto lo podemos observar al realizar un corte transversal (altura de 50 a 100 cm) y observar un círculo de 3 cm de espesor de color rojo que rodea la base del tallo (Salas, 1980).

1.4 Estrategia de manejo

Las estrategias para el control de *R. palmarum* implican una combinación de estrategias de manejo (MIP) que apuntan a reducir la población y minimizar el daño causado por esta plaga devastadora. Las siguientes son algunas estrategias comúnmente empleadas para controlar *R. palmarum*:

La implementación de buenas prácticas culturales puede ayudar a prevenir y controlar las infestaciones de *R. palmarum*. Estas prácticas incluyen la eliminación de material vegetal infestado alrededor y en las plantaciones de palma (Moscoso *et al.*, 2002). Para el caso de *R. ferrugineus* y *R. cruentatus* se ha venido desarrollando un sistema de sensores para la detección temprana del ataque en campo, que se basa en la detección vibro-acústica

por el ruido que generan las larvas al masticar los troncos de las palmas (Mankin *et al.*, 2016; Potamitis *et al.*, 2008; Gbemisola *et al.*, 2014). Sin embargo, este tipo de tecnología todavía se encuentra en desarrollo y está fuera del presupuesto de los productores de cocotero en México para aplicarse con *R. palmarum*.

El uso de trampas de feromonas puede ser un método efectivo para monitorear y atrapar a los picudos adultos. El trapeo consiste en la atracción de hembras y machos por las feromonas que generan los machos (Jaffe *et al.*, 1993). Se han identificado los compuestos volátiles de esta feromona como 2(E)-metil-2-hepteno-4-ol que comercialmente se le asignó el nombre de rhynchophorol (Jaffe *et al.*, 1993; Rochat *et al.*, 1991). Tomando en cuenta este comportamiento se han generado trampas que se puede usar con dos fines, el de monitoreo o trapeo masivo (Oehlschlager *et al.* 1993; Oehlschlager *et al.*, 2002). La trampa en su interior contiene un saco liberador el cual está impregnado con la feromona; además, el cebo alimenticio al cual se le aplica un insecticida de contacto (Camino *et al.*, 2000; Sumano *et al.*, 2012). En México, se lleva a cabo en algunos estados una campaña fitosanitaria en las zonas productoras de coco, la cual consiste en un monitoreo constante mediante el uso de trampas tipo CSAT (Camino *et al.*, 2000). Los cebos alimenticios pueden variar dependiendo de la disponibilidad, pero se ha evaluado a la piña, palma, plátano, caña y coco (Landerro-Torres *et al.*, 2015a). Sin embargo, el trapeo masivo por sí solo no está dando los resultados esperados en las costas del Pacífico y los problemas con *R. palmarum* se siguen presentando año tras año, por lo que existe la necesidad de implementar un manejo regional del picudo del cocotero, además, de buscar otras alternativas de manejo.

1.5 Enemigos naturales de *Rhynchophorus palmarum*

El control biológico de *Rhynchophorus palmarum*, involucra el uso de enemigos naturales para disminuir la población de estos insectos. Se han reportado varios enemigos naturales de los que destacan varios parasitoides y diferentes hongos entomopatógenos.

Los parasitoides suelen ser pequeños dípteros o himenópteros. Estos parasitoides ponen sus huevos dentro de las larvas de los picudos, las cuales se desarrollan en el interior del huésped y eventualmente lo matan. *Billaea menezesi* es un parasitoide gregario de *R. palmarum* y se registró en plantaciones de palma aceitera en Brasil con un parasitismo del

50% (Mazza *et al.* 2014). Otro parasitoide que se reporta es *Billaea rhynchophorae* (Blanchard), fue reportada por como parasitoide de *R. palmarum* en Brasil, con un parasitismo promedio de 40% (Moura *et al.*, 2006). Desafortunadamente, la cría masiva de estos parasitoides no fue posible debido a la falta de información sobre su ciclo biológico.

Los hongos entomopatógenos (HE) son microorganismos patógenos principalmente de insectos. Se ha reportado que *R. palmarum* es susceptible a los hongos *M. anisopliae* (León-Martínez *et al.*, 2019), *B. bassiana* (Gaviria *et al.*, 2020) aislamientos de Colombia y Brasil (Lima *et al.*, 2020), con una mortalidad del 100% en condiciones de laboratorio. Lo que los convierte en buenos prospectos para ser considerados agentes de control biológico e implementarse en estrategias de manejo integrado en plantaciones de palma en Latinoamérica. Lamentablemente, es muy escasa la información que se ha desarrollado en México para la implementación de HE y su patogenicidad a *R. palmarum*

1.6 Metarhizium

Los hongos entomopatógenos (HE) son microorganismos entomopatógenos (bacterias, nematodos y virus) que tienen la capacidad de infectar y causar enfermedades a los insectos. Los HE presentan una reproducción sexual y asexual por lo que se les consideran hongos verdaderos, clasificados en cuatro divisiones: *Chytridiomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* y *Ascomycota* (Inglis *et al.*, 2001). Se estima que hay cerca de 700 especies, repartidas en 90 géneros (Roy *et al.*, 2010). El género *Metarhizium* Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) es uno HE de lo más estudiados y usados como agentes de control biológico en todo el mundo (Brunner-Mendoza *et al.*, 2018). Se ha reportado que *Metarhizium* pueden infectar a más de 200 diferentes especies de insectos (St. Leger *et al.*, 1988).

Las principales características morfológicas de *Metarhizium* incluye estados anamórficos que no producen sinemas (Brunner-Mendoza *et al.*, 2018). También, se observan conidióforos ramificados, que llevan de uno a varios fialides que pueden ser truncados o alargados donde se forman los conidios en cadenas densas y adheridas unas con otras (Islam *et al.*, 2021). En un inicio, los conidios son hialinos, al madurar cambian a un color verde oscuro, o marron (Islam *et al.*, 2021). Estas estructuras varían en forma (cilíndrica,

globosa, elipsoidal) y tamaño de 4,0 a 14,5µm × 2,0 a 5,0 µm (Brunner-Mendoza *et al.*, 2018). Los conidios suelen ser las únicas características morfológicas distintivas de este género; sin embargo, la morfología de los conidios es críptica entre especies estrechamente relacionadas (Brunner-Mendoza *et al.*, 2018). Las tres principales especies de este género son *M. album*, *M. flavoviride* y *M. anisopliae*. Recientemente se ha señalado de que *M. anisopliae* es parte de un complejo de 14 especies (*M. pingshaense*, *M. anisopliae s.str.*, *M. robertsii*, *M. brunneum*, *M. acridum*, *M. globosum*, *M. guizhouense*, *M. indigoticum*, *M. majus*, *M. lepidiotae*, *M. kalasinense*, *M. alvesii*, *M. baoshanense* y *M. humberi*) morfológicamente idénticas y solo se pueden diferenciar con análisis de secuencia de ADN (Luz *et al.*, 2019; Vega *et al.*, 2012).

El modelo general del proceso de infección de los HE sobre los insectos podría resumirse en la adherencia y germinación de los conidios, degradación de la cutícula y la respuesta del insecto a la infección. El proceso de infección inicia cuando los conidios de los HE se adhieren a la cutícula del insecto. Se ha reportado que para *M. anisopliae* la proteína MAD1 es la responsable de la capacidad de adherirse a los insectos (Vega *et al.*, 2012). Para considerar la germinación de los conidios, estos desarrollan un tubo germinativo. Hay diversos factores que pueden influir en la germinación como la temperatura y la humedad, los factores nutricionales, químicos y físicos (Vega *et al.*, 2012). La mayoría de los HE requieren una humedad superior del 90% para germinación (Brunner-Mendoza *et al.*, 2018). Después de la germinación, se genera el apresorio que se fija sobre la epicutícula del insecto. El apresorio es la estructura del hongo desde la cual se produce la penetración en el insecto a través de una clavija de penetración. Para el caso de *M. anisopliae*, *M. rileyi* se ha reportado que producen mucílago durante la formación del tubo germinativo; se cree que ayuda en la adhesión a la cutícula (Boucias y Pendland, 1991). En el proceso de la degradación de la cutícula del insecto se da a través de la acción mecánica (presión hifal) y enzimática (lipasas, proteasas y quitinasas), degradan la cutícula y se produce un microporo que avanza hacia el interior del insecto (Güerri-Argulló *et al.*, 2010; Pucheta *et al.*, 2006). Para el caso de *Metarhizium* se generan una gran cantidad de proteasas de las que sobresale la Pr1 (Brunner-Mendoza *et al.*, 2018). Una vez que el HE se encuentra en el interior del insecto, la hifa del hongo cambia su estructura a blastosporas, las cuales se distribuyen en la hemolinfa, lo que facilita que el hongo invada otros tejidos mediante el crecimiento vegetativo. Esto último, activa los

mecanismos de defensa del insecto como la producción de fenoloxidasas, y la activación de hemocitos que liberan bioactivos y logran la fagocitosis y la encapsulación para combatir al hongo (Brunner-Mendoza *et al.*, 2018). Para el caso de *Metarhizium*, se ha reportado que producen una gran variedad de metabolitos secundarios (destruxinas) que facilitan el proceso patogénico, que inducen parálisis flácida, provocando alteraciones celulares y mal funcionamiento del intestino medio, túbulos de malpighi y tejidos musculares (Brunner-Mendoza *et al.*, 2018). Con la muerte del insecto, los HE tienen la capacidad de degradar la cutícula del insecto y salir al exterior donde continúa su desarrollo de forma saprofita en los cadáveres y produce rápidamente conidios para su dispersión e infectar a otros insectos (Güerri-Argulló *et al.*, 2010; Pucheta *et al.*, 2006).

El rol ecológico de *Metarhizium* es más amplio que solo la interacción hongo-insecto, también hay otros factores que juegan un papel muy importante el medio ambiente que los rodea. Se han documentado la ocurrencia natural de *Metarhizium* en diversos hábitats a nivel mundial, donde factores edáficos influyen para la persistencia (de esto se desarrolla más a detalle en la siguiente sección). Además, las asociaciones de *Metarhizium* con las raíces de son evidencia interacciones endófitas que promueven el crecimiento en diversas plantas como: árboles, arbustos, pastos, plantas de ornato y de cultivo agrícolas (Litwin *et al.*, 2020). Se ha demostrado que *M. robertsii* aportan a las plantas nitrógeno que es asimilado durante el proceso de parasitación de insectos (Behie y Bidochka, 2014). Por lo que, todavía hay mucho por explorar para utilizar a *Metarhizium* como un biofertilizante.

1.6.1 Factores edáficos que influyen la presencia de *Metarhizium*

De manera general, las especies del género *Metarhizium* se encuentran en el suelo, sobreviviendo como saprofitos de vida libre, viviendo en la rizosfera, o en el interior de las plantas y parasitando insectos (Brunner-Mendoza *et al.*, 2018). La presencia de los HE en el suelo puede estar determinada por múltiples factores edáficos: como el pH, el contenido de humedad, la textura del suelo, el contenido de Materia orgánica (MO), la disponibilidad de nutrientes y la temperatura (Quesada-Moraga *et al.*, 2007; Bueno-Pallero *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2021).

Los hongos del género *Metarhizium* exhiben diferentes tolerancias a los niveles de pH del suelo. El rango de pH óptimo para el crecimiento y la actividad de *Metarhizium* generalmente se encuentra entre 5,5 y 8,0 (Hallsworth y Megan, 1966). Esto implica que los HE tienen la capacidad de regular el pH citosólico con mayor eficacia que otros hongos (Hallsworth y Megan, 1966).

La humedad juega un papel vital en la supervivencia, de *Metarhizium*. Se requiere un nivel alto de humedad para la germinación de conidios sobre la cutícula de los insectos (Cheong and Azmi, 2020), para el crecimiento y desarrollo de las hifas y para la esporulación sobre los cadáveres (Vega *et al.*, 2012).

La textura del suelo influye en las propiedades físicas del suelo y esto puede afectar la presencia de *Metarhizium*. Los suelos con una textura arcillosa es un predictor positivo en la detección de *Metarhizium* spp., mientras que el contenido de arena es un predictor negativo (Quesada-Moraga *et al.*, 2007; Randhawa *et al.*, 2018).

El contenido de materia orgánica en el suelo tiene una influencia positiva en la supervivencia y actividad de *Metarhizium*. La materia orgánica proporciona un sustrato rico en nutrientes para el crecimiento de hongos y sirve como fuente de carbono y energía (Kallebach *et al.*, 2016). Altos contenidos de materia orgánica (MO) (superior al 8%) puede reducir la incidencia de *Metarhizium* spp en suelo debido a la competencia con otros hongos saprofitos (Meyling y Eilenberg, 2007). Se ha reportado que en suelos con un contenido de MO superior al 4% inhibió la presencia de *M. robertsii* (Sharma *et al.*, 2021), y esto podría deberse a la presencia de hongos saprofitos que son más eficientes en aprovechar los recursos en comparación con *Metarhizium* (Meyling y Eilenberg, 2007).

La disponibilidad de nutrientes esenciales, como la relación de C:N, y el Ca, en el suelo puede afectar la colonización y la actividad de *Metarhizium*. Se ha reportado que altos valores en la relación de C:N favorece la presencia de *Metarhizium* en el suelo (Uzman *et al.*, 2018). En condiciones de laboratorio, se ha demostrado que una relación C:N amplia puede promover el crecimiento y la esporulación de HE (Uzman *et al.*, 2018). El calcio podría estar jugando un papel importante en la prevalencia de *Metarhizium* ya que se ha informado que este elemento está fuertemente asociado con la presencia de *M. robertsii* (Randhawa *et al.*, 2018).

La temperatura es un factor edáfico crítico que afecta el crecimiento y la actividad de *Metarhizium*. Generalmente, las especies de *Metarhizium* prosperan en regiones tropicales y subtropicales donde las temperaturas son cálidas (alrededor de 20-30°C). Sin embargo, se ha reportado que aislamientos de *M. anisopliae* obtenidos de Ontario, Canada pudieron germinar y crecer a 8°C (De Croos y Bidochka, 1999). Por otro lado, aislamientos de *M. robertsii* de muestras de suelo en Brasil tuvieron una tasa de germinación cercana al 100 % a 40 °C (Mesquita *et al.*, 2020). A nivel fisiológico, se ha reportado que las proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés) son las encargadas de mejorar la tolerancia al calor y otros estreses abióticos en *M. robertsii* (Liao *et al.*, 2014).

Los rayos UV son una limitante importante para la supervivencia de *Metarhizium* en el suelo. El daño ocasionado por la luz ultravioleta se debe a las fotorreacciones de los ácidos nucleicos, las proteínas, los lípidos y las membranas (Vega *et al.*, 2012). Además, la exposición a la radiación UV puede causar alteraciones fisiológicas o genéticas que reducen la virulencia (Vega *et al.*, 2012). Los conidios son muy susceptibles a los rayos UVB, sin embargo, la pigmentación puede influir en la tolerancia a la radiación solar, siendo los conidios con una mayor pigmentados los más tolerantes (Braga *et al.*, 2006). Se ha reportado que las cepas de *Metarhizium* pueden formar microesclerocios (pequeñas estructuras formadas en hifas melanizadas) como mecanismo de adaptación al estrés causado los rayos UV y otros factores abióticos (Paixao *et al.*, 2021).

Las prácticas culturales en el manejo del suelo agrícolas como el barbecho, que voltear el suelo disminuye la densidad y diversidad de los HE; ya que exponen a los rayos aquellos hongos que se encuentren en la zona labrable (Meyling y Eilenberg, 2007). A pesar de esto último, se han colectado aislamientos de HE en suelos agrícolas asociados a diversos cultivos (Uzman *et al.*, 2019; Huerta-Ramírez *et al.*, 2018; Hernández-Domínguez *et al.*, 2015).

JUSTIFICACIÓN

El cultivo de la palma de coco es de gran importancia económica para México; sin embargo, la población de palmas se ve afectada por el picudo negro como vector del nematodo *Bursaphelenchus cocophilus* y causante de la enfermedad del anillo rojo, que puede llegar a ocasionar una mortalidad de hasta el 80% en plantaciones jóvenes de cocotero híbridos y ecotipos de alto. La principal estrategia de control para el picudo se basa en la reducción de las poblaciones de insectos adultos mediante el uso de trampas con feromona y cebos alimenticios envenenados y las aplicaciones de insecticidas sobre las plantaciones. Se ha reportado que el uso irracional de los insecticidas expone peligros para la salud humana y el medio ambiente. Por lo anterior, es necesario generar otras alternativas que coadyuvar a la resolución de dicho problema. Por otro lado, se sabe que los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de matar a los insectos y se han utilizado en estrategia de manejo de plagas en otros cultivos, por lo que es importante identificar cepas de hongos con potencial entomopatógeno los picudos (*R. palmarum*) para desarrollar nuevas estrategias sustentables que fortalezcan el manejo integrado del complejo anillo rojo-picudo. Por lo que se plantea contar con cepas de hongos HE endémicos de cocotero, a partir de muestras de suelo de las principales regiones cocoteras de Tabasco; evaluar su patogenicidad, de dichas cepas hacia *R. palmarum*.

HIPÓTESIS

La presencia de hongos entomopatógenos nativos de suelos de cocotero en Tabasco, México se ve afectada por diversos factores bióticos y abióticos. Los cuales tienen alto potencial patogénico sobre adultos de *R. palmarum*.

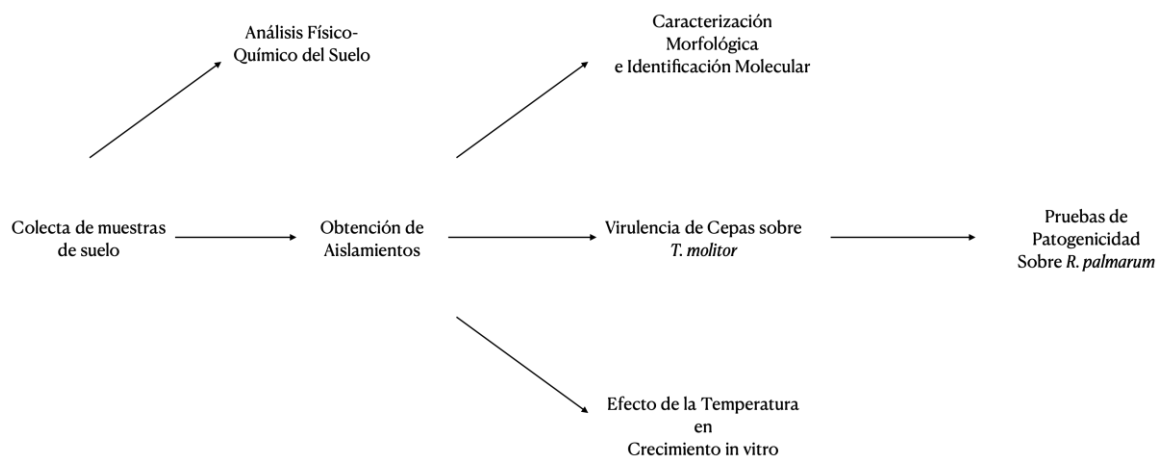
OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto que tienen algunos factores bióticos y abióticos sobre los hongos entomopatógenos obtenidos de suelos de cocotero en Tabasco y su patogenicidad sobre adultos *R. palmarum*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Búsqueda y aislamiento de hongos entomopatógenos de suelos de diferentes plantaciones de cocotero y caracterización de las propiedades físico-químicas de los suelos.
- Caracterización de los aislamientos de hongos entomopatógenos mediante la morfología de las colonias e identificación morfológica y molecular de los hongos obtenidos.
- Determinar el crecimiento *in vitro* de los aislamientos obtenidos a diferentes temperaturas en condiciones de laboratorio.
- Evaluar la patogenicidad de los aislamientos de los hongos entomopatógenos sobre larvas *Tenebrio molitor* en condiciones de laboratorio.
- Evaluar la patogenicidad y el tiempo letal cincuenta (TL₅₀) de las cepas de hongos entomopatógenos sobre adultos de *R. palmarum* en condiciones de laboratorio.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Peña-Peña A.J., Ortiz-Garcia C.F., Enriquez-Vara J.N. Oropeza C. (2023) Occurrence of entomopathogenic fungi in coconut soils, identification, physiological characterization and pathogenicity towards *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Dryophthoridae). *Biocontrol Science and Technology*. <https://doi.org/10.1080/09583157.2023.2259638> **Published**

CAPÍTULO II

Occurrence of entomopathogenic fungi in coconut soils, identification, physiological characterisation and pathogenicity towards *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Dryophthoridae)

2.1. Introduction

Coconut and oil palm plantations face a significant threat from the *Rhynchophorus palmarum* weevil (Coleoptera: Dryophthoridae), which can cause substantial losses of up to 45% in coconut plantations (del Prado-Vera *et al.*, 2018) and 35% in oil palm crops (Aldana *et al.*, 2010). *R. palmarum* is known as the South American Palm weevil. Its distribution includes southern states of the United States, México, Central and South America, and the Caribbean. For this reason, the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) listed this insect as quarantine pest A1 (exotic pest absent from EPPO region) (EPPO, 2023). The damage inflicted by *R. palmarum* is due to the larvae feeding and developing within the trunk tissues of palms and can kill severely affected trees (CABI, 2020). Furthermore, the weevil serves as a vector for the nematode *Bursaphelenchus cocophilus*, causing coconut red ring disease, which can also be lethal (del Prado-Vera *et al.*, 2018) and represents a phytosanitary challenge for coconut and oil palm producers in Latin America and the Caribbean (Medina *et al.*, 2019). The integrated pest management approach proposed for *R. palmarum* includes (a) reducing the adult weevil population with pheromone traps (Rhynchophorol) and an insecticide-laden food bait (Oehlschlager *et al.*, 2002); (b) early detection of larval infestations; and (c) removing and eliminating infested palms (Moscoso-Ramírez *et al.*, 2002).

The genus *Metarhizium* Sorokīn (Hypocreales: Clavicipitaceae) has proven to be a valuable tool for the biological control of pests. With more than 50 species, some of which can only be distinguished through DNA sequence analysis (Mongkolsamrit *et al.*, 2020). *Metarhizium*

Peña-Peña A.J., Ortiz-García C.F., Enriquez-Vara J.N. Oropeza C. (2023) Occurrence of entomopathogenic fungi in coconut soils, identification, physiological characterization and pathogenicity towards *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Dryophthoridae). *Biocontrol Science and Technology*. <https://doi.org/10.1080/09583157.2023.2259638> **Published**

CAPÍTULO II

is found in various habitats worldwide, including forests, farmland, and dead insects, mostly occurring in the soil rhizosphere (Rehner and Kepler, 2017). The incidence of *Metarhizium* spp. in the soil is influenced by multiple edaphic factors (Uzman *et al.*, 2019). The presence and diversity of the genus *Metarhizium* in different types of tropical agroecosystems have been well-documented (Hernández-Domínguez *et al.*, 2015; Luz *et al.*, 2019). Native *Metarhizium* isolates in a region may possess adaptive advantages over introduced strains, as they have evolved in response to various biotic and abiotic factors typical of the local ecosystem (Skalicky *et al.*, 2014).

Regarding the use of EPF for controlling *R. palmarum*, previous studies have reported susceptibility to fungi such as *Metarhizium anisopliae* (León-Martínez *et al.*, 2019), *Beauveria bassiana* (Gaviria *et al.*, 2020) isolated in Colombia. However, there are no reports using EPF on *R. palmarum* or the isolation of EPF from soils associated with coconut cultivation in Mexico. The objective of the present study was to obtain and characterize EPF isolates from soils where coconut is cultivated in Tabasco, Mexico, and to evaluate their pathogenicity towards *R. palmarum*.

2.2. Materials and Methods

2.2.1. Soil Sampling

The study encompassed four sampling sites in Cunduacán, Cárdenas, Paraíso, and Centla, representing coconut plantations. In Cunduacán, the specific site was "Los Pinos," situated at 18° 05 '45.2"N, 93° 20' 12.1" W, covering an area of 70 hectares and housing 17-year-old coconut palms. The remaining three plantations were situated in the municipalities of Cárdenas (18°14'30.6"N, 94°00'10.5"W), Paraíso (18°25'34"N, 93°24'12.071"W), and Centla (18°25'03.0"N, 92°59'24.5"W), each spanning an area of five hectares. All plantations were exclusively dedicated to commercial coconut water production (Figure 1) (Table 1).

Soil sampling was conducted from November 2020 to February 2021. Ten sampling spots were chosen in each site, ensuring a minimum distance of 20 meters between each spot. A soil sampling auger was used to collect 1 kg of soil from reaching a depth of 15 cm. The collected soil was stored in a refrigerator for preservation. The soil sampling auger was thoroughly washed with 5% sodium hypochlorite (NaOCl) between each sample (Zimmerman, 1986).

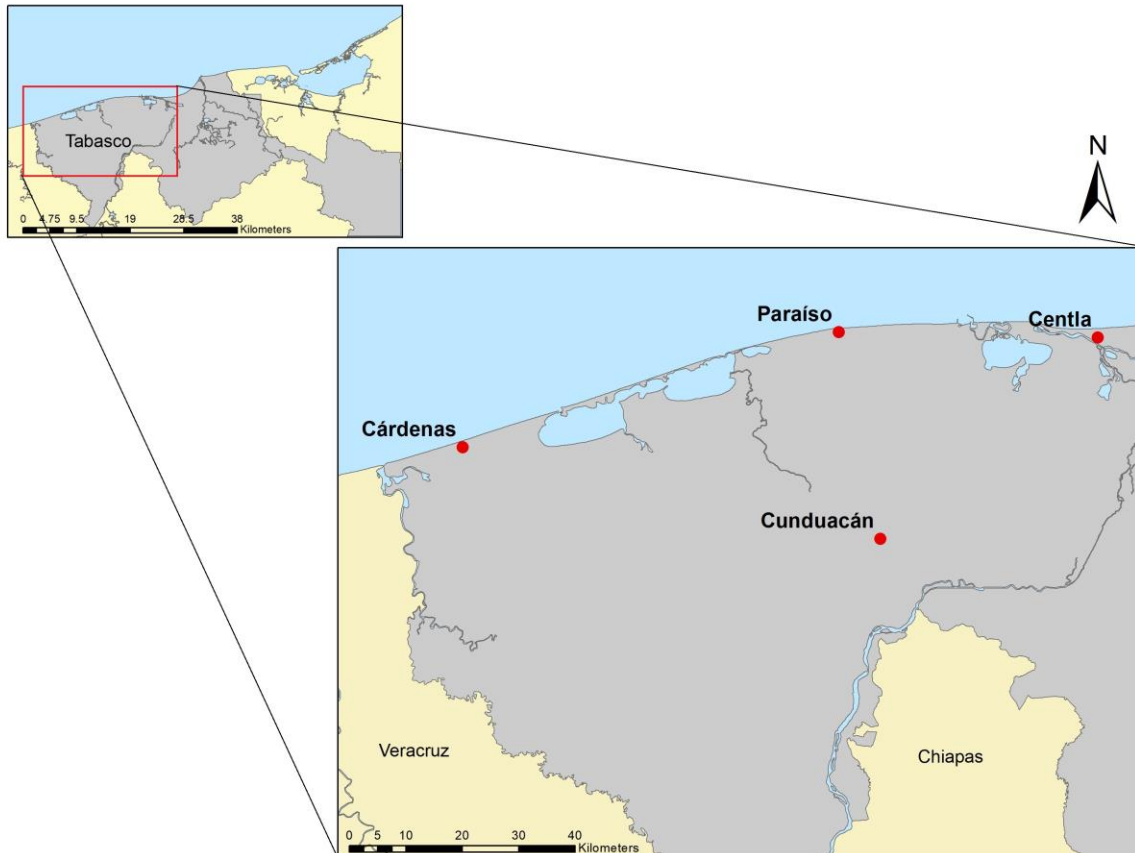


Figure 2. 1 Location of the sampled area (upper box). Geographic location of sampling sites in Tabasco, Mexico (bottom box)

Table 2. 1 List of coconut plantations where the soil was taken for the sampling of entomopathogenic fungi

Sampling sites	Geographic location	Palm variety	Sampling date	Alternative Land Use	Use of agrochemicals	Plantation area	Age in years of

Peña-Peña A.J., Ortiz-Garcia C.F., Enriquez-Vara J.N. Oropeza C. (2023) Occurrence of entomopathogenic fungi in coconut soils, identification, physiological characterization and pathogenicity towards *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Dryophthoridae). *Biocontrol Science and Technology*. <https://doi.org/10.1080/09583157.2023.2259638> **Published**

CAPÍTULO II

							plantati on
Cunduacá n	18°05'45"N 93°20'12"W	Amarillo Enano	Oct 2020	Pasture	No	40 ha	17
Centla	18°25'03"N 92°59'24"W	Chactem al	Ene 2021	Only palms	No	5 ha	15
Paraíso	18°25'34"N 93°24'12"W	Chactem al	Feb2021	Pasture	Fertilizer	5 ha	15
Cárdenas	18°14'30"N 94°00'10"W	Chactem al	Nov 2020	Only palms	Fertilizer	5 ha	14

2.2.2. Baiting Procedures

The fungi were isolated from the soil samples using mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) (Zimmerman, 1986). The larvae were sourced from PETMMAL S.A. de C.V. (Cuautitlán Izcalli, México). Before introducing the larvae, the soil samples were dried at 35°C for one week to reduce excess moisture, eliminate the presence of entomopathogenic nematodes, and improve sample handling. From each sampled spot, 5 subsamples of 100 g of sieved soil were collected (placed in a 500 mL transparent plastic container with a lid), and 10 fifth instar *T. molitor* larvae were introduced into each container. The containers were incubated at 25°C in complete darkness. Mortality was recorded daily for 14 days. Larvae with signs of mycosis were removed from the jar and externally disinfected using 20 mL of 70% v/v alcohol for one minute, followed by immersion in 20 mL of 5% v/v sodium hypochlorite solution for one minute and rinsed three times in sterile distilled water (Huerta-Ramírez *et al.*, 2018).

The washed larvae (corpses) were sliced and placed in Petri dishes with agar culture medium (BD Bioxon®), enriched with 1% yeast extract (BD Bioxon®) (PDAY). They were then incubated at 27°C in the dark for 10 days. Larvae showing mycelial growth were used to estimate fungal incidence for each sampling site. The shape of the mycelium and the conidia of all monosporic strains were observed under a compound microscope (Motic® BA3120), and identification at the genus level was carried out based on morphological characteristics using the taxonomic keys of Humber (2012). The isolates obtained were preserved in silica gel with skim milk at 4°C (Silva *et al.*, 2017) and deposited in the collection of the Phytopathology Laboratory of the Tabasco Campus Postgraduate College, México. After fungal isolation, 500g of the remaining soil from each sample was sent to the Soil Laboratory of the Tabasco Campus of Colegio de Postgraduados, México, where several parameters including pH, electrical conductivity (EC), organic matter (OM), nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), and texture were assessed, following prior methods (SEMARNAT, 2002).

2.2.3. Morphological Characterization and Molecular Identification of Entomopathogenic Fungi Isolates

To avoid duplicity of data, in sites where more than two isolates per subsample were obtained, we considered a maximum of two isolates for testing. A 5-mm diameter fragment was taken from one-week-old colonies and placed in the center of a 60-mm Petri dish with 5 mL of PDAY culture medium. Each strain was then incubated at 25°C in total darkness for 21 days. The morphological descriptions of the colonies included characteristics such as the type and texture of the mycelium, colony color, border type, sporulation capacity, and presence of exudates (Fernandes *et al.*, 2010). The sporulation capacity concentration was determined using a hemocytometer. Based on this information, a multivariate analysis was performed with the R Software (R Core Team, 2020). A Principal Component Analysis (PCA) was made to observe the distribution of the characterized strains, and a Hierarchical Cluster Analysis (HCA) was made to distinguish groups to select representative isolates from each group and perform molecular identification (Arrazate-Argueta *et al.*, 2019)

The molecular identification of the isolates was carried out at the National Laboratory of Genomics for Biodiversity (Langebio) in CINVESTAV, Irapuato, Guanajuato. DNA extraction was performed from three-week-old colonies, and PCR amplification of the ITS region was conducted using the primer set ITS1 forward (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') and ITS4 reverse (5'

Peña-Peña A.J., Ortiz-Garcia C.F., Enriquez-Vara J.N. Oropeza C. (2023) Occurrence of entomopathogenic fungi in coconut soils, identification, physiological characterization and pathogenicity towards *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Dryophthoridae). *Biocontrol Science and Technology*. <https://doi.org/10.1080/09583157.2023.2259638> **Published**

CAPÍTULO II

TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White *et al.*, 1990), followed by bidirectional sequencing of the uncloned PCR product.

For the phylogenetic analysis of *Metarhizium*, 21 strains were used: the two most pathogenic against *T. molitor* (PAL 733.1 and PAL 231.1), nine from the grouping obtained in the principal components analysis (PAR 631.1, PIN941.1, PIN541.1, PAL712.1, PAL733.1, PAL123.1, PAL231.1, PAL731.1, PIN521.1, PAL233.1, and PIN841.1), and ten more included for comparison (Table 2). All sequences were edited and assembled using the BioEdit program (Hall, 1999). Multiple alignments were performed with Muscle in MEGA X 10.2.4, and data analysis was conducted using Maximum Parsimony (MP). The consensus tree's Bootstrap with 1000 replicates was performed to determine the percentage of replicates associated with the taxa, and the Bootstrap test consisted of 1000 replicates. The MEGA X 10.2.4 program (Tamura *et al.*, 2001) was used for this analysis.

Table 2. 2 List of isolates obtained from *Metarhizium* and sequences for phylogenetic analysis

Species	Strain	Insect Host	Geographic origin	ITS GenBank
<i>Metarhizium Robertsii</i>	PAR631.1	<i>T. molitor</i>	Paraíso, Tabasco, México	OQ566181
“ ”	PIN941.1	“ ”	Cunduacán, Tabasco, México	OQ566182

“ ”	PIN541.1	“ ”	Cunduacán, Tabasco, México	OQ566183
“ ”	PAL712.1	“ ”	Cardenas, Tabasco, México	OQ566184
“ ”	PAL733.1	“ ”	Cardenas, Tabasco, México	OQ566185
“ ”	PAL23.1	“ ”	Cardenas, Tabasco, México	OQ566186
“ ”	PAL231.1	“ ”	Cardenas, Tabasco, México	OQ566187
“ ”	PAL731.1	“ ”	Cardenas, Tabasco, México	OQ566188
<i>M. anisopliae</i>	PIN521.1	“ ”	Cunduacán, Tabasco, México	OQ566289
“ ”	PAL233.1	“ ”	Cardenas, Tabasco, México	OQ566290
“ ”	PIN841.1	“ ”	Cunduacán, Tabasco, México	OQ566291

Peña-Peña A.J., Ortiz-Garcia C.F., Enriquez-Vara J.N. Oropeza C. (2023) Occurrence of entomopathogenic fungi in coconut soils, identification, physiological characterization and pathogenicity towards *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Dryophthoridae). *Biocontrol Science and Technology*. <https://doi.org/10.1080/09583157.2023.2259638> **Published**

CAPÍTULO II

<i>Metarhizium anisopliae</i>			Malasia	KX809518.1
<i>Metarhizium acridum</i>		<i>Ornithacris cavroisi</i>	Nigeria	AF137062.1
<i>Metarhizium lepidiotum</i>		<i>Lepidiota consobrina</i>	Australia	AF137065.1
<i>Metarhizium album</i>		<i>Nephotettix virescens</i>	Filipinas	AF137067.1
<i>Metarhizium flavoviridae</i>		<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	Francia	AF138267.1
<i>Metarhizium pemphigum</i>		<i>Pemphigus treherni</i>	Reino Unido	AF139850.1
<i>Metarhizium novozealandicum</i>		Lepidoptera	Nueva Zelanda	AF139851.1
<i>Metarhizium Robertsii</i>		Endophytic banana	India	MT111568.1
“ ”		<i>Odoiporus longicollis</i>	India	MN892393.1
<i>Beauveria bassiana</i>		Stored Grain Insects	Kenia	AJ560672.1

2.2.4 Effect of Temperature on Growth of Entomopathogenic Fungi Isolates.

In this experiment, we evaluated the mycelial growth at temperatures above 25°C to determine the tolerance of the strains to high temperatures, as commonly found in tropical areas. The same monosporic strains mentioned earlier were used for this assessment. A 5-mm diameter fragment was taken from the periphery of one-week-old colonies and placed at the center of a new 60-mm Petri dish containing 5 mL of PDAY culture medium. Five dishes per strain were randomly incubated at 25, 30, and 35 ± 1°C in complete darkness. Mycelial growth (MG) was measured every 24 hours for a duration of 21 days using two perpendicular radii drawn on the back of the Petri dish (Dimbi *et al.*, 2004). The test was concluded when one of the colonies reached the edge of the Petri dish.

2.2.5. Pathogenicity Test of Entomopathogenic Fungi Isolates Against *Tenebrio molitor*

This bioassay aimed to determine the pathogenic capacity of the most aggressive strains using a 10⁸ conidia suspension on *T. molitor* mealworm larvae as a biological model (Chang *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2018). Conidial suspensions were obtained from 21-day-old colonies that developed in Petri dishes containing 20 mL of PDAY and were incubated at 25°C in complete darkness, using the same monosporic strains mentioned above. After 21 days, conidia were collected from the colonies using a sterile scalpel and placed in a sterile 50 mL volume tube containing 10 mL of 0.03% Tween 80. The suspension was vortexed for 5 minutes and filtered through a sterile cloth into a new sterile centrifuge tube. Conidia concentrations were counted using a hemocytometer, adjusted to the required concentration, and kept at 4°C until application. For the experiment, larvae were obtained from PETMMAL S.A. de C.V. (Cuautitlán Izcalli, México). The pathogenicity test followed a completely randomized experimental design with four replications, using 10 fifth instar larvae of *T. molitor* as an experimental unit. Inoculation of the insects was done by immersing them for 30 seconds in a suspension with a concentration of 10⁸ conidia/mL. The control treatment consisted of sterile distilled water with 0.05% Tween 80. The inoculated larvae were placed in plastic containers (7.1 × 5.3 × 3.4 cm) with lids, and 10 g of sterile wheat bran was added as a food source. They were kept at 25°C in complete darkness, and mortality was recorded every 24 hours for 15 days (Gaviria *et al.*, 2020). At the end of the experiment, the dead larvae were kept at 4°C, disinfected in a 6% chlorine solution for one minute, rinsed three times in sterile distilled water, and each larva was cut into slices with a scalpel. One slice per larva was placed in a PDAY culture medium and observed at 72 hours to

Peña-Peña A.J., Ortiz-García C.F., Enriquez-Vara J.N. Oropeza C. (2023) Occurrence of entomopathogenic fungi in coconut soils, identification, physiological characterization and pathogenicity towards *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Dryophthoridae). *Biocontrol Science and Technology*. <https://doi.org/10.1080/09583157.2023.2259638> **Published**

CAPÍTULO II

confirm infection (Huerta-Ramírez *et al.*, 2018). Larvae without mycelial growth were not counted as part of the mortality. This experiment was repeated three times for validation.

2.2.6. Pathogenicity Test of *Metarhizium robertsii* Against *Rhynchophorus palmarum*

The pathogenicity test was conducted on the PAL 733.1 and PAL 231.1 strains because they exhibited the highest pathogenic capacity against *T. molitor* in previous experiments. To initiate the test, adult *R. palmarum* beetles were captured from the coconut plantation "Los Pinos" using traps baited with pheromone (Rhynchophorol) and banana slices (Moscoso-Ramírez *et al.*, 2002) without insecticide. The traps were checked weekly to collect the insects, which were then transferred to the laboratory and individually placed in plastic containers (7.1 × 5.3 × 3.4 cm). Before starting the bioassays, the insects were kept in complete darkness at 25°C with a 12-hour photoperiod and 70% humidity for 14 days and provided with banana slices as a food source (Lima *et al.*, 2020). The conidial suspension (10⁷, 10⁸, 10⁹ conidia/mL) was prepared following the same methodology used in the previous experiments. Only healthy *R. palmarum* insects, approximately 4 cm long, that survived the quarantine period and showed no signs of damage were selected for the test. The control treatment consisted of sterile distilled water with 0.05% Tween 80. Each treatment involved the immersion of 10 insects in the corresponding conidial suspension for 60 seconds (Lima *et al.*, 2020). After immersion, the adult beetles were individually placed in 25 mL plastic containers with banana slices and kept in complete darkness at 25°C. Mortality was recorded every third day for 21 days. Deceased adults were disinfected in 5% chlorine for one minute, followed by a triple wash in sterile distilled water. The beetles were then placed on moist cotton with sterile water inside a sealed Petri dish. Only those insects showing signs of sporulation were considered for mortality calculations. The experiment was replicated three times using a completely randomized design (Gaviria *et al.*, 2020).

2.2.7. Statistical Analysis

To assess the potential differences between the sampled sites and the number of mycosated larvae observed, a Chi-Square analysis was performed using the R software (R Core Team, 2020). Ordinal values were assigned to specific characteristics for the morphological characterization of the growth of the 38 strains' colonies. The texture correspondence for the colony was categorized as follows: 1 for cottony, 2 for velvety, and 3 for smooth. The color was divided into 1 brownish green, 2 dark green, 3 light green, 4 white, and 5 yellow. The border of the colony was defined as 1 white and 2 cottony. The presence of exudates in the colony was divided into 1 absent and 2 present. The conidia were collected from the colonies using a sterile scalpel and placed in a sterile 5 mL volume tube containing 1 mL of 0.03% Tween 80 and quantified from a conidial suspension using a hemocytometer to estimate the conidia/mL and categorized as 1 low ($<1^6$), 2 medium (1^6 - 2^6) and 3 high ($>2^6$). The data were then subjected to principal component analysis (APC) and hierarchical clustering analysis (HCA) (Arrazate-Argueta *et al.*, 2019).

The mycelial growth (MG) data were analyzed separately for each variable. The MG experiments were conducted with a completely randomized design, involving five repetitions per treatment, with each Petri dish serving as an experimental unit. This resulted in 38 treatments, corresponding to each of the strains (Arrazate-Argueta *et al.*, 2019). A specific model was designed for each temperature, considering measurements from the first day until one of the strains reached the edge of the Petri dish. The data were analyzed using ANOVA, mean separation test (Tukey, $\alpha = 0.05$), and linear modeling with the R software (R Core Team, 2020).

The Abbott formula was applied to calculate the percentage of mortality of *T. molitor* and *R. palmarum* caused by *Metarhizium* (the mortality of the control never exceeds 10%) (Abbot, 1925). The mortality data were then subjected to an analysis of variance (ANOVA) and a mean separation test (Tukey, $\alpha = 0.05$) using the R Software (R Core Team, 2020). Additionally, for the mortality record of *R. palmarum* at the highest concentration (10^9), survival curves and estimation of the median lethal time (LT_{50}) were determined through a Probit analysis using the R software (R Core Team, 2020) (Figure 7).

Peña-Peña A.J., Ortiz-García C.F., Enriquez-Vara J.N. Oropeza C. (2023) Occurrence of entomopathogenic fungi in coconut soils, identification, physiological characterization and pathogenicity towards *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Dryophthoridae). *Biocontrol Science and Technology*. <https://doi.org/10.1080/09583157.2023.2259638> **Published**

CAPÍTULO II

2.3. Results

2.3.1. Characterization of Soil Samples from Coconut Cultivation Sites

The edaphic characterization of soil was based on what is described by the Mexican standard NOM-021-RECNAT (SEMARNAT, 2002). The soil analysis of the four sites sampled showed moderate acidity (pH 5.6-6.0). The electrical conductivity (EC) indicates low or almost no salinity in the four sites sampled (0.12-0.23 dS m⁻¹). The organic matter (OM) content (3-3.38%) and the percentage of nitrogen (0.1-0.14%) are at a medium level in Cunduacán, Centla, and Cárdenas, while in Paraíso it is at a poor level (1.57%) of OM and N (0.08%). Phosphorus (11.15 mg kg⁻¹) and calcium (11.25 cmol kg⁻¹) were found at a high level for Cunduacán and a medium level P (9.56-10.3 mg kg⁻¹) and Ca (5.88-9.98 cmol kg⁻¹) for the other sites. The soil structure for the Centla and Paraíso sites is sandy, while for Cárdenas it is sandy loam and in Cunduacán it is clayey. All of the above results are described in Table 3.

Table 2. 3 Distribution of the presence of entomopathogenic fungi, soil properties of the sampled sites and Chi-square analysis.

Sam- pling site	Sam- pling site Per- centa- ge of EPF presence per plot	Number of Mycosat- ed Larvae	Number of isolates obtained	pH (H ₂ O)	CE	MO	N total	P- Olsen	K	Ca	S oil te- xt- ur- e
				rel. 1:2	dS m ⁻¹	%	%	mg kg ⁻¹	cmol kg ⁻¹	cmol kg ⁻¹	
Cun- dua	80 **	92 **	36	5.8	0.20	3.38	0.14	11.15	0.3	11.25	Cl- a

cán											y L o a m
Cent la	0	0	0	5.7	0.16	2.88	0.10	9.56	0.2	5.88	S a n d
Para íso	10	1	1	6.0	0.12	1.57	0.08	8.75	0.16	4.49	S a n d
Cár den as	60 **	31 **	26	5.6	0.22	3.01	0.12	10.3	0.22	9.98	L o a m y S a n d

Values with ** $p < 0.001$

2.3.2. Native Isolates Obtained

A total of two thousand larvae of *T. molitor* were used to obtain native isolates. Of these larvae, 125 were mycosed and 66 isolates were obtained. There was a significant difference in the frequency of fungi observed in mycosed larvae associated with the different sites ($X^2 = 178.65$, $p = < 0.001$). The highest number of mycosed larvae was observed with isolates from Cunduacán (98 larvae) followed by Cárdenas (35 larvae) and Paraíso (1 larva), with Centla no mycosed larvae obtained. About the percentage of sampling spots associated with mycosed larvae by site, the same order was maintained, Cunduacán (80%), Cárdenas (60%), Paraíso (10%), and Centla (0%). In the number of isolates, Cunduacán had 36, Cárdenas 26, and Paraíso 1. All of the above are described in Table 3.

2.3.3. Morphological and Molecular Identification

According to principal component analysis, four groups of *Metarhizium* spp. were formed, representing 95 % of the morphological variability of the fungi isolates. In group 1, colonies were

Peña-Peña A.J., Ortiz-Garcia C.F., Enriquez-Vara J.N. Oropeza C. (2023) Occurrence of entomopathogenic fungi in coconut soils, identification, physiological characterization and pathogenicity towards *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Dryophthoridae). *Biocontrol Science and Technology*. <https://doi.org/10.1080/09583157.2023.2259638> **Published**

CAPÍTULO II

brownish with a cottony texture and edge, with a medium capacity to produce conidia with the presence of exudates. In group 2, colonies were light green with a smooth texture and a white border, and high production of conidia without the presence of exudates. In group 3, colonies were white with a velvety texture, and a cottony edge, and had a deficient conidia production and absence of exudates. In group 4, colonies were white with a fluffy texture and a cottony edge and had low conidia production without exudates (Figure 2). For morphological identification, the conidia of all the strains were measured, which ranged from 6.9 -7.84 μm to 2.05-2.75 μm (Supplementary Table) (Figure 6), and then using the Humber (2012) taxonomic keys only the genus level could be obtained. Eleven strains were selected to identify at the species level, from which the sequences of the ITS region were obtained, lengths varied from 482 to 525 bp. The Maximum Parsimony analysis placed the strains PIN 841.1, PIN 531.1, and PAL 233.1 close to *M. anisopliae* sensu latu with 70% branch support, while the strains PIN 941.1, PIN 951.1, PAL 123.1, PAL 712.1, PAL 721.1, PAL 733.1, PAL 736.1 and PAR 631.1 separated with 65% support concerning the *M. robertsii* species (Figure 3).

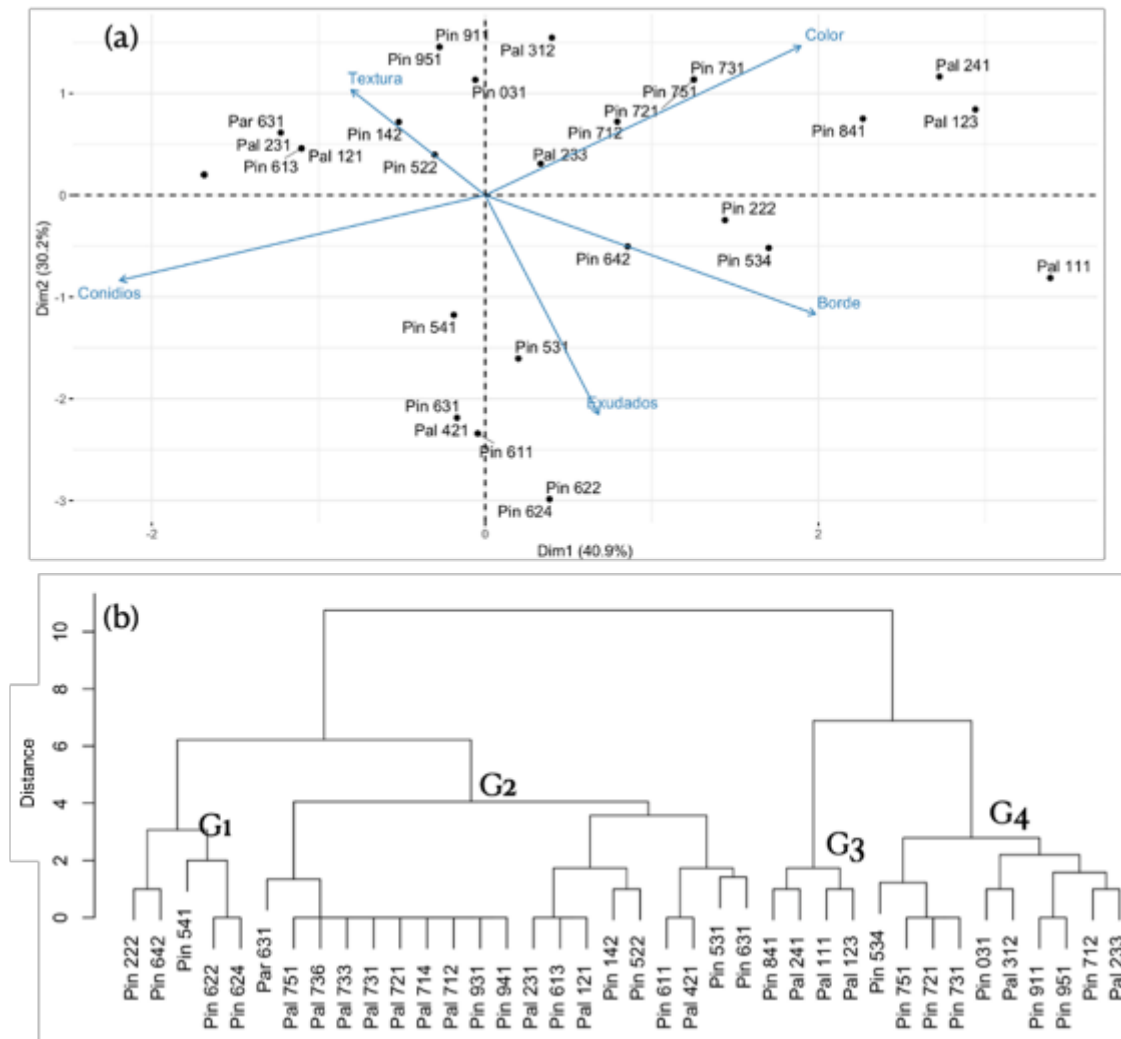


Figure 2. 2 A): Distribution based on the main components that relate the morphological characteristics of the isolates obtained B): Dendrogram of the groups formed by the characteristics of the *Metarhizium* strains found in coconut soils. G1= Group 1, G2 = Group two, G3 = Group 3 and G4 = Group four. Location of the sampled area (upper box). Geographic location of sampling sites in Tabasco, Mexico (bottom box)2.3.4. Effect of Temperature on Growth of Entomopathogenic Fungi Isolates.

Peña-Peña A.J., Ortiz-Garcia C.F., Enriquez-Vara J.N. Oropeza C. (2023) Occurrence of entomopathogenic fungi in coconut soils, identification, physiological characterization and pathogenicity towards *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Dryophthoridae). *Biocontrol Science and Technology*. <https://doi.org/10.1080/09583157.2023.2259638> **Published**

CAPÍTULO II

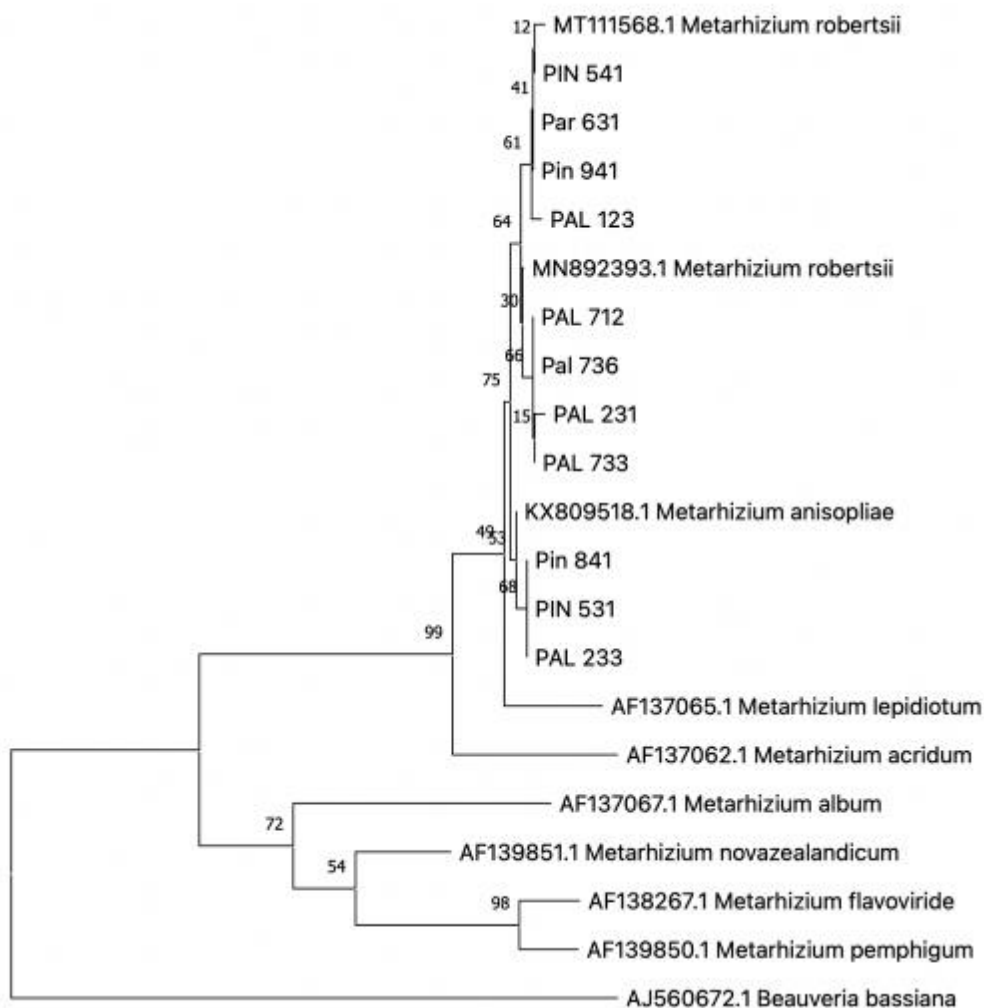


Figure 2. 3 Dendrogram for *Metarhizium* constructed with the sequences of the ITS region (ITS1- 5.8S-ITS4 of rDNA) based on the Maximum Parsimony method. The numbers in the dendrogram represent the bootstrap values. The sequences used as reference for the phylogenetic placement of the isolates were obtained from the GenBank, the accession numbers are shown.

The effect of temperature on growth at 25°C showed significant differences between the MG of *Metarhizium* spp. strains ($F = 46.83$; $DF = 37$; $p = 2e^{-16}$). The daily growth rate fluctuated between

1.9 and 0.87 mm (Figure 4 and Figure 5). The strains Pin 541.1, Pin 941.1, Pal 736.1, and Pal 733.1 obtained the highest growth in eight days. On the other hand, the effect of temperature at 30°C also showed a significant difference among the strains ($F = 71.36$; $DF=37$; $p= 2e^{-16}$). The MG ranged from 18.3 mm to 40 mm (Figure 4 and Figure 5). Pin 541.1, Pin 522.1, and Pal 421.1 strains had the highest MG at 10 days. The effect of growth at 35 °C in all strains was too slow and asymmetric to be measured, so no database was generated for statistical analysis. In general, all strains had slower growth with increasing temperature, but strain Pin 541.1 had the highest MG over all others at 25 and 30 °C.

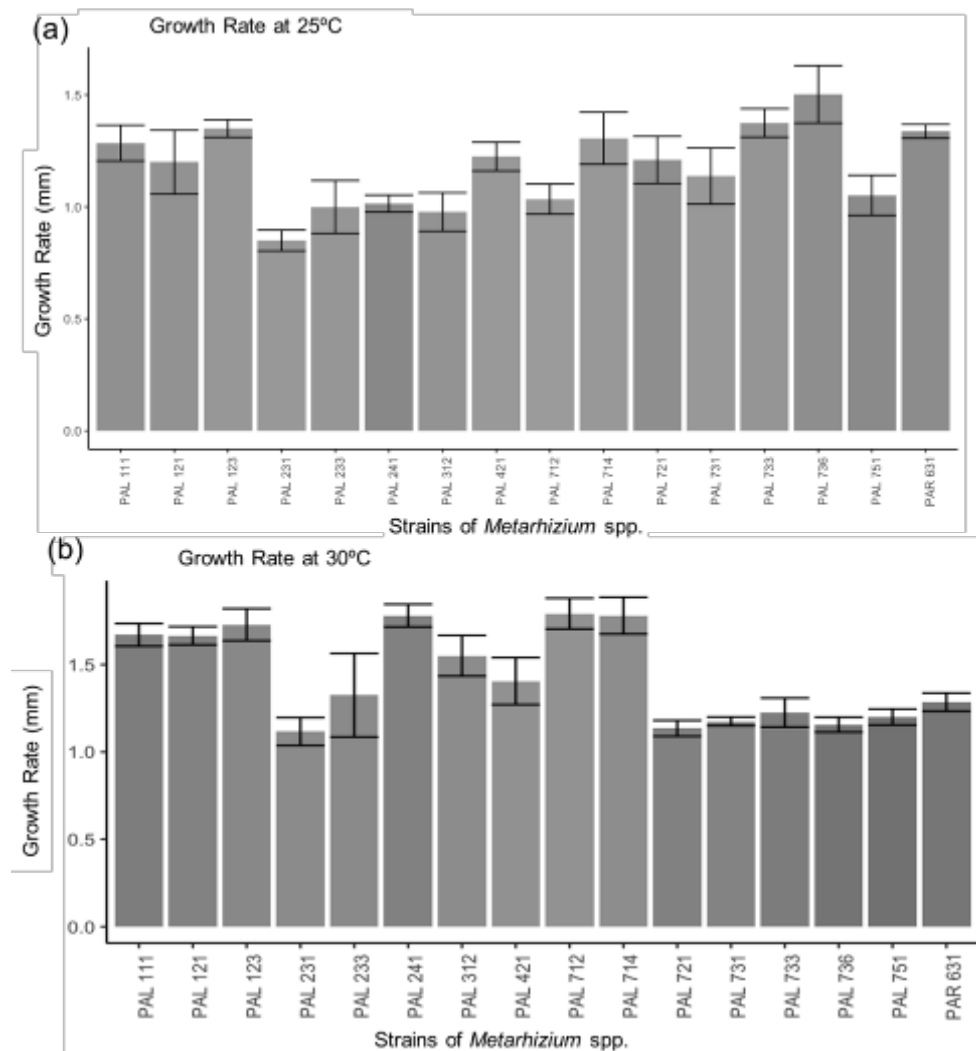


Figure 2. 4 Growth rate of the isolates obtained from the Cárdenas plot. a) Growth rate at 25 °C of the native isolates of *Metarhizium* expressed in mm. b) Growth rate at 30°C of the native isolates of *Metarhizium* expressed in mm.

CAPÍTULO II

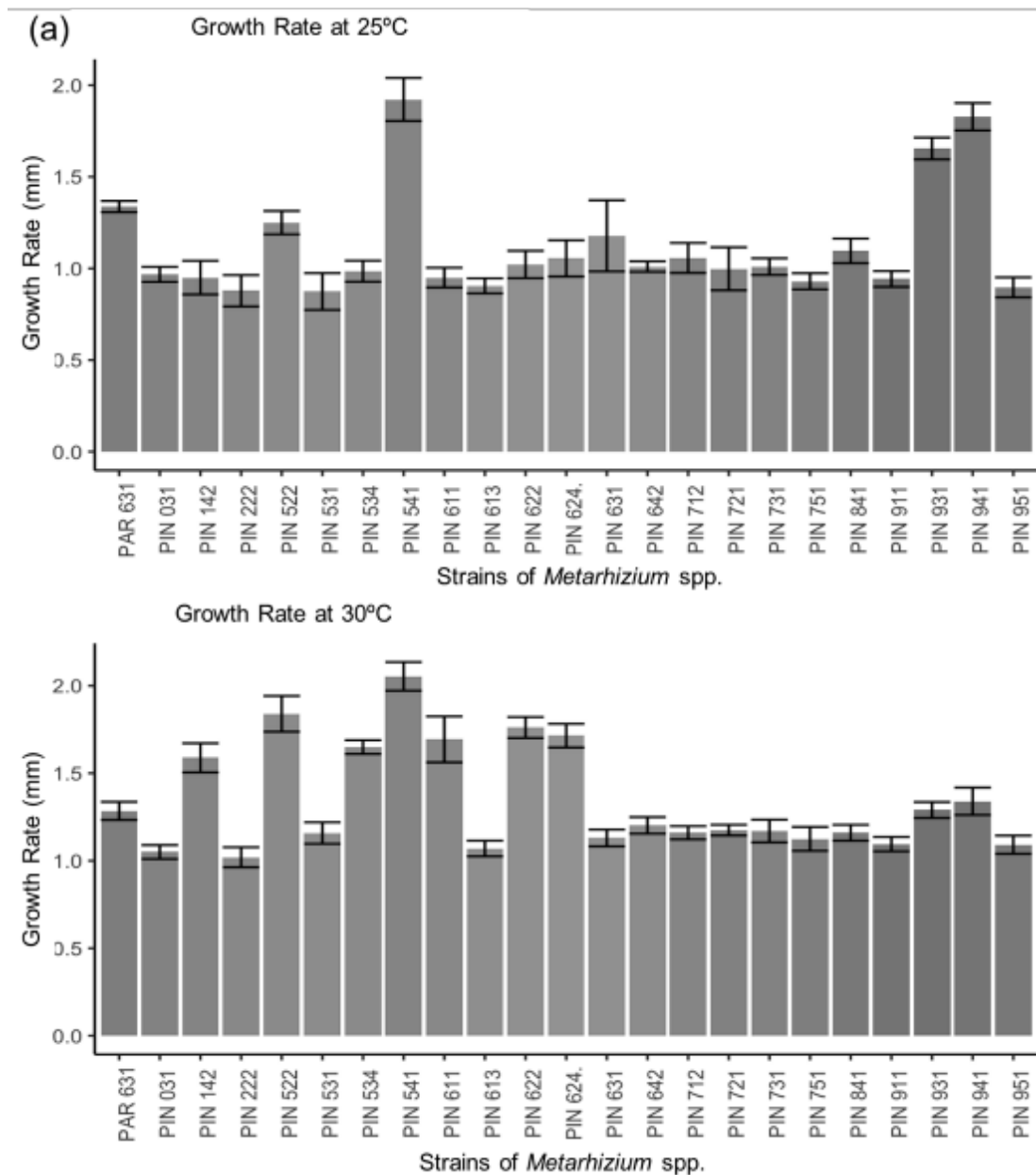


Figure 2. 5 Growth rate of the strains obtained from the Cunduacán plot. a) Growth rate at 25 °C of the native isolates of *Metarhizium* expressed in mm. b) Growth rate at 30°C of the native isolates of *Metarhizium* expressed in mm.

2.3.5. Pathogenicity of Entomopathogenic Fungi Isolates Against *Tenebrio molitor*

A highly significant difference ($F= 9.066$; $DF=37$; $p= 5.05e^{-16}$) was found in the mortality caused by *T. molitor* by the different *Metarhizium* strains, standing out the *M. robertsii* strains PAL 231.1 and PAL 733.1, as they caused cumulative mortality of more than 60%. In contrast, the other strains maintained a lower cumulative mortality between 10 and 30% (Figure 7).

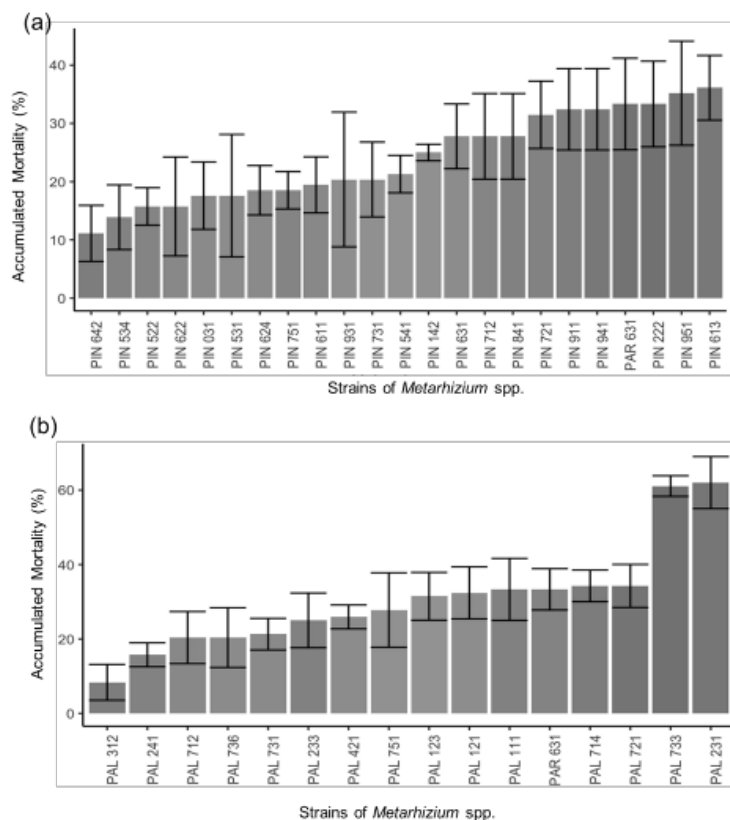


Figure 2. 6 Growth rate of the strains obtained from the Cunduacán plot. a) Growth rate at 25 °C of the native isolates of *Metarhizium* expressed in mm. b) Growth rate at 30°C of the native isolates of *Metarhizium* expressed in mm.

2.3.6. Pathogenicity of *Metarhizium robertsii* Against *Rhynchophorus palmarum*

Mortality of two strains of *M. robertsii* mentioned above, PAL 231.1 and PAL 733.1, was evaluated at three concentrations of conidia (10^7 , 10^8 and 10^9) on adults of *R. palmarum*.

Peña-Peña A.J., Ortiz-Garcia C.F., Enriquez-Vara J.N. Oropeza C. (2023) Occurrence of entomopathogenic fungi in coconut soils, identification, physiological characterization and pathogenicity towards *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Dryophthoridae). Biocontrol Science and Technology. <https://doi.org/10.1080/09583157.2023.2259638> **Published**

CAPÍTULO II

However, a highly significant difference ($F=168.7$; $DF=1$; $p=0.000203$) was only observed at the higher concentration (Figure 8). At the lowest concentration (10^7), no mortality was recorded in either treatment. Sporulation was observed in the intersegmental spaces of the cuticle of the body, leg segments, antennae, and rostrum of *R. palmarum* adults (Figure 6). Strain PAL 733.1 had the highest pathogenic capacity with a cumulative mortality of more than 60% in a period of 21 days, while PAL 231.1 never reached more than 25% at the same time. Mortality of half of the population was reached at 17 days ($p=0.00071$) for strain PAL 733.1 (Figure 8).

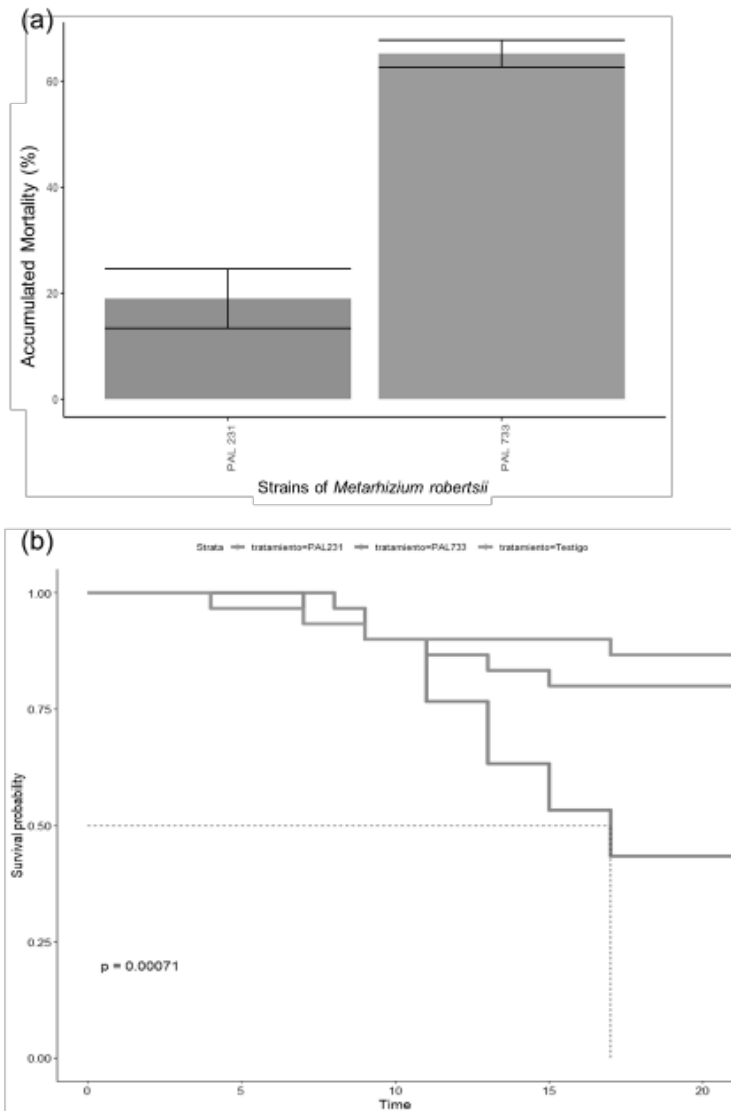


Figure 2. 7 A) Percentage of cumulative mortality of *R. palmarum* adults at 21 days with the *M. robertsii* strains. B) Mean survival curves of *R. palmarum* exposed to the concentration of 1×10^9 of *M. robertsii* conidia at 21 days. Horizontal line indicates 50% mortality.

Peña-Peña A.J., Ortiz-Garcia C.F., Enriquez-Vara J.N. Oropeza C. (2023) Occurrence of entomopathogenic fungi in coconut soils, identification, physiological characterization and pathogenicity towards *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Dryophthoridae). *Biocontrol Science and Technology*. <https://doi.org/10.1080/09583157.2023.2259638> **Published**

CAPÍTULO II

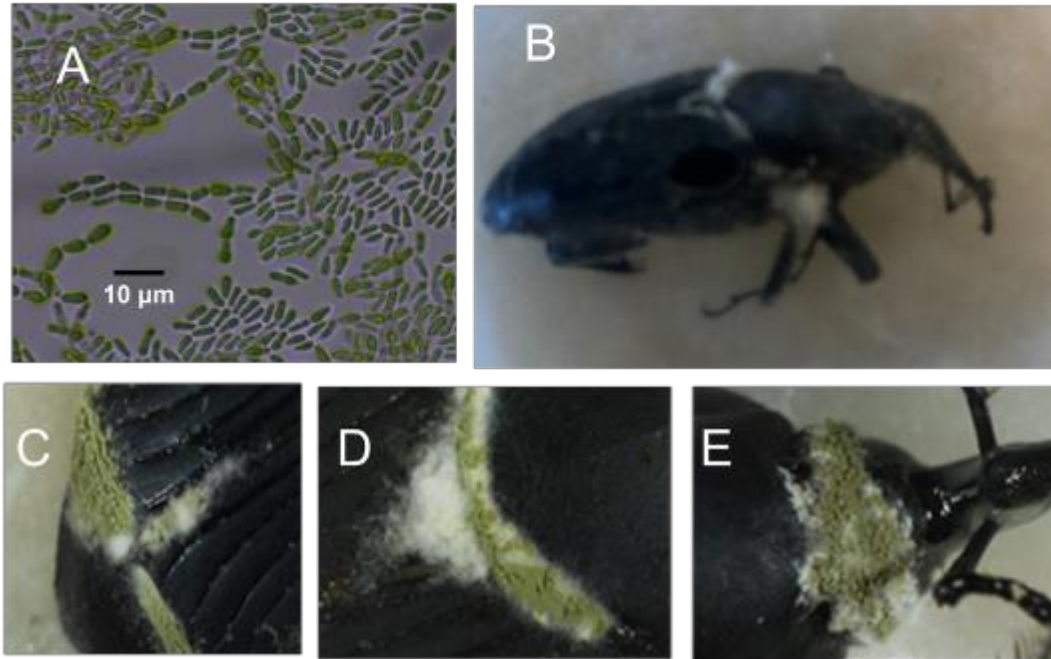


Figure 2. 8 A) Conidia of *Metarhizium robertsii*. B) *Rhynchophorus palmarum* infected with strain PAL 731.1. C) Sporulation observed in pygidium of *R. palmarum* D) Sporulation observed in scutellum of *R. palmarum* E) Sporulation observed in the head of *R. palmarum*.

2.4. Discussion

Our investigations in the four coconut plots revealed the presence of only *M. robertsii* and *M. anisopliae* sensu lato. Although macro and micromorphological characteristics of colonies and conidia size have been traditionally used for species identification, the genus *Metarhizium* poses a challenge as several species are morphologically identical (Bischoff *et al.*, 2009). In this study, the ITS region presented a limited ability to clearly resolve the lineages of the obtained strains identified as *M. anisopliae* complex. Since Driver *et al.* (2000), four varieties of *M. anisopliae* were recognized with ITS molecular phylogeny, the number has been expanded to 21 species

based on multi-gene analyses (Mongkolsamrit *et al.*, 2020). It would be necessary to make additional gene sequencing to achieve an accurate identification of these strains.

Among these sites, Cunduacán stood out as the most fertile, harboring the highest number of mycosed larvae and isolates. This observation could be attributed to the type of soil in Cunduacán, characterized as Fluvisol, which boasts attributes such as high permeability, significant depth, medium texture, and abundant nutrients and organic matter qualities that contrast with the nutrient-poor Arenosol soils with slow permeability and sandy texture (90% sand) found in the other sites (Palma-Lopez *et al.*, 2018). In the sites Cunduacán and Cárdenas, both *M. robertsii* and *M. anisopliae* s.l. were present, suggesting their potential to coexist within the same locations. Moreover, the observation of at least two groups of different *M. robertsii* haplotypes points to the genetic variability of entomopathogenic fungi within the same ecosystem, as reported by Meyling *et al.* (2009) and Ormond *et al.* (2010). These findings demonstrate that specific habitats can harbor different fungal species and distinct genetic groups within those species. Furthermore, the higher frequency of *M. robertsii* supports its ability to adapt to various agroecosystems, as previously documented by Quesada-Moraga *et al.* (2007) and Sharma *et al.* (2021). The presence of grass species commonly associated with coconut palms in the collection sites could have influenced the prevalence of *M. robertsii*, as this fungus is often found in association with grasses (Wyrebec *et al.*, 2011).

Temperature plays a crucial role in the growth of *Metarhizium* strains, with 25°C generally considered the optimal temperature for in vitro radial growth (Deepak *et al.*, 2019). In our study, some strains exhibited optimal growth at 25°C, and others displayed higher growth rates at 30°C. Similar findings were reported for *M. anisopliae* isolates obtained from adult *Aeneolamia* spp., insects in sugarcane plantations within the same geographical region as our study, which exhibited robust growth at 30°C but not at higher temperatures (Hernández-Domínguez *et al.*, 2015). Interestingly, the growth of the strains was limited and irregular, with highly melanized mycelium at 35°C. However, at the end of the bioassay, the strains were incubated at 25°C, and growth was more abundant and regular, suggesting they may tolerate higher temperatures without reaching the upper limit. The observation of the mycelium could be related to *Metarhizium*'s ability to form microsclerotia, small structures formed in melanized hyphae, as an adaptive mechanism to withstand stress caused by abiotic factors such as high temperatures, UV rays, and dehydration (Paixao *et al.*, 2021). Furthermore, the high-temperature tolerance of isolates may be influenced by their geographical origin. For instance, *M. robertsii* isolate conidia from soil samples in Brazil demonstrated a germination rate close to

Peña-Peña A.J., Ortiz-Garcia C.F., Enriquez-Vara J.N. Oropeza C. (2023) Occurrence of entomopathogenic fungi in coconut soils, identification, physiological characterization and pathogenicity towards *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Dryophthoridae). *Biocontrol Science and Technology*. <https://doi.org/10.1080/09583157.2023.2259638> **Published**

CAPÍTULO II

100% at 40°C (Mesquita *et al.*, 2020), while *M. anisopliae* isolates from soil samples in India displayed their highest germination rate at 32°C but not at higher temperatures (Deepak *et al.*, 2019).

Pathogenicity is critical in selecting EPF isolates as potential biological control agents against *R. palmarum*. Hence, we assessed the pathogenic capacity of the 38 *Metarhizium* strains isolated from the four sites using *T. molitor* as the test insect. The results revealed a wide range of cumulative mortality rates, with Cunduacán strains causing mortality ranging from 10.9% to 35.8% and Cardenas strains causing mortality between 8.6% and 62.6%. Strains PAL733.1 and PAL231.1 from Cárdenas emerged as the most effective, causing cumulative mortality of 61.3% and 62.6%, respectively.

The relatively low (10% - 40%) mortality caused by most strains in our study might be due to their potential alternative function in the ecosystem. Recent studies have suggested that *Metarhizium* evolved from a lineage of symbiotic plant fungi, which later acquired entomopathogenic capacity (Stone and Bidochka, 2020). The pathogenic capacity of a fungus strain can be influenced by various factors, including its ability to generate enzymes that degrade the cuticle of the target insect (Ortiz-Urquiza and Keyhani, 2013) and the relative humidity of the environment surrounding the insect (Cheong and Azmi, 2020). Our study did not observe a clear correlation between the rapid growth of certain strains and their pathogenic capacity. Similar findings were reported for *M. anisopliae* (Dimbi *et al.*, 2004) and *M. flavoviride* *sensu lato* (Fargues *et al.*, 1997). However, the germination speed of conidia is related to pathogenicity (Ishak *et al.*, 2020), suggesting that the most virulent strains are those with the fastest germination speed.

Among the two strains evaluated, PAL733.1 stood out with the highest percentage of accumulated mortality, reaching LT₅₀ at 17 days. These results align with a study by Lima *et al.* (2020), who reported that a *B. bassiana* isolate obtained directly from *R. palmarum* achieved LT₅₀ at 17.5 days. Additionally, a study by Gaviria *et al.* (2020) demonstrated 100% mortality of

R. palmarum at 18 days in a lower concentration (10^8) with *M. anisopliae*, although their tests involved longer immersion times of up to 5 minutes.

In conclusion, in this study, *Metarhizium* strains were found in different coconut plantation sites in Mexico, and they were identified morphologically and molecularly and characterized on physiology and pathogenicity aspects. Also, the sites were characterized by different edaphic aspects. The strain PAL733.1 stands out among the isolates because it displayed greater pathogenicity against *R. palmarum* adults and the capacity to survive at high temperatures (35°C). Therefore, it could be considered a potential biological control agent. However, further research is essential to evaluate its efficacy in controlling *R. palmarum* under field conditions and to develop practical methods to use it under coconut and oil palm cultivation conditions.

Acknowledgements

The authors thank Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT, México) for the scholarship granted to A. J. Peña-Peña; FORDECYT-CONAHCYT (grant number 296195) for partially financing the research; CP-Campus Tabasco and CICY for allowing A.J. Peña-Peña conduct research activities at their premises; and Davira Palma-Cancino, Pablo Palma-Cancino, and María Narvaez-Cab for technical support.

Peña-Peña A.J., Ortiz-García C.F., Enriquez-Vara J.N. Oropeza C. (2023) Occurrence of entomopathogenic fungi in coconut soils, identification, physiological characterization and pathogenicity towards *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Dryophthoridae). *Biocontrol Science and Technology*. <https://doi.org/10.1080/09583157.2023.2259638> **Published**

CAPÍTULO II

CAPÍTULO III

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

3.1. DISCUSIÓN

En este estudio, realizamos una exploración de hongos entomopatógenos en varias parcelas de cultivo de coco en cuatro sitios en Tabasco, México. El objetivo principal fue obtener aislamientos con el potencial de servir como agentes de control biológico para el manejo de *R. palmarum*, una plaga altamente destructiva para el cultivo de coco no solo en México sino también en otros países de las Américas (del Prado-Vera *et al.*, 2018).

El género *Rhynchophorus* presenta una alta susceptibilidad a los hongos entomopatógenos. Por ejemplo, en España encontraron un aislamiento de *B. bassiana* sobre una pupa de *R. ferrugineus*, con una eficacia del 85 % en plantaciones de *Phoenix canariensis* (Dembilio *et al.*, 2010). En Malasia, se obtuvieron aislamientos de *M. anisopliae* directamente de plantaciones de palma datilera y se evaluó sobre *R. ferrugineus* obteniendo una mortalidad del 100% (Grace *et al.*, 2017). Para *R. palmarum*, se ha reportado la susceptibilidad a *M. anisopliae* (León-Martínez *et al.*, 2019), *B. bassiana* (Gaviria *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2020), con una mortalidad del 100% a una concentración de 1×10^8 conidios/mL. En este trabajo, las cepas PAL 733.1 y PAL 231.1 identificadas como *M. robertsii* causaron una mortalidad acumulada de 61,3 y 62,6 % en *T. molitor* y en *R. palmarum* 60% y 20% respectivamente. En el cálculo de TL_{50} contra *R. palmarum*, Lima *et al.* (2020) observaron que *B. bassiana* alcanzó una TL_{50} a los 17,5 días con una concentración de 1×10^9 conidios/mL (Lima *et al.*, 2020). Mientras que, Gaviria *et al.* (2020) reportaron un TL_{50} de 18 días con *M. anisopliae* en una concentración de 1×10^8 conidios/mL aunque sus pruebas implicaron tiempos de inmersión de 5 minutos. En nuestros bioensayos, la cepa PAL 733.1 alcanzó una TL_{50} a los 17 d, mientras que PAL 2331.1 nunca alcanzó una mortalidad del 50% de la población.

La búsqueda HE que hayan coevolucionado en las mismas condiciones que los insectos en un agroecosistema tropical, como lo son las plantaciones de cococeto, podría lograr una mayor eficiencia en el manejo integrado de plagas. Además, de la capacidad de los hongos para adaptarse a diversas condiciones edáficas. En este aspecto, las cuatro parcelas de coco muestreadas solo se encontraron aislamientos de *Metarhizium robertsii* y *M. anisopliae*. Se ha reportado que propiedades fisicoquímicas como el contenido de MO, calcio y textura pueden jugar un papel importante en la persistencia de *Metarhizium* en el suelo (Sharma *et al.* 2021; Bueno-Pallero *et al.*, 2020; Quesada-Moraga *et al.*, 2007). El contenido de MO en los sitios muestreados fluctuó dentro del rango óptimo (2-4%) favorable para el desarrollo de *Metarhizium* (Sharma *et al.*, 2021; Quesada-Moraga *et al.*, 2007). La función principal de la MO en el suelo es como fuente de C para los microorganismos (Kallebach *et al.*, 2016). Por lo tanto, bajos contenidos de MO estarían afectando la presencia de *Metarhizium*. En cuanto a la textura del suelo, el contenido de arena para los sitios Paraíso y Centla fue superior al 90%, lo que estaría afectando negativamente la presencia de aislamientos de *Metarhizium*, por falta de humedad y MO. En cambio, en Cárdenas y Cunduacán, que se encontró con un menor contenido de arena y un mayor contenido de arcilla y MO, condición favorable para la presencia de *Metarhizium*. Estos resultados coinciden con reportes previos que proponían que la arcilla es un predictor positivo en la detección de *Metarhizium* sp, mientras que el contenido de arena es un predictor negativo (Randhawa *et al.*, 2018; Quesada-Moraga *et al.*, 2007;).

El cultivo del cocotero se encuentra en zonas tropicales. Por lo que al considerar utilizar a los HE en estas condiciones, es necesario comprender las condiciones óptimas para la infección de los insectos, crecimiento y desarrollo. Una de las condiciones ambientales que determina el crecimiento y desarrollo de los HE es la temperatura. El crecimiento óptimo de los aislamientos que se evaluaron de algunos fue a los 25 °C, mientras que para otros fue a los 30°C. A los 35°C por 21 días, se observó un crecimiento deficiente para todos los aislamientos, sin embargo, al incubarlos a 25°C crecieron con normalidad, lo que nos indica su capacidad por tolerar altas temperaturas, que son las que se presentan en los ambientes tropicales. El lugar de donde se obtienen los aislamientos puede ser determinante para sus capacidades de supervivencia al medio ambiente, por ejemplo, se han obtenido aislamientos de *M. anisopliae* de Ontario, Canadá, estos aislamientos pudieron desarrollarse a los 8°C (De Croos y Bidochka, 1999). Por otro lado,

Peña-Peña A.J., Ortiz-García C.F., Enriquez-Vara J.N. Oropeza C. (2023) Occurrence of entomopathogenic fungi in coconut soils, identification, physiological characterization and pathogenicity towards *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Dryophthoridae). *Biocontrol Science and Technology*. <https://doi.org/10.1080/09583157.2023.2259638> **Published**

CAPÍTULO II

aislamientos de *M. robertsii* obtenidos en las condiciones de Brasil tuvieron una tasa de germinación cercana al 100 % a 40 °C (Mesquita *et al.*, 2020).

3.2. CONCLUSIONES GENERALES

En este estudio se encontraron aislamientos de *Metarhizium* en diferentes sitios de plantaciones de coco en Tabasco, México. Los sitios se caracterizaron por diferentes aspectos edáficos, de los que sobresalen los sitios de Cunduacan y Cardenas por su contenido de arcilla lo que favoreció la ocurrencia de *Metarhizium*. Además, las cepas fueron identificadas morfológica y molecularmente, se analizó la región ITS del ADN de once aislamientos y se identificaron las especies de *M. robertsii* y *M. anisopliae*. Entre los aspectos fisiológicos caracterizados, se evaluó el crecimiento radial a 25°C, 30°C y 35°C, el crecimiento óptimo para la mayoría de las cepas fue a 25°C. Del bioensayo de patogenicidad en *T. molitor*, resaltaron las cepas PAL 231.1 y PAL 733.1 por ocasionar una mortalidad acumulada superior del 60%. De estos dos aislamientos, la cepa PAL733.1 presentó una mayor patogenicidad frente a adultos de *R. palmarum* y una TL_{50} de 17 d. Por lo tanto, podría considerarse un potencial agente de control biológico. Sin embargo, es esencial realizar más investigaciones para evaluar su eficacia en el control de *R. palmarum* en condiciones de campo y desarrollar métodos prácticos para usarlo en condiciones de cultivo de coco y palma aceitera.

3.3. PERSPECTIVAS

La caracterización y selección de hongos entomopatógenos es solo el primer paso para integración de estos microorganismos en los programas de manejo integrado. En este trabajo, se realizó la búsqueda de un aislamiento con potencial como agentes de control microbiano contra *R. palmarum*, caracterizando varios aspectos ecológicos de los HE (edáficos, fisiológicos, moleculares, patogénicos). Sin embargo, todavía se tienen que

realizar bioensayos en campo que validen los resultados en laboratorio. Además, los futuros trabajos se tendrían que enfocar en realizar esfuerzos para el desarrollo de tecnologías en la implementación de los HE en plantaciones de cocotero de una forma exitosa.

BIBLIOGRAFÍA

Abbott WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *JEcon Entomol* 18(2):265–267.

Aldana, R.C., Aldana, J.A. y Moya, O.M. (2010) Biología, hábitos y manejo de *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae). Cenipalma, Bogotá, Colombia. Boletín Técnico N° 23, 54 pp.

Alencar Lima, H. M., de Melo Rodrigues, V., Rodrigues Sabino, A., Cardoso dos Santos, M. Q., Soares de Lima, I., Guimarães Duarte, A., Santo Negrisoli Junior, A., & Manoel da Silva, J. (2020). Effect of isolates of entomopathogenic fungi in the coconut eye borer. *Comunicata Scientiae*, 11, e3300.

Alfazairy, A.A., Hendi, R., El-Minshawy, A.M., Karam, H.H., 2003. Entomopathogenic agents isolated from 19 coleopteran insect pests in Egypt. *Egypt Journal of Biological- Pest Control* 13, 125-134.

Arrazate-Argueta, V. D. C., Martínez-Bolaños, M., Ayala-Escobar, V., Avendaño-Arrazate, C. H., & Hernández-Morales, J. (2019). Diversidad morfológica y fisiológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en suelos cacaoteros de México. *Agro Productividad*, 12(12). <https://doi.org/10.32854/agrop.vi0.1529>

Atakan, E., Elekciog ĩlu, H., Gözel, U., Günes, Ç., Yüksel, O., 2009. First report of *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1975) (Nematoda: Heterorhabditidae) isolated from the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Oliver, 1970) (Coleoptera: Curculionidae) in Turkey. *Bull. OEPP* 39, 189–193.

Audelo Benítez, M. A. (2012). Diseño de maquinaria para el envasado de agua de coco. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(spe4), 789-799.

- Awol Md. Seid, Brian L. Fredensborg, Bernhardt M. Steinwender & Nicolai V. Meyling (2019) Temperature-dependent germination, growth and co-infection of *Beauveria* spp. isolates from different climatic regions, *Biocontrol Science and Technology*, 29:5, 411-426.
- Baró, Y, Schuster, C, Gato, Y, Márquez, ME, Leclerque, A (2022) Characterization, identification and virulence of *Metarhizium* species from Cuba to control the sweet potato weevil, *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera: Brentidae). *Journal of Applied Microbiology*. 132: 3705– 3716.
- Bayissa, W., Ekesi, S., Mohamed, S.A. Kaaya G.P., Wagacha J.M., Hana R y Maniania N.K. (2017) Selection of fungal isolates for virulence against three aphid pest species of crucifers and okra. *J Pest Sci* 90, 355–368.
- Behie SW, Bidochka MJ (2014) Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. *Appl Environ Microbiol* 80:1553–1560
- Bischoff, F. Rehner S:A. Humber, R.A. (2009) A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage . *Mycologia*. 101 512-530, 10
- Boucias, D. G., y Pendland, J. C. (1991). Attachment of mycopathogens to cuticle. The initial event of mycoses in arthropod hosts. In G. T. Cole & H. C. Hoch (Eds.), *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals* (pp. 101e127). New York: Plenum Press.
- Braga, G. U. L., Rangel, D. E. N., Flint, S. D., Anderson, A. J., y Roberts, D. W. (2006). Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochem. Photobiol.*, 82, 418e422.

- Brunner-Mendoza, C., Moonjely, S., Reyes-Montes, M.R. et al. (2017) Physiological and phylogenetic variability of Mexican *Metarhizium* strains. *BioControl* 62, 779–791
- Brunner-Mendoza, C., Reyes-Montes, M. del R., Moonjely, S., Bidochka, M. J., & Toriello, C. (2018). A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. *Biocontrol Science and Technology*, 1–20. doi:10.1080/09583157.2018.1531111.
- Bueno-Pallero, F.A.; Blanco-Pérez, R.; Vicente-Díez, I.; Rodríguez Martín, J.A.; Dionísio, L.; Campos-Herrera, R. (2020) Patterns of occurrence and activity of entomopathogenic fungi in the Algarve (Portugal) using different isolation methods. *Insects* , 11, 352
- Bugeme DM, Knapp M, Boga HI, Wanjoya AK, Maniania NK (2009) Influence of temperature on virulence of fungal isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the two spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Mycopathol.* 167:221–227
- CABI Centre for Agriculture and Biosciences International (2022) '*Rhynchophorus palmarum* (South American palm weevil)', CABI Compendium. CABI International. doi: 10.1079/cabicompendium.47473.
- Camino L., Hernández R., Gutiérrez O., Castrejón G., Arzuffi B., Jiménez P., Castrejón A. (2000) Pruebas con la feromona de agregación (rhynchophorol: RHYNKO-Lure®) producida por el macho de *Rhynchophorus palmarum* en la Costa Grande de Guerrero, México. *ASD Oil Palm Papers*. 20(1):9-12
- Cerda H., Martínez R., Briceno N., Pizzoferrato L., Manzi P., Tommaseo-Ponzetta M., Marin O., Paoletti M.G. (2001): Palm worm: (*Rhynchophorus palmarum*) traditional food in Amazonas, Venezuela—nutritional composition, small scale production and tourist palatability, *Ecology of Food and Nutrition*, 40:1, 13-32

- Chang, J.C., Wu, S.S., Liu, Y.C., Yang, Y.H., Tsai, Y.F., Li, Y.H., Tseng, C.T., Tang, L.C. Nai, Y.-S. (2021). Construction and Selection of an Entomopathogenic Fungal Library From Soil Samples for Controlling *Spodoptera litura*. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 596316. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.596316>
- Cheong, J. L., & Azmi, W. A. (2020). Dataset on the influence of relative humidity on the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* isolates from Thailand and Malaysia against red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*, Olivier) adult. *Data in Brief*, 30, 105482. doi:10.1016/j.dib.2020.105482
- Chinchilla C. M, y Escobar R. (2007) El anillo Rojo y otras Enfermadas de la Palma Aceitera en Centro y Suramérica. *ASD, Oil Palm Peppers*. 30 (1) 1:27.
- Chinchilla M., C. (1992). El síndrome del anillo rojo-hoja pequeña en palma aceitera y cocotero. *Revista Palmas*, 13(1), 33-56.
- Choo J., Zent E., L., Simpson B., B. (2009) "The Importance of Traditional Ecological Knowledge for Palm-weevil Cultivation in the Venezuelan Amazon," *Journal of Ethnobiology*, 29(1), 113-128.
- Cid del Prado-Vera I., Franco-Navarro F., Godinez-Vidal D. (2018) Plant Parasitic Nematodes and Management Strategies of Major Crops in Mexico. In: Subbotin S., Chitambar J. (eds) *Plant Parasitic Nematodes in Sustainable Agriculture of North America. Sustainability in Plant and Crop Protection*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-99585-4_2
- De Croos, J. N. A., y Bidochka, M. J. (1999). Effects of low temperature on growth parameters in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Can. J. Microbiol.*, 45, 1055e1061.

- Deepak, S. et al. (2019). Thermo-tolerance characterization and bioassay of selected entomopathogenic fungal (EPF) isolates on larva of *Spodoptera litura* Fab. *Journal of Applied and Natural Science*, 11 (1): 182-187
- Dembilio, Ó., Moya, P., Vacas, S., Ortega-García, L., Quesada-Moraga, E., Jaques, J.A. and Navarro-Llopis, V. (2018), Development of an attract-and-infect system to control *Rhynchophorus ferrugineus* with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Pest. Manag. Sci*, 74: 1861-1869
- Dembilio, Ó., Quesada-Moraga, E., Santiago-Álvarez, C., Jacas, J.A., 2010. Potential of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as a biological control agent against the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 104, 214–221.
- Dimbi, S. N.; Maniania, N. K.; Lux, S. A.; Mueke, J. M. (2004) Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. *BioControl* 49 (1): 83-94.
- Driver, F., Milner, R. J., & Trueman, J. W. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, 104(2), 134-150.
- EPPO (2023) *Rhynchophorus palmarum*. EPPO datasheets on pests recommended for regulation. <https://gd.eppo.int> (accessed 2023-07-05)
- FAOSTAT. (Junio de 2022). Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database. Obtenido de Food and Agriculture Organization: <http://www.fao.org/faostat/en/>

- Fargues, J., A. Ouedraogo, M. Goettel, and C. Lomer, (1997) Effects of temperature, humidity and inoculation method on susceptibility of *Schistocerca gregaria* to *Metarhizium flavoviridae*. *Biocontrol Sci. Technol.* 7: 346–356.
- Fernandes É.K.K., Keyser C.A., Rangel D.E.N., Foster R.N., Roberts D. (2010). CTC medium: A novel dodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. *Biological control* 54, 197–205.
- García-Hernández, J. L., F. Beltrán-Morales, J. G. Loya-Ramírez, J. R. Morales- Cota, E. Troyo-Diéquez, and F. A. Beltrán-Morales. (2003) First record of *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Dryophthoridae) in Baja California Sur. *Folia Entomol. Mex.* 42: 415-417.
- Gaviria, Jackeline, Parra, Pedro Pablo, & Gonzales, Alonso. (2020). Selection of strains of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales) for Endophytic colonization in coconut seedlings. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 36(1), 3-13.
- Gbemisola D. O., Herrick N. J., Haseeb M., Hix R. K. y Mankin R. W. (2014) Acoustic detectability of *Rhynchophorus cruentatus* (Coleoptera: Dryophthoridae). *Florida entomologist.* 97(2):431-438
- Gerber K. y GIBLIN-DAVIS R. M. (1990) Association of the Red Ring Nematode and Other Nematode Species with the Palm Weevil, *Rhynchophorus palmarum*. *Journal of Nematology.* 22(2):143-9
- GIBLIN-DAVIS (2006) Borers of Palms, In: *Insects on Palms* (eds Howard F.W., Moore D., RM GIBLIN-DAVIS & RG ABAD), pp. 33–108. CABI Publishing, Oxon.

- González N. A. 1972. Biología y Hábitos de *Rhynchophorus palmarum* (L.), su relación con el nematodo *Rhadinaphelenchus cocophilus* (Cobb) y su comportamiento en una plantación de coco enano. Tesis. Colegio Superior de Agricultura Tropical. 91
- Gopinadhan, P.B., Mohandas, N., Nair, K.P.V., 1990. Cytoplasmic polyhedrosis virus infecting red palm weevil of coconut. *Current Science*. 59(11): 577–580.
- Grace, L. E. L., J. M. S. Jamilah, A. Mohd Farid, and A. A. Wahizatul (2017) Entomopathogenic fungi isolated from the soil of Terengganu, Malaysia as potential bio-pesticides against the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. *J. Sustain. Sci. Manag.* 12: 71–79.
- Granados-Sánchez D. y López-Ríos (2002) Manejo de la palma de coco (*Cocos nucifera* L.) en México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 8(1):39-48.
- Güerri-Agulló B., Gómez-Vidal S., Asensio L., Barranco P. y Lopez-Llorca L. V. (2010) Infection of the Red Palm Weevil (*Rhynchoporus ferrugineus*) by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*: a SEM study. *Microscopy Research and Technique*. 73:714-725.
- Hagley E. A. (1965) On the Life History and Habits of the Palm Weevil, *Rhynchophorus palmarum*. *Annals of the Entomological Society of America*. 58(1):22-28
- Hall T., A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/N.T. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 45:95-98
- Hallsworth, John E. and Naresh Magan (1996) Culture Age, Temperature, and pH affect the Polyol and Trehalose Contents of Fungal Propagules. *Applied and Environmental Microbiology* 62.7: 2435-2442

- Hassan, M.F., Nasr, A.K., Allam, S.F., Taha, H.A., Mahmoud, R.A., (2011). Biodiversity and seasonal fluctuation of mite families associated with the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Oliver (Coleoptera: Curculionidae) in Egypt. Egypt. Journal of Biological Pest Control. 21, 317–323.
- Hernández-Domínguez, C., Guzmán-Franco, A. W., Carrillo-Benítez, M. G., Alatorre-Rosas, R., Rodríguez-Leyva, E., & Villanueva-Jiménez, J. A. (2015). Specific Diversity of *Metarhizium* Isolates Infecting *Aeneolamia* spp. (Hemiptera: Cercopidae) in Sugarcane Plantations. Neotropical Entomology, 45(1), 80–87. doi:10.1007/s13744-015-0337-y
- Holder, D.J., Keyhani, N.O., 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Cordyceps) to substrata. Appl. Environ. Microbiol. 71, 5260–5266.
- Huerta Ramírez, A. Enríquez-Vara J. N., Guizar-Gonzalez C., Lobit P., Gómez- Dorantes N., Rincón-Enríquez G., Quiñones-Aguilar E.E., López-Pérez L. (2018). Presencia de hongos entomopatógenos nativos en suelos cultivados con maíz del municipio de Epitacio Huerta, Michoacán. Biotecnología y Sustentabilidad, 3 (2) :66-76
- Humber, R.A. (2012) Identification of entomopathogenic fungi. In: Lacey, L.A. (Ed.), Manual of Techniques in Insect Pathology, Second ed. Academic Press. California,U.S. pp. 151-187.
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M and Strasser, H. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.). Fungi as biocontrol agents. Progress, problems and potential. CABI Publishing, pp. 23-69.
- Ishak I, Ng L, Haris-Hussain M, Jalinas J, Idris A, Azlina Z. (2020) Pathogenicity of an Indigenous Strain of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales:Clavicipitaceae)(MET-GRA4 Strain) as a Potential Biological

Control Agent Against the RedPalm Weevil (Coleoptera: Dryophthoridae). J. Econ. Entomol. 113:43-9.

Islam, W., Adnan, M., Shabbir, A., Naveed, H., Abubakar, Y. S., Qasim, M., ... Ali, H. (2021). Insect-fungal-interactions: A detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests. *Microbial Pathogenesis*, 159, 105122. doi:10.1016/j.micpath.2021.105122

Jabbour, R., and Barbercheck, M. E. (2009). Soil management effects on entomopathogenic fungi during the transition to organic agriculture in a feed grain rotation. *Biological Control*, 51(3), 435–443.

Jaffé K., Sánchez P., Cerda H., Hernández J. V., Jaffé R., Urdaneta N., Guerra G., y Martínez R. (1993) Chemical ecology of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): attraction to host plants and to a male-produced aggregation pheromone. *Journal of chemical ecology*. vol 19 (8) :1703-1720.

Kallenbach, C., Frey, S. and Grandy, A (2016) Direct evidence for microbial-derived soil organic matter formation and its ecophysiological controls. *Nat Commun* 7, 13630. <https://doi.org/10.1038/ncomms13630>

Kepler R.M., Humber R.A., Bischoff J.F., Rehner S.A. (2014) Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics *Mycologia*, 106, 811-829

Khan S., Guo L., Maimaiti, Y., Mijit, M., Qiu, D. 2012, Entomopathogenic Fungi as Microbial Biocontrol Agent, *Molecular Plant Breeding*, Vol.3, No.7 63-79 (doi: 10.5376/mpb.2012.03.0007)

- Kim, J. C., Lee, M. R., Kim, S., Lee, S. J., Park, S. E., Nai, Y.S., Lee, G. S., Shin, T. Y. & Kim, J. S. (2018). *Tenebrio molitor*-mediated entomopathogenic fungal library construction for pest management. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21(1), 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.11.018>
- Landero-Torres I. Presa-Parra E., Galindo-Tovar M. E., Leyva-Ovalle O. R., Murguía-González, Valenzuela-González J. E. y García-Martínez M. Á. (b) (2015) Variación Temporal y Espacial de la Abundancia del Picudo Negro (*Rhynchophorus palmarum* L., Coleóptera: Curculionidae) en Cultivos de Palmas Ornamentales del Centro de Veracruz, México. *Southwestern Entomologist*. 40(1):179-188.
- León-Martínez, G. A., Campos-Pinzón, J. C., & Arguelles-Cárdenas, J. H. (2019). Pathogenicity and autodissemination of promising entomopathogenic fungi strains on *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Dryophthoridae). *Agronomy Mesoamerican*, 30(3), 631–646
- Liao X, Lu HL, Fang W, St Leger RJ. Overexpression of a *Metarhizium robertsii* HSP25 gene increases thermotolerance and survival in soil. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014 Jan;98(2):777-83. doi: 10.1007/s00253-013-5360-5. Epub 2013 Nov 22. PMID: 24265026.
- Lima, H. M., de Melo Rodrigues, V., Rodrigues Sabino, A., Cardoso dos Santos, M. Q., Soares de Lima, I., Guimarães Duarte, A., Santo Negrissoli Junior, A., & Manoel da Silva, J. (2020). Effect of isolates of entomopathogenic fungi in the coconut eye borer. *Comunicata Scientiae*, 11, e3300.
- Litwin A., Nowak M., Rózalska S. (2020) Entomopathogenic fungi: unconventional applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 19:23-42.

- Löhr B, Vásquez-Ordóñez AA, Becerra Lopez-Lavalle LA (2015) *Rhynchophorus palmarum* in Disguise: Undescribed Polymorphism in the “Black” Palm Weevil. PLoS ONE 10(12):1-14
- Luz, C., Rocha, L. F. N., Montalva, C., Souza, D. A., Beatriz R. Z. Botelho, A., Lopes, R. B., Delalibera Júnior, I. (2019). *Metarhizium humberi* sp. nov. (Hypocreales: Clavicipitaceae), a new member of the PARB clade in the *Metarhizium anisopliae* complex from Latin America. Journal of Invertebrate Pathology, 107216. doi:10.1016/j.jip.2019.107216
- Mankin R. W., Al-Ayedh H. Y., Aldrychim Y., Rohde B. (2016) Acoustic Detection of *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Dryophthoridae) and *Oryctes elegans* (Coleoptera: Scarabaeidae) in *Phoenix dactylifera* (Arecales: Arecaceae) Trees and Offshoots in Saudi Arabian Orchards, Journal of Economic Entomology, 109 (2): 622–628.
- Marquínez Marquínez, A., Loor Molina, N., Guamán Marquínez, C., Vélez Vélez, J., Solórzano Párraga, K., Rodríguez Cobeña, J., & Riera, M. (2020). Obtención de biodiesel a partir de aceite de coco (*Cocos nucifera* L.). *Revista De Iniciación Científica*, 6(1):9-14.
- Mazza G., Francardi V., Simoni S., Benvenuti C., Cervo R., Romeno J., Liácer E., Longo S., Nannelli R., Tarasco E., Roversi P. (2014) An overview on the natural enemies of *Rhynchophorus* palm weevils, with focus on *R. ferrugineus*. *Biological Control*. 77:83-92.
- Medina, J. D. C., Magalhães, A. I., Zamora, H. D., & Melo, J. D. Q. (2019). Oil palm cultivation and production in South America: status and perspectives. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*.13(5):1202-1210

- Mesquita, E., Marciano, A.F., Corval, A.R.C. Fiorotti J., Correa T. A., Quinelato S., Bittencourt V. R. y Golo P. S. 2020. Efficacy of a native isolate of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* against larval tick outbreaks under semifield conditions. *BioControl* 65: 353–362.
- Meyling, N. V., y Eilenberg, J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43(2), 145–155.
- Meyling, N.V., Lübeck, M., Buckley, E.P., Eilenberg, J., Rehner, S.A., 2009. Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. *Mol. Ecol.* 18, 1282–1293.
- Milosavljević, I., El-Shafie, H.A.F., Faleiro, Hoddle C. H., Lewis M, y Hoddle M. S (2019) Palmageddon: the wasting of ornamental palms by invasive palm weevils, *Rhynchophorus* spp. *Journal of Pest Science* 92, 143–156 (2019).
- Mongkolsamrit, S., Khonsanit, A., Thanakitpipattana, D., Tasanathai, K., Noisripoom, W., Lamlertthon, S., Himaman, H., Houbraken, J., Samson. R.A., Luangsa-ard, J. (2020). Revisiting *Metarhizium* and the description of new species from Thailand. *Studies in Mycology*. doi:10.1016/j.simyco.2020.04.00
- Morrone, Juan J. (2000). Mexican weevils (Coleoptera: Curculionoidea): a preliminary key to families and subfamilies. *Acta zoológica mexicana*, (80), 131-141
- Moscoso-Ramírez P., Ortiz-García C., Palma-López D., Ruiz-Beltrán P. y Sánchez Soto S. (2002) Incidencia de enfermedades letales en progenitores de Híbridos de cocotero en Tabasco, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 25 (003) 327:331

- Motta-Delgado, P. A. y Murcia-Ordoñez, B. (2011) Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas Ambiente y Agua. *Interdisciplinary Journal of Applied Science*. 6(2):77-90.
- Moura J. I., Toma R., Sgrillo R. B. y Delabie J. H. (2006) Natural efficiency of Parasitism by *Billae rhynchophorae* (Blanchard) (Diptera: Tachinidae) for the Control of *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleóptera: Curculionidae). *Neotropical Entomology*. 35(2):273-274.
- Murguía-González J, Landero-Torres I, Leyva-Ovalle OR, Galindo-Tovar ME, Llarena-Hernández RC, Presa-Parra E, García-Martínez MA. Efficacy and Cost of Trap-Bait Combinations for Capturing *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) in Ornamental Palm Polycultures. *Neotrop Entomol*. 2018 Apr;47(2):302-310.
- Navarro-Barranco, Hortensia, Brunner-Mendoza, Carolina, Reyes-Montes, María del Rocío, Duarte-Escalante, Esperanza, & Toriello, Conchita. (2019). Phenotypic and molecular analysis of Mexican *Metarhizium anisopliae* strains. *Revista mexicana de biodiversidad*, 90,: e902643.
- Niassy S, Maniania N, Subramanian S, Gitonga L, Mburu D, Masiga D, Ekesi S (2012) Selection of promising fungal biological control agent of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Lett Appl Microbiol* 54:487–493
- Oehlschlager A. C., Chinchilla C. M., González L. M., Jiron L. F. Mexzon R, y Morgan B, (1993) Development of a Pheromone-Based Trapping System for *Rhynchophorus palmarum* (Coleóptera: Curculionidae). *Ecology and Behavior*. 85(5):1381-1392
- Oehlschlager A. C., Chinchilla C., Castillo G. y González L. (2002) Control of Red Ring Disease by Mass Trapping of *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae). *Florida Entomological Society*. 85(3):507-513.

OEPP/EPPO (2007) Diagnostics *Rhynchophorus ferrugineus* and *Rhynchophorus palmarum*. Bulletin OEPP/EPPO: 37, 571-579.

Ormond, E.L., Thomas, A.P.M., Pugh, P.J.A., Pell, J.K., Roy, H.E., (2010). A fungal pathogen in time and space. The population dynamics of *Beauveria bassiana* in a conifer forest. FEMS Microbiol. Ecol. 74, 146–154.

Ortiz-Urquiza, Almudena, and Nemat O. Keyhani. (2013) "Action on the Surface: Entomopathogenic Fungi versus the Insect Cuticle" Insects 4, no. 3: 357-374. <https://doi.org/10.3390/insects4030357>

Ouedraogo, A., Fargues, J., Goettel, M y Lomer C.I. (1997) Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. Mycopathologia 137, 37–43

Paixão FRS, Huarte-Bonnet C, Ribeiro-Silva CdS, Mascarin GM, Fernandes ÉKK and Pedrini N (2021) Tolerance to Abiotic Factors of Microsclerotia and Mycelial Pellets From *Metarhizium robertsii*, and Molecular and Ultrastructural Changes During Microsclerotial Differentiation. Front. Fungal Biol. 2:654737

Palma-López D. J., Jiménez Ramírez R., Zavala-Cruz J., Bautista-Zúñiga F., Gavi Reyes F., Palma-Cancino D. Y. (2018). Actualización de la clasificación de suelos de Tabasco, México. Agro Productividad, 10(12), 29-35.

Patel, T. K. (2020). *Metarhizium*. Beneficial Microbes in Agro-Ecology, 593–610. doi:10.1016/b978-0-12-823414-3.00029-0

Potamitis I., Ganchev T. y Fakotakis N. 2008. Automatic bioacoustic detection of *Rhynchophorus ferrugineus*. 2008 16th European Signal Processing Conference, Lausanne, 1-4.

- Pu, Y.C. and Hou, Y.M. (2016), Isolation and identification of bacterial strains with insecticidal activities from *Rhynchophorus ferrugineus* Oliver (Coleoptera: Curculionidae). J. Appl. Entomol., 140: 617-626. <https://doi.org/10.1111/jen.12293>
- Pucheta D. M., Flores M. A., Rodríguez N. S., de la Torre M. (2006) Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos Interciencia. 31(12): 856-860
- Qayyum M., Saeed S., Wakil W., Nawaz A., Iqbal N., Yasin M., Chaurdhry M., Amjad M., Ahmed N., Riaz H., Bilal H., Hashem M., Alamri S(2021). Diversity and correlation of entomopathogenic and associated fungi with soil factors. Journal of King Saud University - Science, doi:10.1016/j.jksus.2021.101520
- Quesada-Moraga E.; Navas-Cortés J.; Maranhao E.; Ortiz-Urquiza A.; Santiago-Álvarez C (2007). Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. Mycological Research 111(8), 947–966.
- R Core Team (2020). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available online at: <https://www.R-project.org/>
- Randhawa, P.K., Mullen, C., Barbercheck, M., 2018. Plant identity, but not diversity, and agroecosystem characteristics affect the occurrence of *M. robertsii* in an organic cropping system. Biol. Contr. 124, 18–29.
- Rehner SA and Kepler RM. (2017) Species limits, phylogeography and reproductive mode in the *Metarhizium anisopliae* complex. J Invertebr Pathol. 148:60-66. doi: 10.1016/j.jip.2017.05.008
- Restrepo L. G., Rivera F. y Raigosa J. D. (1982) Ciclo de vida, hábitos y morfometría de *Metamasius hemipterus* Olivier y *Rhynchophorus palmarum* L. (coleóptera:

Curculionidae) en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Acta Agronómica. 32(1):33-44.

Riguetti Zanardo Botelho, A.B., Alves-Pereira, A., Colonhez Prado, R., Zucchi, M.I., & Delalibera Júnior, I. (2019). *Metarhizium* species in soil from Brazilian biomes: a study of diversity, distribution, and association with natural and agricultural environments. Fungal Ecology. 41: 289-300

Rochat, D.; Malosse, C.; Lettere, M.; Ducrot, P.; Zagatti, P.; Renou, M.; Descoins, C. 1991. Male-produced aggregation pheromone of the American palm weevil *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae): Collection, identification, electrophysiological activity and laboratory bioassay. J. Chem. Ecol. 17(11): 2127-2141.

Roy, H.E., Brodie, E.L., Chandler, D., Goettel, M.S., Pell, J.K., Wajnberg, E and Vega, F.E. 2010. Deep space and hidden depths: understanding the evolution and ecology of fungal entomopathogens. In: Roy, H.E., Vega, F.E., Chandler, D., Goettel, M.S., Pell, J.K y Wajnberg, E. (Eds.). The ecology of fungal entomopathogens. Springer. pp 1-6.

Salas A. J. (1980) El anillo Rojo del cocotero en varas áreas de Costa Rica. Agronomía Costarricense. 4(2):199-202 p.

Sánchez-Ríos O. F., Sánchez-Ríos L. L., Gutiérrez-López G., Aragón-Robles E., Córdova-Gómez G. 2017. Control Biológico de larvas de *Rhynchophorus palmarum* L., 1758 (Coleóptera: Curculionidae) en condiciones de laboratorio. Entomología mexicana. 4:192-197

SEMARNAT Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2002. NORMA Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000; Government of México: México City.

- Senthil Kumar CM, Jacob TK, Devasahayam S, Geethu C, Hariharan V (2021) Characterization and biocontrol potential of a naturally occurring isolate of *Metarhizium pingshaense* infecting *Conogethes punctiferalis*. *Microbiol Res.* 2021
- Sharma L., Oliveira I., Torres L., Marques G. (2018) Entomopathogenic fungi in Portuguese vineyards soils: suggesting a "Galeria-Tenebrio-bait method" as bait-insects *Galleria* and *Tenebrio* significantly underestimate the respective recoveries of *Metarhizium robertsii* and *Beauveria bassiana*. *MycKeys.* 38:1-23
- Sharma, L.; Oliveira, I.; Gonçalves, F.; Raimundo, F.; Singh, R.K.; Torres, L.; Marques, G. (2021) Effect of Soil Chemical Properties on the Occurrence and Distribution of Entomopathogenic Fungi in Portuguese Grapevine Fields. *Pathogens*, 10, 137.
- SIAP Servicio de Información Alimentaria y Pesquera (2023) Anuario estadístico de la producción agrícola [Online] (Actualizado 19 marzo 2023). Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> [Acceso 29 marzo 2023]
- Silva Sergent, F. A., Acosta-Hernández, B., Raduán Jaber, J., Rosario Medina, I., Ferrer Quintana, O., Real Valcárcel, F., Déniz Suárez, S. (2017). Preservation of *Malassezia pachydermatis* using skimmed milk as cryoprotective agent. *Journal of Microbiological Methods*, 132, 166–167. doi:10.1016/j.mimet.2016.12.003
- Skalicky A, Bohatá A, Simková J, Osborne LS, Landa Z. (2014) Selection of indigenous isolates of entomopathogenic soil fungus *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. *Folia Microbiol (Praha)*. Jul;59(4):269-76
- Steenberg, T., Langer, V., Esbjerg, P., 1995. Entomopathogenic fungi in predatory beetles (Col.: Carabidae and Staphylinidae) from agricultural fields. *Entomophaga* 40, 77–85.

- Stone, L.B.L., Bidochka, M.J. (2020) The multifunctional lifestyles of *Metarhizium*: evolution and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 9935–9945 <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10968-3>
- Sumano L. D., Sánchez S. S., Romero N. J. y Sánchez A. S. (2012) Eficacia de capturas de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleóptera: Dryophthoridae) con diferentes diseños de trampas en Tabasco, México. *Fitosanidad*. 16(1):43-48.
- Sutanto, K.D.; Al-Shahwan, I.M.; Husain, M.; Rasool, K.G.; Mankin, R.W.; Aldawood, A.S. Field Evaluation of Promising Indigenous Entomopathogenic Fungal Isolates against Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Dryophthoridae). *J. Fungi* 2023, 9, 68.
- Tamura K, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739
- Téllez-Jurado, A., Cruz-Ramírez, M. G., Mercado-Flores, Y., Asaff-Torres, A., y Arana-Cuenca, A.. (2009). Action and response mechanisms in relation of entomopathogenic fungi and insects. *Revista mexicana de micología*, 30, 73-80
- Toriello C, Montoya-Sanson E, Zavala-Ramírez M, Navarro-Barranco H, Basilio-Hernández D, Hernández-Velazquez V, Mier, T (2008) Virulencia y termotolerancia de cultivos monosporicos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta (Hemiptera: Cercopidae). *Rev Mex Micol* 28:57–66
- Uzman, D., Pliester, J., Leyer, I., Entling, M. H., & Reineke, A. (2018). Drivers of entomopathogenic fungi presence in organic and conventional vineyard soils. *Applied Soil Ecology*. 113(1):89-97

- Vásquez-Ordóñez, A. A., Löhr, B. L., & Marvaldi, A. E. (2020). Comparative morphology of the larvae of the palm weevils *Dynamis borassi* (Fabricius) and *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus) (Curculionidae: Dryophthorinae): Two major pests of peach palms in the Neotropics. *Papeis Avulsos De Zoologia*, 60(27):1-14
- Vega, F. E., Meyling, N. V., Luangsa-ard, J. J., y Blackwell, M. (2012). Fungal Entomopathogens. *Insect Pathology*, 171–220. doi:10.1016/b978-0-12-384984-7.00006-3
- Watanapongsiri A. 1966. A revision of the genera *Rhynchophorus* and *Dynamis* (Coleoptera: Curculionidae). Thesis, Oregon State University. 418 p.
- White T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols A. Guide to Methods and Applications*. 38 (5):315-322
- Wyrebek, M., Huber, C., Sasan, R.K., Bidochka, M.J., (2011) Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. *Microbiology* 157, 2904e2911.
- Zimmermann, G. (1986). The “*Galleria* bait method” for the detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology*, 102(1-5), 213–215. doi:10.1111/j.1439-0418.1986.tb00912.x

ANEXO(S)

Anexo 1. List of *Metarrhizium* spp strains obtained from coconut plantations in Tabasco, Mexico

Strain	Gender	Sampling site	Average Conidium Size Length and width
PIN 141.1	Metarrhizium spp	Cunduacan	7.05 μm x 2.33 μm
PIN 142.1	Metarrhizium spp	“ “	7.18 μm x 2.42 μm
PIN 222.1	Metarrhizium spp	“ “	7.62 μm x 2.16 μm
PIN 511.1	Metarrhizium spp	“ “	6.88 μm x 2.47 μm
PIN 521.1	Metarrhizium spp	“ “	7.38 μm x 2.51 μm
PIN 522.1	Metarrhizium spp	“ “	7.35 μm x 2.43 μm
PIN 531.1	Metarrhizium spp	“ “	7.41 μm x 2.29 μm
PIN 532.1	Metarrhizium spp	“ “	7.09 μm x 2.13 μm
PIN 533.1	Metarrhizium spp	“ “	7.84 μm x 2.59 μm
PIN 534.1	Metarrhizium spp	“ “	7.66 μm x 2.45 μm
PIN 535.1	Metarrhizium spp	“ “	7.2 μm x 2.39 μm
PIN 541.1	Metarrhizium spp	“ “	7.11 μm x 2.07 μm
PIN 611.1	Metarrhizium spp	“ “	7.45 μm x 2.21 μm
PIN 612.1	Metarrhizium spp	“ “	7.09 μm x 2.63 μm
PIN 613.1	Metarrhizium spp	“ “	7.72 μm x 2.29 μm
PIN 621.1	Metarrhizium spp	“ “	7.56 μm x 2.31 μm
PIN 622.1	Metarrhizium spp	“ “	7.79 μm x 2.44 μm
PIN 623.1	Metarrhizium spp	“ “	7.38 μm x 2.52 μm
PIN 624.1	Metarrhizium spp	“ “	7.31 μm x 2.63 μm

PIN 631.1	Metarrhizium spp	“ “	7.33 μm x 2.12 μm
Strain	Gender	Sampling site	Average Conidium Size Length and width
PIN 141.1	Metarrhizium spp	Cunduacan	7.05 μm x 2.33 μm
PIN 142.1	Metarrhizium spp	“ “	7.18 μm x 2.42 μm
PIN 222.1	Metarrhizium spp	“ “	7.62 μm x 2.16 μm
PIN 511.1	Metarrhizium spp	“ “	6.88 μm x 2.47 μm
PIN 521.1	Metarrhizium spp	“ “	7.38 μm x 2.51 μm
PIN 522.1	Metarrhizium spp	“ “	7.35 μm x 2.43 μm
PIN 531.1	Metarrhizium spp	“ “	7.41 μm x 2.29 μm
PIN 532.1	Metarrhizium spp	“ “	7.09 μm x 2.13 μm
PIN 533.1	Metarrhizium spp	“ “	7.84 μm x 2.59 μm
PIN 534.1	Metarrhizium spp	“ “	7.66 μm x 2.45 μm
PIN 535.1	Metarrhizium spp	“ “	7.2 μm x 2.39 μm
PIN 541.1	Metarrhizium spp	“ “	7.11 μm x 2.07 μm
PIN 611.1	Metarrhizium spp	“ “	7.45 μm x 2.21 μm
PIN 612.1	Metarrhizium spp	“ “	7.09 μm x 2.63 μm
PIN 613.1	Metarrhizium spp	“ “	7.72 μm x 2.29 μm
PIN 621.1	Metarrhizium spp	“ “	7.56 μm x 2.31 μm
PIN 622.1	Metarrhizium spp	“ “	7.79 μm x 2.44 μm
PIN 623.1	Metarrhizium spp	“ “	7.38 μm x 2.52 μm
PIN 624.1	Metarrhizium spp	“ “	7.31 μm x 2.63 μm
PIN 631.1	Metarrhizium spp	“ “	7.33 μm x 2.12 μm

PIN 641.1	Metarrhizium spp	“ “	7.49 μm x 2.5 μm
<i>Strain</i>	<i>Gender</i>	<i>Sampling site</i>	<i>Average Conidium Size Length and width</i>
PIN 642.1	Metarrhizium spp	“ “	7.64 μm x 2.59 μm
PIN 711.1	Metarrhizium spp	“ “	7.23 μm x 2.64 μm
PIN 712.1	Metarrhizium spp	“ “	7.56 μm x 2.73 μm
PIN 721.1	Metarrhizium spp	“ “	7.85 μm x 2.34 μm
PIN 722.1	Metarrhizium spp	“ “	7.62 μm x 2.51 μm
PIN 731.1	Metarrhizium spp	“ “	7.17 μm x 2.63 μm
PIN 751.1	Metarrhizium spp	“ “	7.68 μm x 2.51 μm
PIN 753.1	Metarrhizium spp	“ “	7.87 μm x 2.49 μm
PIN 754.1	Metarrhizium spp	“ “	7.68 μm x 2.33 μm
PIN 841.1	Metarrhizium spp	“ “	7.34 μm x 2.69 μm
PIN 911.1	Metarrhizium spp	“ “	7.39 μm x 2.45 μm
PIN 912.1	Metarrhizium spp	“ “	7.15 μm x 2.53 μm
PIN 913.1	Metarrhizium spp	“ “	6.95 μm x 2.21 μm
PIN 931.1	Metarrhizium spp	“ “	7.45 μm x 2.64 μm
PIN 932.1	Metarrhizium spp	“ “	7.59 μm x 2.38 μm
PIN 941.1	Metarrhizium spp	“ “	7.65 μm x 2.12 μm
PIN 951.1	Metarrhizium spp	“ “	7.81 μm x 2.68 μm
PIN 031.1	Metarrhizium spp	“ “	7.79 μm x 2.02 μm
PAL 111.1	Metarrhizium spp	Cardenas	7.12 μm x 2.13 μm
PAL 121.1	Metarrhizium spp	“ “	7.42 μm x 2.3 μm

PAL 122.1	Metarrhizium spp	“ “	7.54 μm x 2.53 μm
PAL 123.1	Metarrhizium spp	“ “	7.72 μm x 2.62 μm

Strain	Gender	Sampling site	Average Conidium Size Length and width
PAL 231.1	Metarrhizium spp	“ “	7.68 μm x 2.41 μm
PAL 232.1	Metarrhizium spp	“ “	7.65 μm x 2.53 μm
PAL 233.1	Metarrhizium spp	“ “	7.08 μm x 2.12 μm
PAL 241.1	Metarrhizium spp	“ “	7.62 μm x 2.18 μm
PAL 242.1	Metarrhizium spp	“ “	7.75 μm x 2.43 μm
PAL 311.1	Metarrhizium spp	“ “	7.5 μm x 2.22 μm
PAL 312.1	Metarrhizium spp	“ “	7.59 μm x 2.38 μm
PAL 321.1	Metarrhizium spp	“ “	7.23 μm x 2.33 μm
PAL 421.1	Metarrhizium spp	“ “	7.61 μm x 2.75 μm
PAL 711.1	Metarrhizium spp	“ “	7.28 μm x 2.11 μm
PAL 712.1	Metarrhizium spp	“ “	7.12 μm x 2.58 μm
PAL 713.1	Metarrhizium spp	“ “	7.62 μm x 2.45 μm
PAL 714.1	Metarrhizium spp	“ “	7.31 μm x 2.32 μm
PAL 715.1	Metarrhizium spp	“ “	7.68 μm x 2.46 μm
PAL 721.1	Metarrhizium spp	“ “	7.15 μm x 2.51 μm
PAL 722.1	Metarrhizium spp	“ “	7.13 μm x 2.43 μm
PAL 731.1	Metarrhizium spp	“ “	7.35 μm x 2.08 μm
PAL 732.1	Metarrhizium spp	“ “	7.46 μm x 2.63 μm
PAL 733.1	Metarrhizium spp	“ “	7.37 μm x 2.28 μm

PAL 735.1	Metarrhizium spp	“ “	7.05 μm x 2.33 μm
PAL 736.1	Metarrhizium spp	“ “	7.6 μm x 2.73 μm

Strain	Gender	Sampling site	Average Conidium Size Length and width
PAL 751.1	Metarrhizium spp	“ “	7.36 μm x 2.58 μm
PAL 752.1	Metarrhizium spp	“ “	7.75 μm x 2.16 μm
PAR 631.1	Metarrhizium spp	Paraíso	7.21 μm x 2.57 μm [