



**IBCIENCIAS**  
**IBCIENCIAS**  
**IBCIENCIAS**



# IBCIENCIAS



[www.biociencias.unach.mx/ibciencias](http://www.biociencias.unach.mx/ibciencias)



Volumen 6 · Número 2 · Diciembre · 2023

Revista científica electrónica

*Instituto de Biociencias de la Universidad Autónoma de Chiapas, México*



Volumen 6 · Número 2 · Diciembre · 2023

[www.biociencias.unach.mx/ibciencias](http://www.biociencias.unach.mx/ibciencias)

IBCIENCIAS, volumen 6, número 2, Julio-Diciembre 2023, es una revista científica digital de publicación semestral editada por la Universidad Autónoma de Chiapas, a través del Instituto de Biociencias, Boulevard Príncipe Akishino sin número, Col. Solidaridad 2000, Tapachula, C.P. 30798, Chiapas, México. Tel. (962) 64 2 7972, [www.biociencias.unach.mx/ibciencias](http://www.biociencias.unach.mx/ibciencias), [ibciencias.revista@gmail.com](mailto:ibciencias.revista@gmail.com). Editor responsable: Dr. Alfredo Vázquez Ovando. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo No. 04-2022-070614284600-102, ISSN en trámite, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número Dr. Alfredo Vázquez Ovando; Boulevard Príncipe Akishino sin número, Col. Solidaridad 2000, Tapachula, C.P. 30798, Chiapas, México.

# CONTENIDO

---

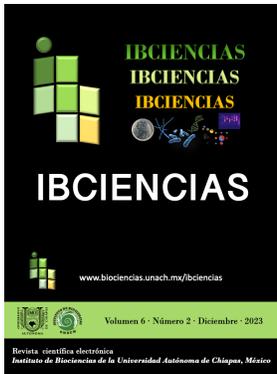
Diciembre de 2023 / Vol 6 / Num 2

- 46-53** **Efecto de la temperatura y el fotoperiodo en la diapausa de *Doryctobracon areolatus* bajo condiciones de laboratorio.** Esteban Velázquez Espinosa, Alfredo Vázquez-Ovando, Didiana Galvez-López, Pablo Montoya.
- 54-58** **Germinación *in vitro* de semillas de *Guaiacum sanctum* L., especie de importancia comercial y medicinal.** Carolina Orantes-García, Nidia del Carmen Ríos-de León, Alma Gabriela Verdugo-Valdez.
- 59-64** **Capacidad repelente de nanopartículas de extractos etanólicos de propóleos de abejas nativas contra *Colaspis hypochlora*.** Lizbeth Figueroa-Constantino, José Alfonso López-García, Víctor Albores-Flores, María Guadalupe de Gyves-Córdova, Julieta Grajales- Conesa, Betsabé Rodríguez-Pérez, Claudia Ivette Albores-Flores.
- 65-71** **Estudio de la diversidad de microalgas y peces en las lagunas La Encantada y Bosque Azul del Parque Nacional Lagunas de Montebello.** Silvia Monserrat Morales-Hernández, Alfonso Ángel González-Díaz, Arnulfo Rosales-Quintero, Víctor Manuel Ruiz-Valdiviezo, José Humberto Castañón-González.



Volumen 6 · Número 2 · Diciembre · 2023

[www.biociencias.unach.mx/ibciencias](http://www.biociencias.unach.mx/ibciencias)



## Efecto de la temperatura y el fotoperiodo en la diapausa de *Doryctobracon areolatus* bajo condiciones de laboratorio

Esteban Velázquez Espinosa<sup>1,2</sup>, Alfredo Vázquez-Ovando<sup>2</sup>, Didiana Galvez-López<sup>2</sup>, Pablo Montoya<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa Moscafrut SENASICA-IICA, Metapa de Domínguez, Chiapas, México.

<sup>2</sup>Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas, Tapachula, Chiapas, México.

### Resumen

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de la temperatura y el fotoperiodo sobre la progenie de *Doryctobracon areolatus*. Se registró la aparición, proporción de sexos y proporción de individuos que entraron o rompieron la diapausa, para comprender cómo estos factores influyen en la aparición de la diapausa y así desarrollar estrategias efectivas para fortalecer su crianza en laboratorio. En condiciones de laboratorio se evaluaron dos temperaturas (21 y 26 °C) y tres condiciones de fotoperiodo (16: 08, 12: 12 y 08: 16, horas de luz: oscuridad). Ambos factores mostraron influencia significativa en el porcentaje de aparición de adultos, la proporción de sexos y el número de adultos que atravesaron la diapausa. La proporción de crías que entraron en diapausa fue menor de lo esperado, lo que se asocia con el elevado número de generaciones de esta cepa con una fuerte selección de individuos no diapausados a lo largo del tiempo. A 26 °C se registró la mayor emergencia de adultos a partir de pupas en diapausa, los cuales comenzaron a emerger dos meses después del inicio de la diapausa y continuaron hasta el octavo mes. A 21 °C, la emergencia desde pupas en diapausa comenzó en el quinto mes y continuó durante dos meses más, lo que sugiere que la baja temperatura actuó como un factor limitante para la continuación de la misma. El efecto del fotoperiodo fue menos claro, pero se observó que la mayor ruptura de la diapausa se produjo en la relación L: O de las 12: 12 h en ambas temperaturas, y que la mejor proporción de hembras emergió en la relación de las 08: 16 h. L: O. Nuestros resultados sugieren que los factores evaluados ejercen un efecto en la ruptura de la diapausa en *D. areolatus*, y que esto podría estar relacionado con la fenología de sus hospedantes. Estos resultados también proporcionan un mejor apoyo para la óptima gestión de las condiciones ambientales en el proceso de su cría artificial.

### Palabras clave:

Control biológico  
Cría artificial  
Enemigo natural  
Mosca de la fruta  
Parasitoides

### Keywords:

Biological control  
Artificial rearing  
Natural enemy  
Fruit flies  
Parasitoids

## Effect of temperature and photoperiod on the diapause of *Doryctobracon areolatus* under laboratory conditions

### Abstract

Determine the effect of the temperature and photoperiod on the progeny of *Doryctobracon areolatus* was the main objective. The emergence, sex ratio and proportion of individuals that entered or broke diapause were recorded to understand how these factors influence the occurrence of diapause, and thus develop effective strategies to strengthen their lab rearing. Two temperatures (21 and 26 °C) and three photoperiod conditions (16: 08, 12: 12 and 08: 16, light: darkness hours) were evaluated under laboratory conditions. Both factors showed significant influence on the percent of adult emergence, the sex ratio, and the number of adults broking diapause. The proportion of the offspring entering diapause was lower than expected, which is associated to the high number of generations with strong selection of non-diapausal individuals in this strain over time. At the temperature of 26 °C, a greater adult emergence from diapausing pupa was recorded, which began to emerge two months after the start of diapause and continued until the eighth month. At 21 °C the emergence from diapausing pupa began at month five and continued for two more months, suggesting that lower temperature acted as a limiting factor for the continuation of the diapause. The effect of the photoperiod was less clear but was observed that the greatest rupture of diapause occurred in the 12: 12 h L: D ratio in both types of temperatures, and that the best proportion of females emerged in the ratio of 08: 16 h L: D. Our results suggest that the evaluated factors exert an effect on diapause breaking in *D. areolatus*, and that this could be related to its hosts phenology. This also provides a better support for an optimal management of environmental conditions in the process of their artificial rearing.

\* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,  
Universidad Autónoma de Chiapas. Boulevard Príncipe Akishino sin número. Colonia Solidaridad 2000, Tapachula, Chiapas, México. C.P. 30798. Teléfono: + 52 9626427972. Correo-electrónico: pablo.montoya@unach.mx

## 1. Introducción

En el manejo integrado de moscas de la fruta se emplean diversas técnicas para la supresión de poblaciones plaga, dentro de las cuales se encuentra el control biológico por la acción de enemigos naturales. En México, el control biológico contra este tipo de plagas se ha desarrollado por la liberación aumentativa de la especie exótica *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) (Montoya et al., 2000; Montoya et al., 2007) con la cual se han obtenido resultados favorables. Sin embargo, existe un gremio amplio de especies nativas de parasitoides con un gran potencial para llevar a cabo este tipo de control, donde destaca *Doryctobracon areolatus* (Szpegletti) (Hymenoptera: Braconidae) como la especie con el mayor porcentaje de parasitismo natural en el campo (Montoya et al., 2016; Montoya et al., 2017), y que además ataca estadios tempranos (huevos y larvas de primer y segundo *instar*) de este tipo de plagas (Murillo et al., 2015).

*Doryctobracon areolatus* se distribuye desde el sur de Texas, E.U.A. hasta el norte de Argentina asociado con moscas del género *Anastrepha* Schiner (Diptera: Tephritidae), principalmente *A. obliqua* (McQuart), *A. ludens* (Loew), y *A. fraterculus* (Wiedemann) (Aluja et al., 2000; Aluja et al., 2003; Montoya et al. 2017; Ovruski et al., 2000; Serra et al., 2011). Esta especie presenta una notable diapausa con duración variable (Cruz-Bustos et al., 2020, 70-278 días; Carvalho, 2005, 414 días; Ovruski et al., 2016, 131-426 días). La diapausa está comprendida entre los mecanismos de defensa fisiológica que ayudan a los insectos a sobrevivir bajo condiciones ambientales extremas (Cuellar et al., 2005). Este periodo puede variar dependiendo de las condiciones ambientales y de las adaptaciones genéticas de las especies con su entorno ecológico (Hahn y Denlinger, 2011; Kostal, 2006). La diapausa es un fenómeno complejo influenciado por factores como el fotoperiodo, la temperatura y la humedad (Corley, 2001; Denlinger, 2002; Fen et al., 2006; Hahn y Denlinger, 2011), los cuales pueden actuar de manera independiente o interactuando en la inducción y/o rompimiento de la diapausa (Gullan y Cranston, 2010; Salazar et al., 2000). La mayoría de los estudios realizados incluyen insectos de climas fríos y templados donde los cambios de los factores ambientales están bien definidos y se correlacionan también con la fenología de sus hospederos (Dambroski y Feder 2007; Logarzo y Gandolfo 2005; Mozghan et al., 2017).

La diapausa en insectos de climas tropicales también se presenta como una estrategia de desarrollo para sortear la adversidad y sincronizar con los ciclos estacionales de sus hospederos; puede ser tan larga como las que se observan en latitudes templadas, pero en el trópico los patrones de temperatura, lluvia y fotoperiodo aportan sólo una parte de la estacionalidad pues la presión selectiva también proviene de factores bióticos (Denlinger, 1986).

Algunos insectos tropicales entran en diapausa en respuesta a la presencia de días cortos, pero el efecto crítico de la longitud del día no ha sido bien definido (Denlinger, 1986),

mientras que en algunos casos juega un papel secundario (Fangsen et al., 2002). Se ha reportado que la duración del día puede ser un indicador estacional importante en las latitudes altas de los trópicos donde la duración corta del día puede ser un consistente inductor de diapausa; por ejemplo, en el gusano del algodón *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Zhudong et al., 2006), barrenador del maíz *Diatraea grandiosella* (Kikukawa y Chippendale, 1983), y en la mosca del vinagre *Drosophila montana* (Salminen y Hoikkala, 2013). Sin embargo, en latitudes cercanas al ecuador (entre 5° N y 5° S), el efecto del cambio estacional en la duración del día parece estar ausente por lo que no se le relaciona como un regulador importante de la diapausa (Denlinger, 1986). Los cambios en la temperatura también pueden ejercer influencia sobre la diapausa en insectos tropicales. En larvas de *Leptopiliana bouardi*, un parasitoide de *Drosophila melanogaster* (Carton y Claret, 1982), la diapausa se evita a 25 °C, pero se expresa a partir de 22. 5 °C. Una exposición de 10 días a 25 °C termina con la diapausa, la cual se correlaciona más con la baja de temperatura que con cambios en el fotoperiodo o la humedad. En otros casos el inicio de la diapausa de verano está asociada con las altas temperaturas. Chenga et al. (2017) reportan para la chinche de la flor del trigo *Sitodiplosis mosellana* (Géhin) (Diptera: Cecidomyiidae) las larvas de campo entraron en diapausa en junio y que ésta terminó en septiembre cuando la temperatura media diaria descendió de los 20 °C. En el caso del barrenador de la vaina de la soya *Leguminivora glycinivorella* se encontró que la diapausa de verano se mantuvo durante los días largos pero que terminó con la transición fotoperiódica a días cortos (Yoshimura et al., 2021); sin embargo, estos autores reconocen que en áreas de latitud relativamente baja la diapausa de verano se presenta de una manera débil o podría no presentarse.

El impacto de las condiciones ambientales previamente descritas sobre la biología y la presencia o rompimiento de la diapausa en *D. areolatus* es completamente desconocido, por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la temperatura y el fotoperiodo sobre la progenie de esta especie, registrando la emergencia, proporción sexual y proporción de individuos que entran o rompen diapausa. Lo anterior ayudará a entender mejor el comportamiento biológico de *D. areolatus* y al desarrollo de estrategias efectivas para su colonización y cría masiva, con el objeto de utilizar esta especie en el control biológico por aumento de moscas de la fruta del género *Anastrepha*.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Condiciones del laboratorio

Las evaluaciones se realizaron en el laboratorio de control biológico de la Subdirección de Desarrollo Tecnológico del Programa Moscas de la Fruta SADER-SENASICA ubicado en Metapa de Domínguez, Chiapas, México. Las condiciones ambientales específicas estuvieron determinadas por los tratamientos en cada etapa experimental como se describe más adelante.

## 2.2. Material biológico

Los ejemplares de *D. areolatus* fueron proporcionados por la cría experimental que se tiene en el laboratorio de Control Biológico. Se obtuvieron adultos emergidos y pupas que presentaban un mes en diapausa, los cuales se sometieron a diferentes condiciones de temperatura y fotoperiodo según correspondió a cada tratamiento. Se emplearon como hospederos larvas de *A. ludens* de segundo instar sin irradiar proporcionadas por la Planta Moscafrut ubicada en Metapa de Domínguez, Chiapas, México.

## 2.3. Efecto de la temperatura y el fotoperiodo sobre la emergencia, proporción sexual e individuos diapáusicos en la progenie

Esta prueba se realizó utilizando simultáneamente dos temperaturas diferentes (21 y 26 °C) y tres condiciones de fotoperiodo (16: 08, 12: 12 y 08: 16, horas luz: oscuridad). Para lograr lo anterior se adecuaron dos estantes de 1.60 x 1.20 m L/A con tres compartimentos de 1 x 50 m L/A, donde se brindaron las condiciones de fotoperiodo y temperaturas correspondientes. En cada compartimento se colocó una lámpara de luz de 100 W que proporcionó una intensidad lumínica entre 400 y 500 luxes; cada lámpara estuvo regulada por un equipo Timer (marca: Senelec, modelo: 4335/2567) para obtener el fotoperiodo correspondiente. Los compartimientos en cada estante se forraron con material de cartoncillo color negro para aislar a los individuos bajo experimentación de la luz exterior, siguiendo procedimientos descritos previamente (Arredondo et al., 2018; Arredondo y Díaz-Fleischer, 2011a; Arredondo y Díaz-Fleischer, 2011b). En contenedores de plástico de 1.5 L de capacidad con abertura de 10.5 cm de diámetro se colocaron 10 parejas de parasitoides adultos de 5 días de edad, maduros sexualmente, donde se les proporcionó agua en bebederos de 60 mL con mecha de papel filtro, y alimento a base de miel mezclada con papel seda (Montoya et al., 2012). La abertura de los contenedores se cubrió con tela tipo gasa para permitir la aireación. Los contenedores se colocaron en los compartimientos previamente descritos para proporcionar las condiciones de temperatura y fotoperiodo en cada tratamiento. Durante 10 días consecutivos, en cada contenedor se introdujo una unidad de parasitación consistente en una guayaba a la que se removió el mesocarpio para introducir 100 larvas de *A. ludens* de segundo estadio con dieta como hospedero para *D. areolatus* (López-Arriaga et al., 2022), obteniendo una proporción de 10 larvas por cada hembra. La guayaba se sujetó con un alambre a un adherible en la parte superior del contenedor y se mantuvo durante 24 h. Después del tiempo de exposición, la guayaba se retiró y las larvas se colocaron en dieta para que continuaran su desarrollo.

Cuando las larvas alcanzaron el tercer estadio, la dieta se removió con agua y las larvas se mezclaron con vermiculita fina como sustrato de pupación. Con la emergencia de adultos se determinaron los porcentajes de emergencia, la

proporción sexual, y la proporción de individuos que entraron en diapausa. Los individuos diapausantes se identificaron usando un microscopio estereoscópico (Carl ZEISS, Mod. 37081, Alemania) donde se colocaron las pupas sobre la lámpara (1000 luxes) logrando observar a los inmaduros dentro de los puparios. Las temperaturas en cada tratamiento (21 y 26 ±1 °C) se proporcionaron en cuartos diferentes con equipos mini Split marca TRANE y se monitorearon diariamente con un termómetro de mercurio. Se realizaron 24 repeticiones de cada tratamiento.

## 2.4. Efecto de la temperatura y la humedad en el rompimiento de diapausa

Del material producido de la cría experimental de *D. areolatus*, se obtuvieron pupas que presentaban diapausa de un mes posterior a la emergencia de adultos no diapáusicos. Para cada uno de los tratamientos ya descritos (combinación temperatura/fotoperiodo), se colocaron 20 pupas que previamente fueron verificadas de contener inmaduros en su interior en una caja Petri por cada repetición, las cuales se revisaron diariamente durante 12 meses para determinar la proporción de individuos que rompieron diapausa, el tiempo promedio de la diapausa y la proporción sexual de los adultos emergidos. Se realizaron 12 repeticiones para cada tratamiento.

## 2.5. Análisis de datos

La temperatura y el fotoperiodo se consideraron como factores en todos los análisis. Las variables expresadas como proporciones (porcentajes de emergencia, proporción sexual, proporción de individuos con diapausa, y proporción de individuos que rompieron diapausa) se analizaron mediante un modelo lineal generalizado usando una distribución binomial y la función *logit link*; para la comparación entre tratamientos se emplearon contrastes ortogonales. Las curvas de emergencia de individuos diapáusicos en los diferentes tratamientos se compararon con la prueba de Log-rank. Todos los análisis se realizaron con el software JMP®, empleado un nivel de significancia de 5%.

## 3. Resultados

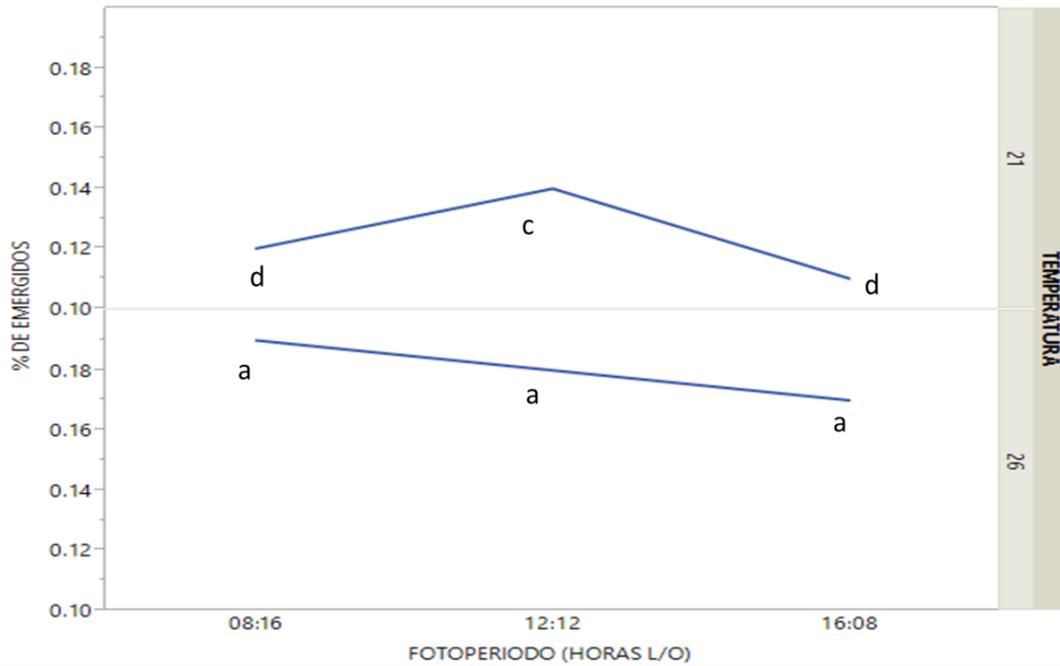
### 3.1 Efectos en la progenie y proporción de individuos diapáusicos

La temperatura y el fotoperiodo ejercieron efecto significativo sobre la emergencia de la progenie de *D. areolatus*, ( $\chi^2 = 272.142$ ,  $gl=1$ ,  $P<0.0001$ ) y ( $\chi^2=28.36$ ,  $gl=2$ ,  $P<0.0001$ ) respectivamente, presentándose una interacción significativa entre ambos factores ( $\chi^2=8.32$ ,  $gl=2$ ,  $P=0.0153$ ). La emergencia fue mayor en la temperatura de 26 °C y con fotoperiodo de 08: 16 L: O. A 21 °C la emergencia más alta se observó con el fotoperiodo 12: 12 (Figura 1).

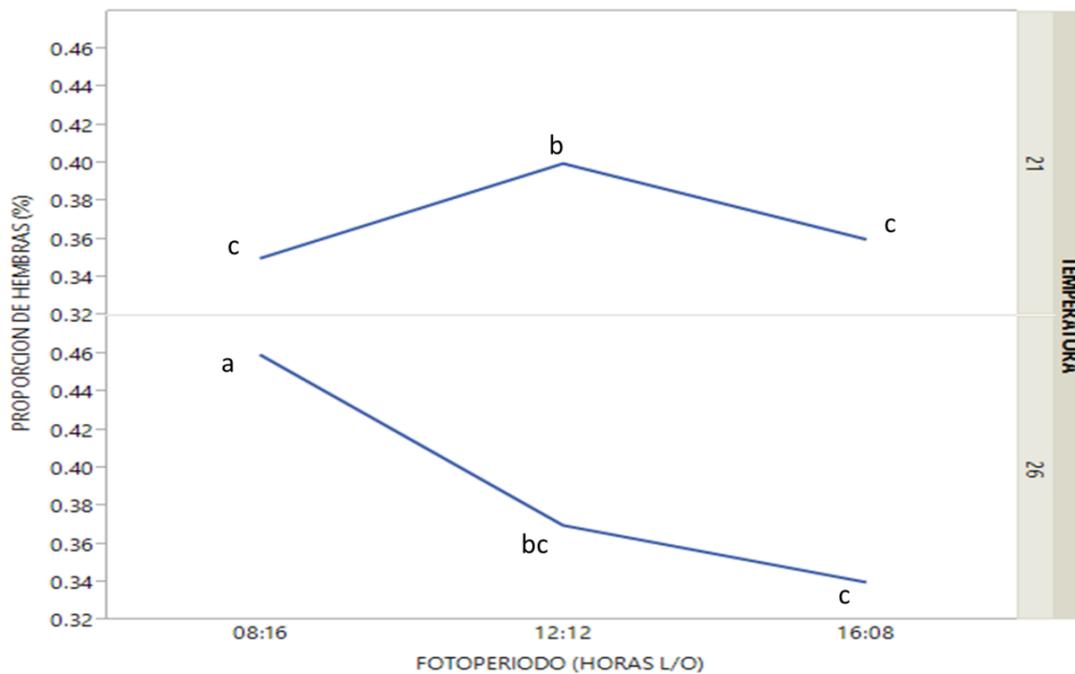
La proporción de la descendencia en diapausa no presentó diferencia significativa entre 21 y 26 °C ( $\chi^2=0.09$ ,  $gl=1$ ,  $P=0.7563$ ). El fotoperiodo tampoco tuvo efecto en la incidencia de diapausa de la progenie ( $\chi^2=1.151$ ,  $gl=2$ ,

P=0.5623), ni se presentó interacción significativa entre factores ( $\chi^2=4.47$ ,  $gl=2$ ,  $P=0.106$ ). Se observó proporción sexual sesgada a machos, la cual no fue afectada de manera significativa por la temperatura ( $\chi^2=2.79$ ,  $gl=1$ ,  $P=0.09$ ), pero sí por el fotoperiodo ( $\chi^2=16.64$ ,

$gl=2$ ,  $P=0.0002$ ). La interacción entre ambos factores también fue significativa ( $\chi^2=31.54$ ,  $gl=2$ ,  $P<0.0001$ ). A 26 °C y fotoperiodo de 08: 16 horas L: O se observó la mayor proporción de hembras ( $P<0.05$ ), mientras que, a 21 °C, ésta se obtuvo con 12: 12 horas luz: oscuridad (Figura 2).



**Figura 1.** Proporción de emergencia de *D. areolatus* bajo condiciones de 21 y 26 ±1 °C de temperaturas y tres fotoperiodos. (Letras diferentes indican diferencia significativa,  $P<0.05$ ).

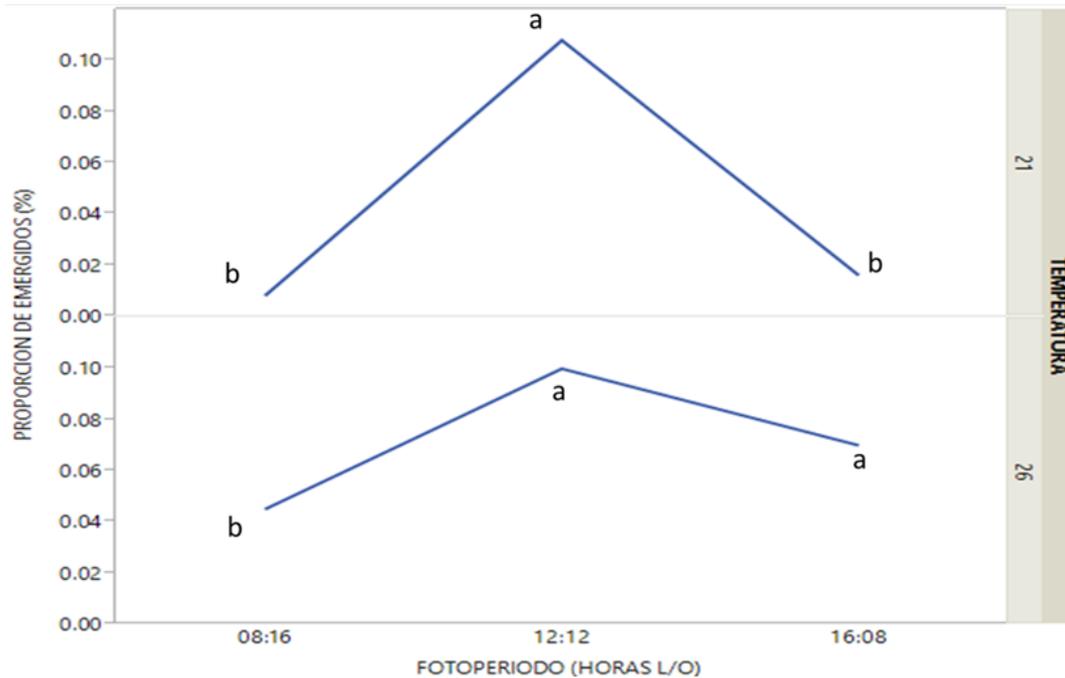


**Figura 2.** Proporción sexual obtenida de la descendencia de *D. areolatus* bajo condiciones ambientales de 21 y 26 ±1 °C de temperatura y tres fotoperiodos. (Letras diferentes indican diferencia significativa,  $P<0.05$ ).

### 3.2 Rompimiento de diapausa

La temperatura y el fotoperiodo tuvieron un efecto significativo sobre la emergencia de adultos de pupas en diapausa ( $\chi^2=12.64$ ,  $gl=1$ ,  $P=0.0004$ ) y ( $\chi^2=34.03$ ,  $gl=2$ ,  $P<0.0001$ ), respectivamente. La interacción entre ambos factores también fue significativa ( $\chi^2=10.94$ ,  $gl=2$ ,  $P=0.0042$ ). La mayor emergencia se presentó en la temperatura de 26 °C con un fotoperiodo de 12:12 horas luz: oscuridad. La

emergencia fue menor a 21 °C, pero nuevamente en el fotoperiodo 12:12 se observó un porcentaje de emergencia significativamente mayor ( $P=0.02$ ) que en los fotoperiodos de 08:16 y 16:08 (Figura 3). No se presentaron diferencias significativas en la proporción de hembras emergidas entre ambas temperaturas ( $\chi^2=0.63$ ,  $gl=1$ ,  $P=0.042$ ) y los tres fotoperiodos ( $\chi^2=1.86$ ,  $gl=2$ ,  $P=0.39$ ).



**Figura 3.** Proporción de hembras obtenida de la emergencia de pupas en diapausa mantenidas a 21 y 26 ±1°C de temperatura y tres fotoperiodos diferentes. (Letras diferentes indican diferencia significativa,  $P<0.05$ ).

En la Figura 4 se puede apreciar emergencia de adultos acumulada de las pupas diapáusicas a través del tiempo. Se observó diferencia significativa entre ambos tipos de curvas (log-rank test  $\chi^2=4.84$ ,  $gl=1$ ,  $P=0.02$ ). A 26 °C, los adultos de *D. areolatus* emergieron más rápidamente y en mayor número que de las pupas mantenidas a 21 °C. A 26 °C, la emergencia inició a los dos meses y se prolongó durante ocho meses, mientras que a 21 °C la emergencia inició a los cinco meses y se prolongó solamente durante dos meses más. El resto de las pupas sin emerger se mantuvieron durante un año y posteriormente fueron dadas de baja al verificar que se encontraban muertas.

## 4. Discusión

En diferentes latitudes los insectos han desarrollado estrategias estacionales para hacer frente a cambios recurrentes en las condiciones de entorno ambiental (Gotthard y Wheat, 2019; Tauber et al., 1986). El fotoperiodo, la temperatura, la humedad y la fenología del hospedante se identifican como las principales señales para la inducción de la diapausa (Kostal, 2011) en cada latitud, donde el fotoperiodo y la temperatura se manifiestan

predominantes para la mayoría de los insectos (Anduaga et al., 2018; Terao et al., 2012). Nuestros resultados con *D. areolatus* muestran que bajo condiciones de una latitud tropical la temperatura y el fotoperiodo ejercieron influencia significativa en los porcentajes de emergencia de adultos, la proporción sexual y en el número de individuos que rompieron diapausa.

Los insectos tropicales a menudo ingresan en diapausa como respuesta a cambios en la temperatura y el fotoperiodo, así como en la presencia o ausencia de sus hospederos (Denlinger, 1986). En el caso del barrenador del maíz *D. grandiosella*, se encontró que la duración del día y la temperatura sirvieron como señales para el inicio de la diapausa larvaria (Kikukawa y Chippendale, 1983). En el parasitoide *C. bouldardi* se observó que 22.5 °C fue la temperatura umbral para inducir la diapausa y que 10 días a 25 °C fueron suficientes para romperla (Claret y Carton, 1980). De acuerdo con Butler et al. (1985), las altas temperaturas funcionan como el principal estímulo para el inicio de la diapausa de verano en varias especies de insectos tropicales como el gusano del tabaco *Heliothis virescens*, y el gusano del algodón *H. armigera*. Sin embargo, en

nuestro caso la descendencia de *D. areolatus* que entró en diapausa no estuvo relacionada con las variaciones en la temperatura ni la presencia de los diferentes fotoperiodos.

La proporción de la descendencia que entró en diapausa en este trabajo contrasta con lo reportado por Cruz-Bustos et al. (2020), quienes trabajando con la misma cepa de *D. areolatus* observaron en la progenie altos porcentajes de diapáusicos (49-27%). La principal causa de estas diferencias puede ser atribuida a que nuestro estudio se llevó a cabo con una cepa sujeta a varias generaciones de selección exclusiva de individuos no diapáusicos, ocasionando que la proporción de éstos fuera disminuyendo progresivamente. Fangsen et al. (2002) reportaron que la sensibilidad al fotoperiodo se perdió rápidamente después de seleccionar durante algunas generaciones de individuos no diapáusicos del escarabajo de la col *Colaphellus bowringi* (Coleoptera: Chrysomelidae), situación que no ha sido observada para *D. areolatus*. Por otro lado, las condiciones de temperatura y fotoperiodo evaluadas en este trabajo presentaron efectos distintivos en el rompimiento de la diapausa de la progenie de *D. areolatus*; pues fue notorio que a 26 °C se presentaron las mayores emergencias de adultos provenientes de pupas en diapausa, pues en esta temperatura los adultos empezaron a emerger a los dos meses de diapausa y continuaron hasta el octavo mes acumulando un mayor número de individuos emergidos

(Figura 4), lo cual es de esperarse en un parasitoide de latitudes tropicales. El tiempo que tardaron los adultos en emerger fue diferente en la temperatura de 21 °C, pues la emergencia empezó a los cinco meses de iniciada la diapausa y continuó solamente por dos meses más, lo cual sugiere que la temperatura baja actuó como un factor limitante en el rompimiento y continuación de la diapausa. Lo anterior podría explicarse por el estrés fisiológico (*i.e.*, un mayor consumo de reservas energéticas) al que los individuos fueron sometidos durante el extenso periodo de diapausa (Hahn y Denlinger, 2011). De acuerdo con Xue et al. (2001), la temperatura juega un papel importante en el desarrollo y terminación de la diapausa, lo cual también afecta el tiempo de emergencia de los individuos tanto en condiciones de verano como de invierno, reportando que la influencia de los días cortos sobre la diapausa sólo se expresó en temperaturas superiores a 20 °C. En estudios con *C. boulandi* se observó que la temperatura influye en la entrada de diapausa y que esto es independiente del fotoperiodo (Claret y Carton, 1980). En los casos del grillo de campo *Allonemobius fasciatus* (Tanaka, 1984); del gusano del tabaco *H. virescens* (Butler et al., 1985) y la mosca minadora de las hojas *Pegomyia bicolor* (Xue et al., 2001), también se demostró que la temperatura fue el factor más influyente para la presencia de la diapausa.

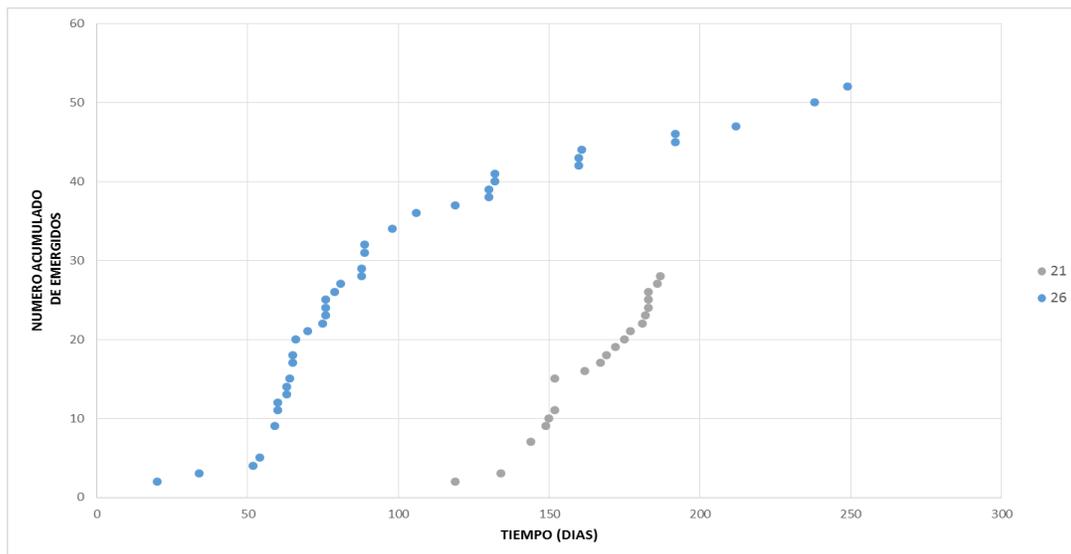


Figura 4. Tiempo de emergencia obtenido en *D. areolatus* a temperatura de 21 y 26 ± 1 °C y tres fotoperiodos diferentes.

Nuestros resultados muestran que el efecto del fotoperiodo fue menos claro en relación con la diapausa, pero fue posible observar que el mayor rompimiento de ésta se presentó en la relación 12: 12 h L: O en ambos tipos de temperaturas, y que la mejor proporción de hembras emergió en la relación de 08:16 h L:O, lo cual también sugiere una posible correlación fenológica con los hospederos, ya que este régimen de fotoperiodo se presenta al inicio de primavera cuando la disponibilidad de frutos y de herbívoros hospederos empiezan a aumentar (Tauber et al., 1986). Estos resultados

conducen con lo señalado por Denlinger (1986), quien señaló que en los trópicos una parte importante de la presión selectiva para la diapausa proviene de fuentes bióticas. El fotoperiodo ha sido relacionado de manera importante en la inducción y/o terminación de la diapausa en diferentes estados de desarrollo de los insectos (Nakamura, 2003). El inicio de la diapausa puede incluir temperaturas bajas o fotoperiodos de días cortos (Danks, 1987; Denlinger, 2002). En los sistemas hospedadores/ parasitoides de insectos, el inicio de la diapausa del parasitoide a menudo se

desencadena por el inicio de diapausa del hospedero o por señales ambientales similares a las que inducen diapausa en el hospedero (Danks, 1987; Godfray et al., 1994).

## 5. Conclusión

Los resultados del presente trabajo demuestran que la temperatura es el factor que tiene mayor influencia tanto en el rompimiento como en la duración de la diapausa de *D. areolatus*. El efecto del fotoperiodo se observó principalmente en una mayor proporción de hembras emergidas en la progenie de los adultos expuestos a temperaturas más elevadas, lo cual podría relacionarse con la fenología de sus hospederos. Lo anterior también brinda sustento para un manejo más adecuado de las condiciones ambientales a nivel de laboratorio durante el proceso de su cría artificial, pues permiten sugerir que bajo las condiciones que aquí se describen, la temperatura conveniente para el desarrollo de la cría masiva de esta especie debe ser 26 °C y que la duración del fotoperiodo podría manejarse de manera selectiva para inducir una mayor proporción de hembras.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Jorge Cancino Díaz, Dra. Amanda Ayala Ayala, y Biol. Flor de María Moreno Coutiño (Programa Moscafrut SENASICA-IICA), las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto. Al Dr. Salvador Flores Breceda se agradece la orientación en el análisis estadístico de los datos. El Programa Moscafrut SENASICA- IICA proporcionó el apoyo logístico necesarios para la realización de este proyecto.

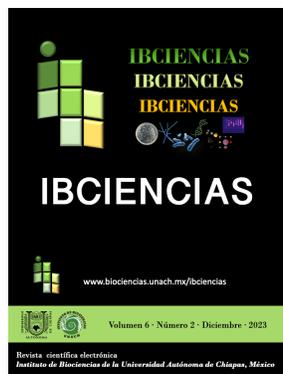
## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

## Referencias

- Aluja M, Rull J, Sivinski J, Norrbom L, Wharton RA, Macias OR, Díaz F, López M. 2003. Fruit flies of the genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) and associated native parasitoids (Hymenoptera) in the tropical rainforest biosphere reserve of Montes Azules, Chiapas, Mexico. *Environmental Entomology* 32: 1377-1385.
- Aluja M, Piñero J, López J, Ruiz C, Zuniga A, Piedra E, Díaz F, Sivinski J. 2000. New host plant and distribution records in Mexico for *Anastrepha* spp. *Toxotrypana curvicauda* Gerstaecker, *Rhagoletis zoqui* Bush, *Rhagoletis* sp., and *Hexachaeta* spp. (Diptera: Tephritidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 102: 802-815.
- Anduaga AM, Nagy D, Costa R, Kyriacou CP. 2018. Diapause in *Drosophila melanogaster* – Photoperiodicity, cold tolerance and metabolites. *Journal of Insect Physiology* 105: 46-53.
- Arredondo J, Díaz-Fleischer F. 2011a. Effects of post-eclosion light–dark regimes on mating performance of mass-reared tephritid fly *Anastrepha ludens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 141: 52-58.
- Arredondo J, Díaz-Fleischer F. 2011b. Light conditions affect sexual performance in a leking tephritid fruit fly. *The Journal of Experimental Biology* 214: 2595-2602.
- Arredondo J, Ruiz L, López G, Díaz-Fleischer F. 2018. Light conditions after emergence affect food consumption and survival of *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) sterile males. *Journal of Economic Entomology* 111: 2741-2745.
- Butler JGD, Wilson, LT, Henneberry, TJ. 1985. *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae): initiation of summer diapause. *Journal of Economic Entomology* 78: 320-324.
- Carton Y, Claret J. 1982. Adaptive significance of a temperature induced diapause in a cosmopolitan parasitoid of *Drosophila*. *Ecological Entomology* 7: 239-247.
- Carvalho RS. 2005. Diapause in fruit fly parasitoids in the Recôncavo Baiano, Brazil. *Neotropical Entomology* 34(4): 613-618.
- Chenga W, Longa Z, Zhanga y, Lianga t, Zhu-Salzman K. 2017. Effects of temperature, soil moisture and photoperiod on diapause termination and post-diapause development of the wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Géhin) (Diptera: Cecidomyiidae). *Journal of Insect Physiology* 103: 78-85.
- Claret J, Carton Y. 1980. Diapause in a tropical species, *Cothonaspis boulandi* (Parasitic Hymenoptera). *Oecologia* 45(1): 32-34.
- Corley JC. 2001. La diapausa prolongada y su papel en la dinámica poblacional de sistemas huésped-parasitoide. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Tesis de doctorado, Universidad de Buenos Aires. pp 208.
- Cruz-Bustos J, Montoya P, Pérez-Lachaud G, Valle-Mora J, Liedo P. 2020. Biological attributes of diapausing and non-diapausing *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) fruit flies. *Journal of Hymenoptera Research* 78: 41-56.
- Cuellar J, Juan L, Mora AJ, Ramírez GL, Vera GM, Pinto J, López CV, Ramirez GJ, Aceves NL. 2005. Caracterización cuantitativa de la diapausa de palomilla de la manzana *Cydia pomonella* L. en Cuauhtémoc, Chihuahua, México. *Agrociencia* 39(2): 221-229.
- Dambroski HR, Feder JL. 2007. Host plant and latitude-related diapause variation in *Rhagoletis pomonella*: a test for multifaceted life history adaptation on different stages of diapause development. *Journal of Evolutionary Biology* 20(6): 2101-2112.
- Danks HV. 1987. Insect dormancy: an ecological perspective. *Biological Survey of Canada n° 1*, Ottawa, Ontario, Canada.
- Denlinger DL. 2002. Regulation of diapause. *Annual Review of Entomology* 47: 93-122.
- Denlinger DL. 1986. Dormancy in tropical insects. *Annual Review of Entomology* 31: 239-254.
- Fangsen X, Spieth HR, Aiqing L, Ai H. 2002. The role of photoperiod and temperature in determination of summer and winter diapause in the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Insect Physiology* 48(3): 279-286.
- Fen Z, Fangsen X, Chaoliang L. 2006. The effect of environmental conditions on diapause in the blister beetle, *Mylabris*

- phalerata* (Coleoptera: Meloidae). *European Journal of Entomology* 103: 531–535
- Godfray HCJ, Hassell MP, Holt RD. 1994. The population dynamic consequences of phenological asynchrony between parasitoids and their hosts. *Journal of Animal Ecology* 63(1): 1-10.
- Gotthard K, Wheat CW. 2019. Diapause: Circadian clock genes are at it again. *Current Biology* 29(23): R1245-R1246.
- Gullan P, Cranston P. 2010. *The Insects. An outline of entomology*. 4th ed. Blackwell Science. 590 p.
- Hahn DA, Denlinger DL. 2011. Energetics of insect diapause. *Annual Review of Entomology* 56: 103-121.
- Kikukawa S, Chippendale, GM. 1983. Seasonal adaptations of populations of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*, from tropical and temperate regions. *Journal of Insect Physiology* 29: 561-567.
- Kostal V. 2011. Insect photoperiodic calendar and circadian clock: Independence, cooperation, or unity? *Journal of Insect Physiology* 57(5): 538-556.
- Kostal V. 2006. Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology* 52: 113-127.
- Logarzo G, Gandolfo DE. 2005. Análisis del voltinismo y la diapausa en poblaciones de *Apogomerella versicolor* (Coleoptera: Cerambycidae) en el gradiente latitudinal de su distribución en la Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 64(3): 68-71.
- López-Arriaga F, Pérez-Cruz C, López P, Flores S, Cancino J, Salvador-Figueroa M, Montoya P. 2022. Host selection for the rearing of *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera: Braconidae), a fruit fly parasitoid. *Phytoparasitica* 50: 117-125.
- Montoya P, Ayala A, Lopez L, Cruz J, Lopez F, Cadena C, Cancino J, Liedo P. 2017. Effect of *Diachasmimorpha longicaudata* releases on the native parasitoid guild attacking *Anastrepha* spp. larvae in disturbed zones of Chiapas, Mexico. *BioControl* 62: 581-593.
- Montoya P, Ayala A, Lopez P, Cancino J, Cabrera H, Cruz J, Martínez MA, Figueroa I, Liedo P. 2016. Natural parasitism in fruit fly (Diptera: Tephritidae) populations in disturbed areas adjacent to commercial mango orchards in Chiapas and Veracruz, Mexico. *Environmental Entomology* 42: 328-337.
- Montoya P, Cancino J, Ruiz L. 2012. Packing of fruit fly parasitoids for augmentative releases. *Insects* 3: 889-899.
- Montoya P, Cancino J, Zenil M, Santiago G, Gutierrez JM. 2007. The augmentative biological control component in the Mexican national campaign against *Anastrepha* spp. fruit flies. En: Vreysen MJB, Robinson AS, Hendrichs J. (eds.), *Area-wide control of insect pests: From research to field implementation*. Springer. Dordrecht, The Netherlands. Pp. 661-670.
- Montoya P, Liedo P, Benrey B, Cancino J, Barrera JF, Sivinski J, Aluja M. 2000. Biological control of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in mango orchards through augmentative releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control* 18: 216-224.
- Mozhgan M, Ehsan B, Hamzeh I. 2017. Physiological and biochemical differences in diapausing and non-diapausing larvae of *Eurytoma plotnikovi* (Hymenoptera: Eurytomidae). *Environmental Entomology* 46: 1424-1431.
- Murillo FD, Cabrera MH, Barrera JF, Liedo P, Montoya P. 2015. *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera, Braconidae) a parasitoid of early developmental stages of *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae). *Journal of Hymenoptera Research* 46: 91-105.
- Nakamura K. 2003. Effect of photoperiod on development and growth in a pentatomid bug, *Dolycoris baccarum*. *Entomological Science* 6: 11-16.
- Ovruski S, Aluja M, Sivinski J, Wharton R. 2000. Hymenopteran parasitoids of fruit-infesting Tephritidae (Diptera) in Latin America and the southern United States: Diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. *Integrated Pest Management Review* 5: 81-107.
- Ovruski SM, Schliserman P, Aluja M. 2016. Occurrence of diapause in neotropical parasitoids attacking *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) in a subtropical rainforest from Argentina. *Austral Entomology* 55: 274-283.
- Salazar FS, Rebolledo RR, Carrillo RL, Aguilera AP. 2000. Factores ambientales y de la planta relacionados con la diapausa de hembras de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) en Temuco, Chile. *Revista Chilena Entomológica* 27: 53-56.
- Salminen TS, Hoikkala A. 2013. Effect of temperature on the duration of sensitive period and on the number of photoperiodic cycles required for the induction of reproductive diapause in *Drosophila montana*. *Journal of Insect Physiology* 59: 450-457.
- Serra A, Ferreira M, García S, Santana L, Castillo M, Nolasco C, Morales P, Holler T, Roda A, Aluja M, Sivinski J. 2011. Establishment of the West Indian fruit fly (Diptera: Tephritidae) parasitoid *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera: Braconidae) in the Dominican Republic. *Florida Entomologist* 94: 809-816.
- Terao M, Hirose Y, Shintani Y. 2012. Effects of temperature and photoperiod on termination of pseudopupal diapause in the bean blister beetle, *Epicauta gorhami*. *Journal of Insect Physiology* 58(5): 737-742.
- Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S. 1986. *Seasonal adaptations of insects*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Tanaka S. 1984. Seasonal variation in embryonic diapause of the striped ground cricket *Allonemobius fasciatus*. *Physiological Entomology* 9: 97-105.
- Xue FS, Zhu XF, Shao ZY (2001) Control of summer and winter diapause in the leaf-mining fly *Pegomyia bicolor* Wiedemann (Dipt. Anthomyiidae). *Journal of Applied Entomology* 125: 181-187.
- Yoshimura H, Tabuchi K, Uesugia R, Takahashi A. 2021. Effect of photoperiod on winter and summer diapause of the soybean pod borer *Leguminivora glycinivorella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 24: 246-253.
- Zhudong L, Gong P, Wu K, Sun J, Li D. 2006. A true summer diapause induced by high temperatures in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Physiology* 52: 1012-1020.



## ARTÍCULO CORTO

## Germinación *in vitro* de semillas de *Guaiaecum sanctum* L., especie de importancia comercial y medicinal

Carolina Orantes-García\*, Nidia del Carmen Ríos-de León, Alma Gabriela Verdugo-Valdez

Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

### Resumen

*Guaiaecum sanctum* L. es una especie maderable con múltiples propiedades medicinales, sin embargo, según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) se encuentra amenazada, además que presenta dificultades para propagarse en condiciones silvestre. El objetivo fue evaluar el proceso germinativo *in vitro* de las semillas de *Guaiaecum sanctum*. Las semillas recién recolectadas fueron removidas asepticamente de los frutos y sembrados en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) suplementado con ácido giberélico (0.0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>). Se utilizó un diseño completamente al azar, aplicándose ANOVA y la prueba de Tukey (P<0.05). Con 2.0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> se obtuvo 85% de germinación final comparado con el testigo (0.0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>) que presentó 13%. Existió diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (P<0.0001). El porcentaje final de germinación aumentó a medida que las concentraciones de ácido giberélico incrementaron. La germinación *in vitro* puede ser una alternativa de propagación y conservación para esta especie forestal.

### Palabras clave:

Ácido giberélico  
Cultivo *in vitro*  
Guayacán  
Zygophyllaceae

### Keywords:

Gibberellic acid  
*In vitro* culture  
Guayacan  
Zygophyllaceae

## *In vitro* seeds germination of *Guaiaecum sanctum* L., a species of commercial and medicinal importance

### Abstract

*Guaiaecum sanctum* L. is a timber species with multiple medicinal properties; however, it is threatened according to the International Union for Conservation of Nature (IUCN), it presents difficulties in propagating in wild conditions. The objective was to evaluate the *in vitro* germination process of *Guaiaecum sanctum* seeds. The freshly collected seeds were aseptically removed from the fruits and sown in the Murashige and Skoog (MS) culture medium supplemented with gibberellic acid (0.0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>). A completely randomized design was used, applying ANOVA and Tukey's test (P<0.05). With 200 mg L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub>, 85% final germination was obtained compared to the control (0.0 mg L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub>) which presented 13%. There were statistically significant differences between treatments (P<0.0001). The final germination percentage increased as the concentrations of gibberellic acid increased. *In vitro* germination can be an alternative for propagation and conservation for this forest species.

### \* Autor para correspondencia:

Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Libramiento Norte Poniente número 1150, Colonia Lajas Maciel, C.P. 29032, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Teléfono: + 52 9616170444 ext. 42. Correo-electrónico: carolina.orantes@unicach.mx

## 1. Introducción

*Guaiacum sanctum* L. es un árbol tropical nativo de crecimiento lento que pertenece a la familia Zygophyllaceae. En México es conocido comúnmente como “guayacán” y “palo santo” (Pennington y Sarukhán, 2005). Históricamente las poblaciones de *G. sanctum* han sido explotadas debido al gran potencial medicinal que tiene, pues distintas partes de la planta se usan para tratar diferentes enfermedades (López-Toledo et al., 2008). La corteza de *G. sanctum* produce una resina que posee propiedades antibióticas para curar enfermedades de transmisión sexual como la gonorrea y la sífilis (Fuchs y Hamrik, 2010). También es utilizado como laxante, diurético, antiinflamatorio, para el tratamiento de la tos, tuberculosis y reumatismo (Rivers, 2017). Estudios preliminares indican que también podría tener propiedades contra el cáncer (López-Toledo et al., 2008). Además, *G. sanctum* es una especie maderable por lo que ha sido objeto de extracción para uso industrial, el alto contenido de densidad y resina de la madera le confiere propiedad autolubrificante, lo que la hace adecuada para la construcción naval (López-Toledo et al., 2011; Pennington y Sarukhán, 2005).

El uso de la flora local es muy importante para las comunidades; sin embargo, en muchas ocasiones las plantas se obtienen directamente de los bosques, sin que exista un manejo o cultivo de las especies (Cayuela et al., 2006). Este es el caso de *G. sanctum*, donde el aprovechamiento se realiza de poblaciones silvestres, y aunado a la pérdida de su hábitat debido a la deforestación asociada con el crecimiento poblacional, la pobreza y el cambio del uso del suelo, han ocasionado gran reducción de su abundancia en muchos lugares (Cayuela et al., 2006; López-Toledo et al., 2011), por lo que hoy en día se encuentra dentro de la lista roja de especies amenazadas de la International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) y está catalogado en el apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (IUCN, 2022).

Aunado a lo anterior, los estudios para *G. sanctum* son escasos. Se reporta que la germinación *ex vitro* es muy difícil, no todas las semillas germinan fácilmente; por lo cual se requiere de un manejo especial que muchas veces incluye algún tratamiento pregerminativo, para romper la latencia de las semillas, además se reporta que las semillas son recalcitrantes (Espinoza-Ocaña y Orantes-García, 2014; Flores et al., 2008; Valverde-Cerdas et al., 2008).

Ante la pérdida acelerada de recursos fitogenéticos, se han desarrollado métodos eficientes de conservación *ex situ*; algunos de estos procedimientos recurren a herramientas de la biotecnología que permiten la conservación de germoplasma vegetal, como lo es el cultivo *in vitro*, con lo que se logra la reproducción de las plantas de forma más rápida y efectiva (Bopana y Saxena, 2008). Por lo consiguiente, el objetivo de este trabajo fue evaluar la germinación *in vitro* de las semillas de *G. sanctum*, para obtener información básica que permita iniciar con el

establecimiento de un protocolo de cultivo *in vitro* como búsqueda de una alternativa para la propagación y conservación de esta especie.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Comprobación de la viabilidad de las semillas

Con la finalidad de comprobar la viabilidad de las semillas, se realizó la técnica del tetrazolio. De un lote de 1000 semillas, se tomaron 100 al azar, las cuales se dividieron en 4 grupos de 25 semillas cada uno. Las semillas se sumergieron en agua a temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C) durante 24 h; posteriormente con la ayuda de un bisturí se dividieron por los cotiledones y se les agregaron tres gotas de tetrazolio (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio, Sigma®) al 1%. Las semillas fueron colocadas en cajas Petri y se envolvieron con papel aluminio para limitar su exposición a la luz. La incubación se realizó en un ambiente libre de humedad y luz, a temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C) por 24 h (ISTA, 2005); en seguida se observaron con un microscopio estereoscópico Carl Zeiss®, para contar el número de semillas totalmente teñidas. Se determinó el porcentaje de viabilidad de acuerdo con la fórmula de Hartmann y Kester (2001), la cual considera el tono rojo como indicador de semillas totalmente viables, mientras que las semillas libres de coloración son consideradas como no viables.

### 2.2. Desinfección de semillas

Las semillas presentan un arilo de color rojo (Figura 1), la cual fue eliminada de forma manual; en seguida se lavaron con agua destilada esterilizada y jabón comercial, posteriormente se llevó a cabo la aplicación de tres sustancias preparadas previamente en agua destilada y constante movimiento; hipoclorito de sodio comercial (Cloralex®) al 10% durante 20 min, etanol al 70% durante 5 min y por último, agrimycin-500 (estreptomycin: oxitetreciclina: sulfato tribásico de cobre, Pfizer®) al 1% durante 20 min. Después de la aplicación de cada una de las sustancias se efectuaron tres enjuagues con agua destilada estéril.

### 2.3. Germinación *in vitro*

Se prepararon 400 tubos de ensayo de vidrio de 200 x 25 mm (Kimax®), con 25 mL de medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (Sigma®) suplementado con diferentes concentraciones (tratamientos) de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) (Sigma®); 0.0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 mg L<sup>-1</sup>, con 30 g de sacarosa, 0.1 g de myo-inositol, 0.05 g de NaHPO<sub>4</sub> y solidificado con 2.5 g de phytigel, se esterilizaron a 1.5 kg cm<sup>-2</sup> durante 15 min. Los tubos fueron cerrados herméticamente con tapas de baquelita de 20 x 25 cm (Kimax®) y sellados con polietileno (Kleen Pack®). Se dejó a prueba de esterilidad durante tres días en la cámara de incubación. En cada tubo se colocó una semilla, los cuales fueron incubados, durante 60 días, en una cámara bioclimática a  $25 \pm 1$  °C, bajo luz blanca fría fluorescente (50 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y fotoperiodo de 16 h luz, 8 h de oscuridad.



**Figura 1.** Semillas de *G. sanctum*, donde se muestra el arilo de color rojo característico de la especie (izquierda), así como semillas de color negro, sin arilo (derecha).

Se evaluó el porcentaje de germinación final (% G) para determinar el efecto de los tratamientos en la capacidad germinativa (proporción de semillas capaces de germinar en condiciones óptimas o en una condición determinada), también fue calculado el tiempo promedio de germinación, el cual se refiere al tiempo que las semillas necesitan para germinar y germinación acumulada, que muestra la forma en que se incrementa la germinación y el tiempo (días) de inicio de la germinación (Hartmann y Kester, 2001).

#### 2.4. Diseño y análisis estadístico

Se utilizó un diseño categórico completamente aleatorizado con un solo factor de seis niveles, con cinco repeticiones de 20 unidades experimentales por repetición (6x5x20), considerado un total de 600 semillas. Para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) simple y se realizó la prueba de Tukey para la comparación de medias ( $P < 0.05$ ).

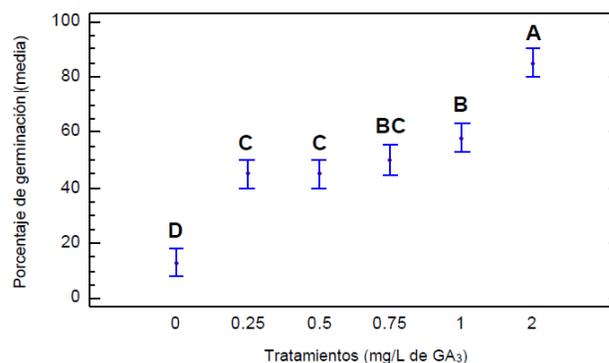
### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1 Efectos en la progenie y proporción de individuos diapáusicos

Las semillas de *G. sanctum* presentaron 100% de viabilidad. Espinoza-Ocaña y Orantes-García (2014), indicaron que las semillas de *Guaiacum sanctum* recién colectadas mantienen una viabilidad del 100%.

De acuerdo con los análisis hubo diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.0001$ ). El mayor porcentaje de germinación final se obtuvo en el tratamiento 2.0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (85%±3.53), mientras que en las semillas a las que no se les aplicó ninguna concentración de ácido giberélico se obtuvo el menor porcentaje de germinación final con 13% (±2.73) (Figura 2). Diversos autores muestran que las giberelinas son importantes para inducir la germinación,

permiten el rompimiento de la latencia, por lo que son ampliamente utilizadas para promover o inducir la germinación de semillas en diversas especies de plantas (Tigabu y Odén, 2001; Siobhan y McCourt, 2003).



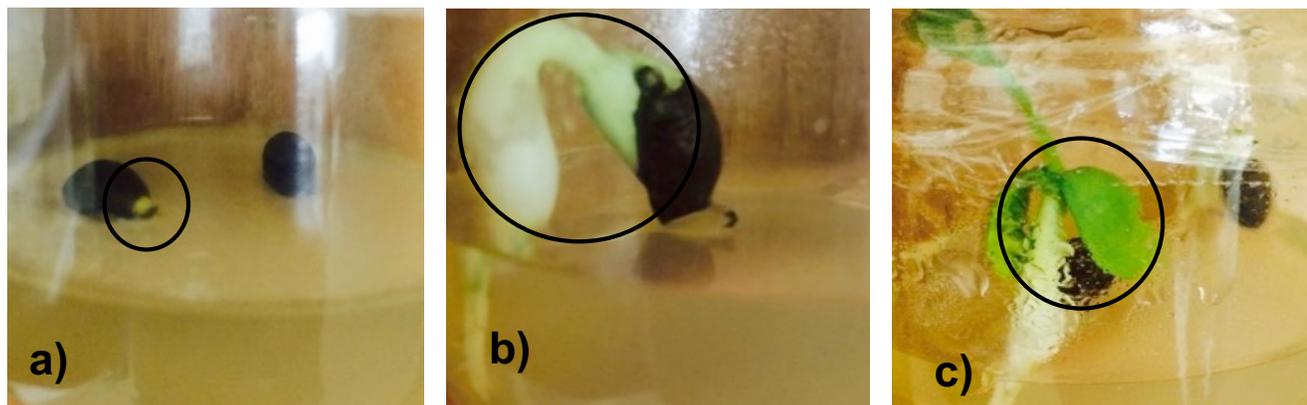
**Figura 2.** Comparación de medias del porcentaje de germinación final en los diferentes tratamientos aplicados a las semillas de *Guaiacum sanctum* (N=600, F=98.38,  $P < 0.0001$ ).

El ácido giberélico aceleró el tiempo en el proceso germinativo de las semillas de *G. sanctum*. Con el tratamiento 2.0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> inició el proceso germinativo a los seis días después de la siembra (dds) concluyendo a los 30 dds, seguido de los tratamientos 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> a los 10 dds, terminando a los 36 dds y finalmente las semillas con 0.0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> iniciaron la germinación a los 15 dds finalizando a los 50 dds (Figura 3).

Se ha demostrado que uno de los mecanismos de acción del ácido giberélico consiste en un efecto directo sobre el potencial de crecimiento del embrión, favoreciendo su rápido crecimiento y desarrollo del tallo y hojas en los primeros días, por lo que, sin lugar a dudas, el suministro de giberelina es necesario para iniciar la activación o síntesis de varias enzimas que actuarán para la nutrición durante la

germinación y tiempo después (Bidwell, 2000; Debeaujon y Koornneef, 2000). La causa de la latencia de *G. sanctum* parece estar relacionada con una deficiencia de giberelina en la semilla, ya que se obtuvo un mayor porcentaje de germinación cuando se agregó ácido giberélico al medio. Araya et al. (2000), observaron una relación directa entre concentración de ácido giberélico y porcentaje de

germinación en semillas de *Alnus acuminata*, ya que se obtienen mayores porcentajes de germinación cuando el ácido giberélico se emplea a altas concentraciones, con 2.0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> obtuvieron 55% de germinación final, comparado con el testigo 25%. Cabe mencionar, que este trabajo sería el primero en evaluar el ácido giberélico como promotor del proceso germinativo *in vitro* de *G. sanctum*.



**Figura 3.** Proceso germinativo *in vitro* de las semillas de *Guaiacum sanctum* con 2.0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. Seis después de la siembra (a), a los 21 días al inicio de la germinación mostrando emergencia del hipocotilo proyectando los cotiledones hacia arriba (b) y a los 28 días, emergencia de las primeras hojas (c).

#### 4. Conclusión

Se obtuvo 85% de germinación *in vitro* de semillas de *Guaiacum sanctum* usando 2 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. La información generada en este estudio puede ser útil para la generación de un protocolo de cultivo *in vitro* que pueda contribuir con el rescate de *G. sanctum*, considerando que es una especie nativa de México y que se encuentra amenazada.

#### Conflicto de intereses

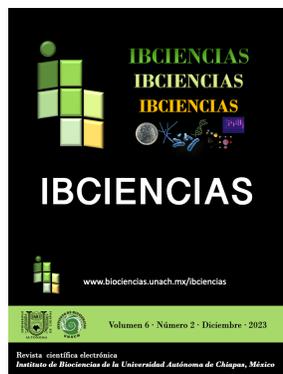
Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

#### Referencias

- Araya E, Gómez L, Hidalgo N, Valverde R. 2000. Efecto de la luz y del ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* de jaul (*Alnus acuminata*). *Agronomía Costarricense* 24(1): 75-80.
- Bidwell RGS. 2000. *Fisiología vegetal*. 1a. Edición. Editorial AGT, S.A. México.
- Bopana N, Saxena S. 2008. *In vitro* propagation of a high value medicinal plant: *Asparagus racemosus* Willd. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 44(6): 525-532.
- Cayuela L, Golicher DJ, Benayas JMR, González-Espinosa M, Ramírez-Marcial N. 2006. Fragmentation, disturbance and tree diversity conservation in tropical montane forests. *Journal of Applied Ecology* 43(6): 1172-1181.
- Debeaujon I, Koornneef M. 2000. Gibberellin requirement for *Arabidopsis* seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant Physiology* 122: 415-424.

- Espinoza-Ocaña L, Orantes-García C. 2014. Viabilidad y germinación de *Guaiacum sanctum* L. (Zygophyllaceae), árbol tropical amenazado. *Lacandonia* 8(1): 37-40.
- Flores GA, Álvarez MJG, Rodríguez OJL, Corona AA. 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora*. *Foresta Veracruzana* 10(2): 27-33.
- Fuchs E, Hamrick JL. 2010. Genetic diversity in the endangered tropical tree, *Guaiacum sanctum* (Zygophyllaceae). *Journal of Heredity* 101(3): 284-286.
- Hartmann HT, Kester DE. 2001. *Propagación de plantas: principios y prácticas*. 1ª Edición. Editorial Continental. México.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources). 2022. The IUCN red list of threatened species. Version 2023-1. <http://www.iucnredlist.org>. Consultada el 12 de mayo de 2023.
- ISTA (International Seed Testing Association). 2005. *International rules for seed testing. Rules and annexes*. *Seed Science and Technology* 4: 3-177.
- López-Toledo L, Burslem D, Martínez-Ramos M, García-Naranjo A. 2008. Non-detriment findings report on *Guaiacum sanctum* in México. International Expert Workshop on CITES Non-Detriment Findings. Cancún, México.
- López-Toledo L, Murillo-García A, Martínez-Ramos M, Pérez-Salicrup DR. 2011. Demographic effects of legal timber harvesting on *Guaiacum sanctum* L., an endangered neotropical tree: implications for conservation. *Interciencia* 36(9): 650-665.
- Pennington TD, Sarukhán J. 2005. *Árboles Tropicales de México. Manual para la identificación de las primeras especies*. 3ª Edición. Editorial Universidad Autónoma de México. México.

- 
- Rivers MC. 2017. *Guaiacum sanctum*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T32955A68085952. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T32955A68085952.en>. Consultada el 04 de enero de 2023.
- Siobhan M, McCourt P. 2003. Hormone cross-talk in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation* 22: 25-31.
- Tigabu M, Odén P. 2001. Effect of scarification, gibberellic acid and temperature on seed germination of two multipurpose *Albizia* species from Ethiopia. *Seed Science and Technology* 29: 11-20.
- Valverde-Cerdas L, Rojas-Vargas A, Hine-Gómez A. 2008. *In vitro* propagation of *Albizia guachapele*, *Cedrela odorata*, *Platymiscium pinnatum* and *Guaiacum sanctum*. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 18(2): 151-156.



# Capacidad repelente de nanopartículas de extractos etanólicos de propóleos de abejas nativas contra *Colaspis hypochlora*

Lizbeth Figuroa-Constantino<sup>1</sup>, José Alfonso López-García<sup>1</sup>, Víctor Albores-Flores<sup>1</sup>, María Guadalupe de Gyves-Córdova<sup>1</sup>, Julieta Grajales-Conesa<sup>1</sup>, Betsabé Rodríguez-Pérez<sup>2</sup>, Claudia Ivette Albores-Flores<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biociencias. Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.  
<sup>2</sup>Laboratorio de Servicio de Análisis de Propóleos (LASAP®). FES Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México.  
<sup>3</sup>El Colegio de la Frontera Sur. Tapachula, Chiapas, México.

## Resumen

*Colaspis hypochlora* se considera una de las principales plagas del fruto del banano debido a que genera daños visibles, como manchas negras, impactando negativamente la presentación y calidad de los frutos destinados a la exportación. Para contrarrestar este problema, se han explorado alternativas amigables con el medio ambiente. El objetivo de este proyecto fue determinar la capacidad repelente de los extractos etanólicos de propóleos (EEP) de abejas nativas del Soconusco contra *C. hypochlora*. De acuerdo con la NOM-003-SAG/GAN-2017 se obtuvieron los propóleos de las especies *Melipona beecheii* y *Apis mellifera*. Se cuantificó el contenido total de fenoles y flavonoides. Las nanopartículas se elaboraron mediante gelación iónica y la actividad repelente de los extractos etanólicos de propóleos se evaluó de acuerdo a la metodología de caja de arena con sensidiscos. El contenido de fenoles y flavonoides para *A. mellifera* fue de 35.13±0.53 mg mL<sup>-1</sup> y 5.92±0.19 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente; mientras que para *M. beecheii* fueron de 17.69±0.05 mg mL<sup>-1</sup> y 10.37±0.35 mg mL<sup>-1</sup>. Se demostró la actividad repente de las nanopartículas de EEP de ambas especies de abejas, la actividad repelente más elevada, en el caso de las nanopartículas de *M. beecheii* a concentraciones de 60 ng mL<sup>-1</sup> durante 30 y 45 min, en cuanto a las nanopartículas de *A. mellifera*, a una concentración de 40 ng mL<sup>-1</sup> durante 30 y 60 min, se obtuvo un 86.67% de repelencia.

### Palabras clave:

Abejas  
 Extractos etanólicos  
 Nanopartículas  
 Propóleos  
 Repelencia

### Keywords:

Bees  
 Ethanolic extracts  
 Nanoparticles  
 Propolis  
 Repellency

# Repellent capacity of nanoparticles of ethanolic extracts of native bee propolis against *Colaspis hypochlora*

## Abstract

*Colaspis hypochlora* is considered one of the main pests of banana fruit because it causes visible damage, such as black spots, negatively impacting the presentation and quality of these fruits destined for export. To counteract this problem, more environmentally friendly alternatives have been explored, therefore, the objective of this project is to determine the repellent capacity of ethanolic extracts of propolis from native Soconusco bees against *C. hypochlora*. In accordance with NOM-003-SAG/GAN-2017, propolis was obtained from the species *Melipona beecheii* and *Apis mellifera*. The total content of phenols and flavonoids was determined. The nanoparticles were prepared with the ionic gelation methodology, and the repellent activity of the ethanolic extracts of propolis, according to the sandbox with sensidisks procedure. The content of phenols and flavonoids for *A. mellifera* was 35.13±0.53 mg mL<sup>-1</sup> and 5.92±0.19 mg mL<sup>-1</sup>, while for *M. beecheii* they were 17.69±0.05 mg mL<sup>-1</sup> and 10.37±0.35 mg mL<sup>-1</sup>. The sudden activity of EEP nanoparticles from both species of bees was demonstrated, the highest repellent activity, in the case of *M. beecheii* nanoparticles at concentrations of 60 ng mL<sup>-1</sup> for a time of 30 and 45 min, as To the *A. mellifera* nanoparticles, at a concentration of 40 ng mL<sup>-1</sup> for 30 and 60 min, 86.67% repellency was obtained.

### \* Autor para correspondencia:

El Colegio de la Frontera Sur. Km 2.5 carretera Antiguo Aeropuerto, C.P. 30700. Tapachula, Chiapas, México.  
 Teléfono: + 52 962149 9659.  
 Correo-electrónico: claudia.albores@posgrado.ecosur.mx

## 1. Introducción

*Colaspis hypochlora* se considera una de las principales plagas del fruto del banano debido a que genera daños visibles, como manchas negras, impactando negativamente la presentación y calidad de estos frutos destinados a la exportación (FAO, 2005). Para contrarrestar este problema, se han explorado alternativas más amigables con el medio ambiente, como las nanopartículas cargadas de extractos etanólicos de propóleos, los cuales pueden brindar efectos repelentes contra esta plaga (Castresana y Puhl, 2018).

En el contexto de la producción mundial de banano (*Musa paradisiaca*) México ocupa el 12° lugar, contribuyendo con 2 millones 127 mil toneladas (FAO, 2023). El cultivo del banano en México se extiende a 16 estados, siendo Chiapas y Tabasco los principales productores. Chiapas destaca con un aporte del 29.64%, seguido por Tabasco con el 25.83% (SADER, 2021). En Chiapas, los municipios con mayor actividad productora son Suchiate, con una superficie sembrada de 5,503.1 hectáreas, Las Margaritas con 3,355.0 hectáreas, y Tapachula con 2,558.5 hectáreas (Pronatura, 2012).

Los principales agentes patógenos de los bananos son la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*), el moko del plátano (*Ralstonia solanacearum*) y algunos insectos plaga, como el picudo negro del plátano (*Cosmopolites sordidus*), los trips del plátano (*Franckliniella cubensis* Hood), la oruga barrenadora (*Leucocastnia licus*) y el escarabajo cicatrizante (*Colaspis hypochlora*) (SENASICA, 2019).

*Colaspis hypochlora* pertenece a la clase Insecta, a la orden Coleóptera, a la familia Chrysomelidae y al género Colaspis. Se le conoce comúnmente como tortuguilla, morrocoyita del fruto o escarabajo cicatrizante, y está presente en los estados de Morelos, Chihuahua, Colima, Guerrero, Oaxaca y Chiapas. Es considerada la principal plaga del fruto del banano, ya que al alimentarse de los frutos produce daños que afectan la presentación y la calidad de la fruta destinada a la exportación (SENASICA, 2019). Lo anterior ha provocado el uso indiscriminado de plaguicidas para controlar las plagas y mejorar el rendimiento y la calidad. Sin embargo, el uso excesivo y descontrolado de estos plaguicidas puede ocasionar problemas ambientales, afectar la salud humana y otros organismos vivos, así como los microorganismos del suelo. La resistencia de las plagas provoca un aumento de las dosis o a la mezcla de varios plaguicidas con mayor toxicidad, lo que agrava la situación. Por lo tanto, es importante buscar y desarrollar otras estrategias de control que sean amigables con el medio ambiente, y el control biológico se presenta como una buena alternativa (Vinchira-Villarraga y Moreno-Sarmiento, 2019).

El control biológico o biocontrol es el uso de diferentes organismos, compuestos o extractos obtenidos de ellos que son capaces de disminuir o controlar una población patógena que causa pérdidas en un cultivo. Dentro del control biológico, existen los plaguicidas botánicos, que consisten en el uso de aceites esenciales. Su composición química consiste

principalmente en alcaloides, glucósidos, ésteres, ácidos grasos y flavonoides (SENASICA, 2020).

La nanotecnología es una alternativa en la agricultura moderna y se espera que revolucione el campo del manejo de plagas en un futuro próximo (Lira-Saldivar et al., 2018). Las nanopartículas (de 1 a 100 nm de diámetro) pueden usarse como pesticidas eficaces contra malezas, patógenos de plantas y plagas de insectos y también pueden incorporarse en nuevas formulaciones de insecticidas y repelentes de insectos sin los peligros que plantean los pesticidas químicos tradicionales (Thabet et al., 2021).

Los propóleos son una mezcla de saliva y cera de abeja con resinas vegetales obtenidas de diversas fuentes. La composición final es un 50% resina, 30% ceras, 10% aceites esenciales, 5% polen y 5% restos vegetales (Bogdanov y Bankova, 2016). El color del propóleo varía desde un tono amarillo verdoso y marrón rojizo hasta el negro (Passos et al., 2016). Las abejas lo utilizan para la construcción de nidos esenciales y panales de cría, así como estructura de almacenamiento de polen, miel y estructuras protectoras (Shanahan y Spivak, 2021). Los componentes del propóleo se obtienen de las resinas de las plantas, incluyendo los compuestos fenólicos y terpenoides volátiles y no volátiles, siendo los flavonoides los componentes bioactivos más importantes dentro de los compuestos fenólicos. Por esta razón, los propóleos son una buena alternativa para sustituir los agroquímicos, ya que tienen actividad repelente, toxicidad por contacto o ingestión, y efectos anti alimentarios o inhiben la actividad celulasa (Mahmood et al., 2021).

Se ha comprobado la capacidad repelente de los propóleos y los métodos para potenciar sus metabolitos. Zakeri et al. (2021) utilizaron los extractos etanólicos de propóleos de *Heterotrigna itama* contra la termita *Coptotermes curvignathus* comprobando su actividad repelente. Por otra parte, Duangphakdee et al. (2009) utilizaron el extracto etanólico de propóleo de *Apis mellifera* en distintas concentraciones contra *Oecophylla smaragdina*, y reportaron tener capacidad repelente en concentraciones mayores a 35  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Sin embargo, hasta la fecha no se ha reportado si las nanopartículas de extractos etanólicos de propóleos de abejas del Soconusco, Chiapas, México puedan tener capacidad repelente. Por lo tanto, el objetivo de la investigación es determinar la capacidad repelente de los extractos etanólicos de propóleos de abejas nativas del Soconusco contra *Colaspis hypochlora*.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Obtención de material biológico

Los propóleos empleados en el estudio se recolectaron de las colmenas de abejas de la especie *Melipona beecheii* localizadas en el municipio de Tuzantán, Chiapas (15° 09' 23.2" N, 92° 25' 05" O), y de la especie *Apis mellifera* encontradas en el municipio de Tapachula, Chiapas (14° 48' 24.3" N, 92° 20' 23.9" O). La recolección de los propóleos

se llevó a cabo siguiendo los lineamientos establecidos en la NOM-003-SAG/GAN-2017.

En el caso de *C. hypochlora*, fue colectado en el rancho El Progreso, ubicado en el municipio de Mazatán, Chiapas (14° 56' 16" N, 92° 28' 53" O). Se empleó el método de aspiración descrito por Morón y Terrón (1988), con ciertas adaptaciones; los especímenes fueron capturados y depositados en frascos de plástico. Los insectos colectados se resguardaron en frascos de plástico limpios cubiertos con malla mosquitera.

2.2. Preparación de los propóleos

Los propóleos fueron sometidos a limpieza manual para remover impurezas, tales como restos de madera, abejas muertas y fragmentos de hojas. Posteriormente, se congelaron 100 g de propóleos de ambas especies de abejas a 6 °C durante 24 h. Una vez congelados, los propóleos se trituraron con un mortero hasta obtener trozos de entre 3 y 5 cm de acuerdo con la NOM-003-SAG/GAN-2017.

2.3. Obtención del extracto etanólico de propóleo (EEP)

Se siguió la metodología de la NOM-003-SAG/GAN-2017 con adaptaciones; para la especie *M. beecheii* se emplearon 100 g de propóleos, y para *A. mellifera* 60 g de propóleos los cuales fueron macerados y colocado en etanol. La maceración se mantuvo durante 20 días sin agitación. La evaporación del alcohol se llevó a cabo durante 12 h. Después de la evaporación se obtuvo el EEP, el cual fue colocado en un frasco ámbar para evitar el contacto con la luz, y se conservó en el refrigerador a 15 °C hasta su uso.

2.4. Determinación de fenoles totales y flavonoides totales contenidos en el EEP

El contenido total de fenoles en los extractos fue determinado de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu descrito en la NOM-003-SAG/GAN-2017. Se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro de absorción UV-VIS (VELAB VE-5600UV). El contenido total de compuestos fenólicos se determinó mediante la comparación de la absorbancia con la curva estándar de ácido gálico (Meyer). El contenido de compuestos fenólicos fue expresado en mg ácido gálico mL<sup>-1</sup> de propóleos.

El contenido total de flavonoides se determinó de acuerdo a la NOM-003-SAG/GAN-2017. La absorbancia se midió a 415 nm mediante espectrofotometría de absorción UV-VIS (VELAB VE-5600UV). El contenido total de compuestos fenólicos se determinó mediante la comparación de la absorbancia con la curva estándar de quercetina (Meyer). El contenido total de flavonoides se expresó como mg quercetina mL<sup>-1</sup> de propóleos.

2.5. Elaboración de nano partículas de extractos etanólicos de propóleos

Para la elaboración de las nanopartículas se siguió la metodología de Barros et al. (2016) con algunas modificaciones. Las nano partículas fueron cargadas con los EEP de *A. mellifera* y *M. beecheii*, siguiendo las concentraciones mostradas en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Concentraciones para cada tratamiento de extracto etanólico de propóleo de *Melipona beecheii* y *Apis mellifera*

Especie	Testigo	T1 20 ng mL <sup>-1</sup>	T2 40 ng mL <sup>-1</sup>	T3 60 ng mL <sup>-1</sup>	T4 80 ng mL <sup>-1</sup>
<i>Melipona beecheii</i> (BM)	Aceite de oliva	MB*T1	MB*T2	MB*T3	MB*T4
<i>Apis mellifera</i> (AM)	Aceite de oliva	AM*T1	AM*T2	AM*T3	AM*T4

2.6. Actividad repelente de las nanopartículas cargadas con EEP contra *C. hypochlora*

Para determinar si las nanopartículas de EEP son repelentes, se llevó a cabo un ensayo de actividad repelente de acuerdo con Zakeri et al. (2021) con algunas modificaciones. Se utilizaron las concentraciones del Cuadro 1 y como testigo se utilizó aceite de oliva. Se utilizaron placas Petri de 100 x 15 mm estériles (SYM) como recipientes para contener los sensidiscos de papel filtro Whatman número 1 porosidad de 11 µm, los cuales fueron previamente cortados en dos partes iguales. Con ayuda de una micropipeta (MILAB), se distribuyeron 200 µL de cada tratamiento, incluyendo el control, en cada mitad del sensidisco. Se dejaron secar los sensidiscos a temperatura ambiente (24-25 °C) durante 3 min, y se colocó en la placa Petri una mitad impregnada con el tratamiento correspondiente y la otra mitad con el testigo. En el centro de cada placa con los sensidiscos se añadieron 5 insectos vivos sin sexar. Las placas se mantuvieron en

oscuridad, y cada 15 min durante 1 hora se contó el número de insectos presentes en cada mitad de los sensidiscos. El porcentaje de repelencia (PR) se determinó utilizando la fórmula (Ojianwuna y Enwemiwe, 2022),  $PR = [(C - T) / (C + T)] * 100$ , donde C es el número de insectos observados en la mitad de los sensidiscos impregnados con aceite de oliva (testigo) y T es el número de insectos observados en la mitad de los sensidiscos impregnados con nanopartículas de extractos etanólicos de propóleos.

El índice de preferencia de los propóleos (PI) se calculó usando la fórmula (Chaubey, 2016),  $PI = (\%T - \%C) / (\%T + \%C)$ , donde %T es el porcentaje de los insectos observados en la mitad del sensidisco impregnado con nanopartículas de propóleos y %C es el porcentaje de los insectos en la mitad del sensidisco impregnado de aceite de oliva (testigo). Si el valor de PI esta entre -1.0 al -0.1 indica un extracto con propiedades repelente, si varió entre -0.1 al

+0.1 indica un extracto neutro y si oscila entre +0.1 al 1.0 indica un extracto con propiedades atrayentes.

2.7. Análisis estadístico

Para determinar las diferencias entre los valores medios de cada muestra, los datos fueron sometidos a ANOVA y se realizó una prueba Tukey. Los análisis se llevaron a cabo en el paquete estadístico InfoStat.

3. Resultados y Discusión

El contenido promedio ( $\pm$  desviación estándar) de compuestos fenólicos y flavonoides en los EEP de *M. beecheii* fue de  $17.69 \pm 0.05$  mg mL<sup>-1</sup> y de  $10.37 \pm 0.31$  mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, mientras que para *A. mellifera* fue de  $35.13 \pm 0.53$  mg mL<sup>-1</sup> y  $5.92 \pm 0.19$  mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. El contenido de fenoles y flavonoides en ambas especies de abejas se encuentran dentro de los parámetros establecidos en la NOM-003-SAG/GAN-2017, que establece un valor mínimo de 0.5 mg mL<sup>-1</sup> para compuestos fenólicos y flavonoides. Sin embargo, se observó una concentración significativamente mayor ( $F_{1,5}=3192.12$ ,  $P<0.001$ ) de compuestos fenólicos en *A. mellifera* ( $35.13 \pm 0.22$  mg mL<sup>-1</sup>) que en *M. beecheii* ( $17.69 \pm 0.22$  mg mL<sup>-1</sup>). Esto concuerda con Tabart et al. (2009), quienes encontraron concentraciones significativamente mayores en *A. mellifera* que en diversas especies de abejas sin aguijón. Por otra parte, para los EEP de *A. mellifera*, Soto-Vásquez (2015) reportó valores de compuestos fenólicos de  $78.6 \pm 0.20$  mg mL<sup>-1</sup>, y flavonoides de  $42.5 \pm 0.10$  mg mL<sup>-1</sup> de diversas localidades en Perú. Estos valores son superiores en comparación a los obtenidos en este proyecto. En cuanto a los EEP de *M. beecheii*, Ruíz et al. (2023) obtuvieron resultados similares en el contenido de compuesto fenólicos, con valores de 18.65

mg mL<sup>-1</sup>, y flavonoides, con valores de 39.26 mg mL<sup>-1</sup>, en Bacalar, Quintana Roo. En Veracruz, Jiménez et al. (2020) trabajaron con propóleos de *M. beecheii* y obtuvieron valores menores en las concentraciones de fenoles, con un valor de 5.34 mg mL<sup>-1</sup>, y de flavonoides, con una concentración de 3.5 mg mL<sup>-1</sup>. Se ha reportado que la composición química de los EEP dependerá de la especie de abeja, de la flora y fauna de donde obtengan las resinas, del origen geográfico, y también de factores climáticos (Zhang et al., 2016).

En la Figura 1, se observa el efecto repelente de las nanopartículas sobre *C. hypochlora* (número de insectos que permanecieron en el tratamiento con nanopartículas con EEP). La actividad repelente más elevada, en el caso de las nanopartículas de *M. beecheii* a concentraciones de 60 ng mL<sup>-1</sup> durante un tiempo de 30 y 45 min, mostró repelencia del 86.67%. Le siguen el 73.33% de repelencia en concentraciones de 40 ng mL<sup>-1</sup> y 60 ng mL<sup>-1</sup> durante un tiempo de 60 min, y a una concentración de 80 ng mL<sup>-1</sup> durante tiempos de 30 y 45 min. En cuanto a las nanopartículas de *A. mellifera*, a una concentración de 40 ng mL<sup>-1</sup> durante 30 y 60 min, se obtuvo un 86.67% de repelencia. A 40 ng mL<sup>-1</sup> durante 45 min, se obtuvo un 73.33% de repelencia. Estos resultados concuerdan con Zakeri et al. (2021), quienes demostraron que los EEP de abejas sin aguijón tienen un porcentaje de repelencia contra las termitas de más del 70%, utilizando concentraciones de propóleo al 30  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Naik et al. (2009) demostraron que los EEP de la India tienen una repelencia del 80% contra *Apis florea*, en concentraciones de 3  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. En este trabajo las pruebas fueron *in vitro*, sin embargo, Barrera et al., (2018) utilizaron el extracto de ajo (*Allium sativum*) impregnado en las bolsas de polietileno contra *Colaspis* sp., demostrando que el extracto de ajo tiene una capacidad repelente del 98%.

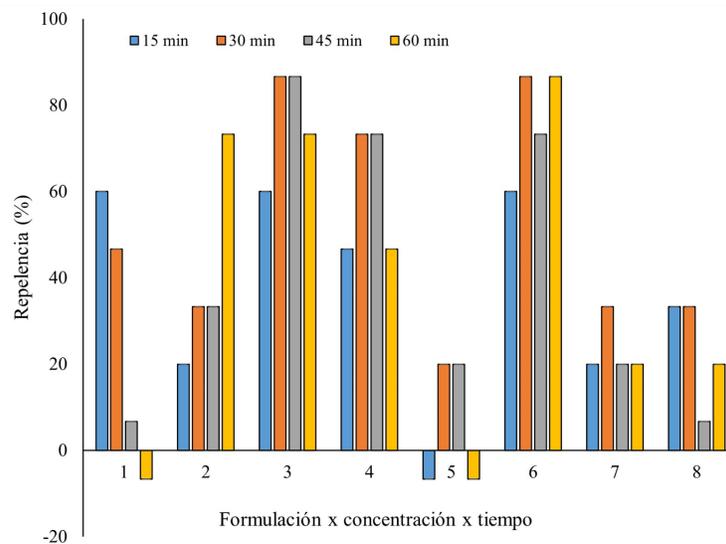


Figura 1. Actividad repelente de las nanopartículas. 1= nanopartículas de *M. beecheii* a 20 ng mL<sup>-1</sup>, 2= nanopartículas de *M. beecheii* a 40 ng mL<sup>-1</sup>, 3= nanopartículas de *M. beecheii* a 60 ng mL<sup>-1</sup>, 4= nanopartículas de *M. beecheii* a 80 ng mL<sup>-1</sup>, 5= nanopartículas de *A. mellifera* a 20 ng mL<sup>-1</sup>, 6= nanopartículas de *A. mellifera* a 40 ng mL<sup>-1</sup>, 7= nanopartículas de *A. mellifera* a 60 ng mL<sup>-1</sup>, 8= nanopartículas de *A. mellifera* a 80 ng mL<sup>-1</sup>.

En el Cuadro 2 se puede observar la relación especie de abeja por concentración. Se encontró diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre *A. mellifera* a una concentración de 20 ng mL<sup>-1</sup> y la concentración de 40 ng mL<sup>-1</sup> y con *M. beecheii* a una concentración de 60 ng mL<sup>-1</sup>, esto se debe que cada especie de abejas tiene diferente contenido de componentes bioactivos (Barrera et al. 2018), y proporcionándole una mayor concentración del contenido de compuestos volátiles por lo tanto una mayor repelencia. La presencia de fenoles y flavonoides en las nanopartículas de extractos etanólicos de propóleos causó el desplazamiento de los insectos hacia los sensidiscos impregnados con aceite de oliva (control).

**Cuadro 2.** Repelencia por especie de abejas y concentración

Especie	Concentración			
	20 ng mL <sup>-1</sup>	40 ng mL <sup>-1</sup>	60 ng mL <sup>-1</sup>	80 ng mL <sup>-1</sup>
1	26.67 <sup>A</sup>	40.00 <sup>A</sup>	76.67 <sup>B</sup>	60.00 <sup>A</sup>
2	6.67 <sup>A</sup>	76.67 <sup>B</sup>	23.33 <sup>A</sup>	23.33 <sup>A</sup>

Medias con letras distintas significan diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). 1= *M. beecheii*, 2= *A. mellifera*.

Según el índice de preferencia (Cuadro 3) se observan que todos los tratamientos usados son repelentes contra *C. hypochlora*, teniendo los IP más altos para la especie de *M. beecheii* a 60 ng mL<sup>-1</sup>, y en *A. mellifera* 40 ng mL<sup>-1</sup>, esto se debe a que los repelentes pueden causar un bloqueo en los receptores olfativos o generar estímulos desagradables; por lo cual los insectos evitan el área impregnada con las nanopartículas de extractos etanólicos de propóleos.

**Cuadro 3.** Índice de preferencia por especie de abejas y concentración

Especie	Concentración			
	20 ng mL <sup>-1</sup>	40 ng mL <sup>-1</sup>	60 ng mL <sup>-1</sup>	80 ng mL <sup>-1</sup>
1	-0.27 <sup>A</sup>	-0.40 <sup>A</sup>	-0.77 <sup>B</sup>	-0.60 <sup>A</sup>
2	-0.07 <sup>A</sup>	-0.77 <sup>B</sup>	-0.23 <sup>A</sup>	-0.23 <sup>A</sup>

Medias con letras distintas significan diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). 1= *M. beecheii*, 2= *A. mellifera*.

La relación entre la especie de abeja, la concentración y el tiempo, no mostraron tener diferencias significativas, sin embargo, Oliveira et al. (2017) demostraron que las nanopartículas de zeína y citronela tienen una mayor actividad repelente a través del tiempo, siendo las actividades repelentes de 57.5±5.4% y 76.3±8.3%, obtenidos después de 8 h. Resultados similares se observaron en este trabajo, donde las nanopartículas de EEP de *M. beechi* a 40 ng mL<sup>-1</sup>, mostraron aumento en el porcentaje de repelencia a través del tiempo, pasando de 20% a 73%. Esto puede deberse a que las nanopartículas son capaces de promover una volatilización más lenta, haciendo que los efectos repelentes sean más prolongados, así como la fácil difusión en los sitios receptores del insecto.

#### 4. Conclusión

En nuestro trabajo, se demostró la actividad repente de las nanopartículas de EEP de ambas especies de abejas, aunque la de *A. mellifera* resultó con mayor actividad repelente a una concentración de 40 ng mL<sup>-1</sup>. Este hallazgo es de importancia, ya que enriquece el número de estrategias ecológicamente sostenibles para controlar a *C. hypochlora*.

#### Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad Politécnica de Tapachula por permitirnos trabajar en sus instalaciones. Al personal de Plásticos Agrícolas del Soconusco, Saúl López y José Figueroa, por el apoyo en las actividades de campo, a José de León Victoria por el apoyo en el laboratorio y en la colecta de propóleos. A Elvis Mota y al rancho El Progreso por proporcionarnos el material biológico para este proyecto. También agradecemos a la facultad de estudios Superiores de Cuatitlán de la UNAM, laboratorio de análisis de propóleos por la colaboración en la presente investigación.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

#### Referencias

Barrera VJL, Fernández HC, Pérez GKD. 2018. Plant extracts: alternative control *Colaspis* sp. (Coleoptera: Chrysomelidae) in banana cv. Harton. *Temas Agrarios* 23(1): 9-17.

Barros APH, Morantes MTA, Hoyos MIC, Ospino LJM. 2016. Preparación de nanopartículas de quitosano modificadas con alginato de sodio con potencial para la liberación controlada de medicamentos. *Revista EIA*. 12(2): 75-83.

Bogdanov S, Bankova V. 2016. Propolis: origin, production, composition. In: Bogdanov S (ed.). *The propolis book*. Bee Product Science. Pp. 1-20.

Castresana JE, Puhl L. (2018). Eficacia de insecticidas botánicos sobre *Myzus persicae* (Sulzer) y *Aphis gossypii* (Clover) (Hemiptera: Aphididae) en el cultivo de pimiento (*Capsicum annum* L.) bajo cubierta. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 12: 136-146.

Chaubey, M. (2016). Fumigant and contact toxicity of *Allium sativum* (Alliaceae) essential oil against *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Dryophthoridae). *Entomology and Applied Science Letters* 3(2): 43-48.

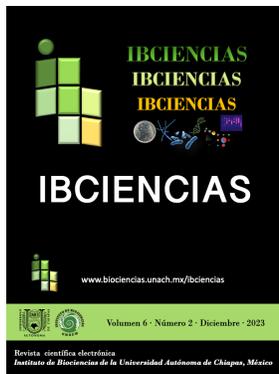
Duangphakdee O, Koeniger N, Deowanish S, Hepburn HR, Wongsiri S. 2009. Ant repellent resins of honeybees and stingless bees. *Insectes Sociaux* 56: 333-339.

FAO. 2005. Cosecha, manejo y poscosecha. Recuperado de <https://www.fao.org/3/a1374s/a1374s07.pdf>. Fecha de consulta 15 de abril de 2023.

FAO. 2023. Banano, análisis de mercado 2022. Recuperado de <https://www.fao.org/3/cc6952es/cc6952es.pdf> Fecha de consulta 18 de junio de 2023.

Jiménez OVD, Pérez BR, Sánchez TAC, Tovar CGG, Bordes JLN, Zárate CIS. 2020. Evaluación de la actividad antiviral del propóleo de abejas nativas (*Plebeia frontalis*) contra el virus del

- moquillo canino. *Revista Abierta de Medicina Veterinaria* 10(12): 207-218.
- Lira-Saldivar HL, Méndez-Argüello B, Vera-Reyes I, De los Santos-Villarreal G. 2018. Agronotecología: una nueva herramienta para la agricultura moderna. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCUYO* 50(2): 395-411.
- Mahmood A, Lani MN, Hassan Z, Razak SBA, Ahmad F. 2021. Antioxidant and antimicrobial properties of Indo-Malayan stingless bee (*Heterotrigona itama*) honey from different seasons and distribution of flowers. *Food Research* 5(2): 498-507.
- Morón-Ríos MA, Terrón RA. 1988. *Entomología práctica: una guía para el estudio de los insectos con importancia agropecuaria, médica, forestal y ecología de México*. 1a ed. Instituto de Ecología, A.C.
- Naik D, Vaidya H, y Behera B. (2009). Antioxidant properties of Indian propolis. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 1(4): 110-120.
- NOM-003-SAG/GAN-2017. NORMA Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento. *Diario Oficial de la Federación* 6 de octubre de 2017.
- Ojianwuna C, Enwemiwe V. 2022. Insecticidal effectiveness of naphthalene and its combination with kerosene against the emergence of *Aedes aegypti* in Ika North East, LGA, Delta State, Nigeria. *Parasite Epidemiology and Control* 18: 1-11.
- Oliveira AP, Santana AS, Santana EDR, Lima APS, Faro RRN, Nunes RS, Bacci L. 2017. Nanoformulation prototype of the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol to population management of *Strophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Industrial Crops and Products* 107: 198-205.
- Passos FR, Mendes FQ, Da Cunha MC, Pigozzi MT, De Carvalho AMX. 2016. Propolis extract in postharvest conservation banana "Prata". *Revista Brasileira de Fruticultura* 38(2): 1-11.
- Pronatura. 2012. Análisis de la producción de plátano, su mercado y las acciones de mitigación y adaptación al cambio climático en Chiapas. Recuperado de [https://www.pronatura-sur.org/web/docs/ANALISIS\\_DE\\_LA\\_PRODUCCION\\_DE\\_PLATANO.pdf](https://www.pronatura-sur.org/web/docs/ANALISIS_DE_LA_PRODUCCION_DE_PLATANO.pdf). Fecha de consulta 12 de mayo de 2023.
- Ruiz JR, Pacheco N, Méndez EGR, López FAS, Medina-Medina LA, Quezada-Euán JGG. 2023. Phenolic content and bioactivity as geographical classifiers of propolis from stingless bees in southeastern Mexico. *Foods* 12(7): 1434.
- SADER. 2021. Aumentó 2.9 por ciento producción de plátano mexicano en 2020. Recuperado de <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/aumento-2-9-por-ciento-produccion-de-platano-mexicano-en-2020?idiom=es>. Fecha de consulta 20 de marzo de 2023.
- SENASICA. 2020. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB). Introducción al CNRCB. Recuperado de <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/centro-nacional-de-referencia-de-control-biologico-103097>. Fecha de consulta 24 de noviembre de 2022.
- SENASICA. 2019. Guías de identificación de plagas del plátano. [www.gob.mx](https://www.gob.mx). Recuperado de <https://www.gob.mx/senasica/documentos/guias-de-identificacion-de-plagas-del-platano?state=published>. Fecha de consulta 15 de marzo de 2023.
- Shanahan M, Spivak M. 2021. Resin use by Stingless Bees: A review. *Insects* 12(8): 719.
- Soto-Vásquez MR. 2015. Metabolitos secundarios, cuantificación de fenoles y flavonoides totales de extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del Perú. In *Crescendo* 6(2): 37-47.
- Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne J, Dommès J. 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113(4): 1226-1233.
- Thabet FA, Boraei HA, Galal OA, El-Samahy M, Mousa KM, Zhang YZ, Tuda M, Helmy EA, Wen J, Nozaki T. 2021. Silica nanoparticles as pesticide against insects of different feeding types and their non-target attraction of predators. *Scientific Reports* 11(1): 14484.
- Vinchira-Villarraga DM, Moreno-Sarmiento N. 2019. Control biológico: camino a la agricultura moderna. *Revista Colombiana de Biotecnología* 21(1): 2-5.
- Zakeri HA, Kannan M, Kumar NM, Azmi WA. 2021. Prospect of propolis from stingless bee, *Heterotrigona itama* as biological control of the subterranean termite, *Coptotermes curvignathus*. *IOP Conference Series Earth Environmental Science* 711(1): 012018.
- Zhang J, Xiao-Ge S, Wang K, Cao X, Zhang C, Zheng H, Hu F. 2016. Antioxidant activities and molecular mechanisms of the ethanol extracts of *Baccharis* propolis and *Eucalyptus* propolis in RAW64.7 cells. *Pharmaceutical Biology* 54(10): 2220-2235.



## Estudio de la diversidad de microalgas y peces en las lagunas La Encantada y Bosque Azul del Parque Nacional Lagunas de Montebello

Silvia Monserrat Morales-Hernández<sup>1</sup>, Alfonso Ángel González-Díaz<sup>2</sup>, Arnulfo Rosales-Quintero<sup>1</sup>, Víctor Manuel Ruiz-Valdiviezo<sup>1</sup>, José Humberto Castañón-González<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio 9 del Polo Tecnológico de Investigación. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México.

<sup>2</sup>Laboratorio de Ictiología. El Colegio de la Frontera Sur, Unidad San Cristóbal. San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México.

### Resumen

El impacto de las actividades humanas en el Parque Nacional Lagunas de Montebello (PNLM) se ha reflejado en el cambio de coloración de algunas lagunas, por lo que el objetivo de la investigación fue evaluar la variación de la diversidad de microalgas y peces, y sus características como bioindicadores de contaminación en dos lagunas de Montebello, en temporada de estiaje y lluvia. En este sentido, se realizó la caracterización fisicoquímica del agua y se evaluó la riqueza y abundancia de peces y microalgas de las lagunas La Encantada y Bosque Azul. La caracterización fisicoquímica permitió determinar que la calidad del agua de ambas lagunas se clasifica como contaminada. Con respecto a la ictiofauna, se identificaron un total de ocho especies, cuatro en La Encantada y siete en Bosque Azul. En cuanto a las microalgas se identificaron un total de siete géneros, seis en La Encantada y siete en Bosque Azul. Especies de peces como *Poecilia sphenops*, *Oreochromis niloticus* y *Chuco intermedium*, así como los géneros en microalgas *Monoraphidium*, *Limnothrix* y *Scenedesmus* pueden ser útiles como bioindicadores de contaminación debido a su presencia, abundancia y tolerancia a ambientes contaminados y a altas concentraciones de metales pesados.

### Palabras clave:

Contaminación del agua  
Microalgas  
Parámetros fisicoquímicos  
Peces

### Keywords:

Water contamination  
Microalgae  
Physicochemical parameters  
Fish

## Study of the diversity of microalgae and fish in “La Encantada” and “Bosque Azul” lakes of the Lagunas de Montebello National Park

### Abstract

The impact of human activities in the Lagunas de Montebello National Park (LMNP) has been reflected in the change in color of some lagoons, so the objective of the research was to evaluate the variation in the diversity of microalgae and fish, and their characteristics as bioindicators of pollution in two lagoons in Montebello Park, in the dry and rainy season. Physicochemical characterization of the water was carried out and the richness and abundance of fish and microalgae in the La Encantada and Bosque Azul lagoons was evaluated. The physicochemical characterization allowed us to determine that the water quality of both lagoons is classified as contaminated. Regarding the ichthyofauna, a total of eight species were identified, four in La Encantada and seven in Bosque Azul. Regarding microalgae, a total of seven genera were identified, six in La Encantada and seven in Bosque Azul. Fish species such as *Poecilia sphenops*, *Oreochromis niloticus* and *Chuco intermedium*, as well as the microalgae genera *Monoraphidium*, *Limnothrix* and *Scenedesmus* can be useful as pollution bioindicators due to their presence, abundance, and tolerance to contaminated environments and high concentrations of heavy metals.

### \* Autor para correspondencia:

Laboratorio 9 del Polo Tecnológico de Investigación. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Carretera Panamericana km 1080. Colonia Juan Crispín. C.P. 29050. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México.  
Teléfono: + 52 9616150138 ext. 304.  
Correo-electrónico: jose.cg@tuxtla.tecnm.mx

## 1. Introducción

El parque Nacional Lagunas de Montebello (PNLM) fue designado como Área Natural Protegida (ANP) y como humedal de importancia internacional por la convención Ramsar. Se caracteriza por la coloración verde y azul de las lagunas siendo un sitio de alto atractivo turístico. Actualmente, las consecuencias de las actividades antropogénicas se hacen notar en los cambios que han sufrido los ecosistemas naturales; como la degradación de los humedales sobrecargados de nutrientes o contaminados por descargas de aguas residuales, parásitos, virus y fertilizantes; provocando la muerte de los organismos (Peña et al., 2018). Tal es el caso de la laguna “La Encantada” perteneciente al PNLM que hace más de seis años presentó un cambio en la coloración de azul a pardo sin poder recuperarse; ocasionando un riesgo para las lagunas cercanas, la biodiversidad de especies, la población circundante y el turismo. Algunas investigaciones se han centrado en la determinación de parámetros fisicoquímicos, el estado trófico de la laguna, la comunidad de bacterias y arqueas en sedimentos y columnas de agua (Pulido, 2020; Diaz et al., 2018; García et al., 2018), y la identificación de microalgas en la laguna Bosque Azul (Olan et al., 2018); sin embargo, la problemática continúa, y es necesario conocer la dinámica de las comunidades biológicas, las cuales denotan las condiciones del ecosistema y en este sentido son llamados bioindicadores. Los bioindicadores son organismos que se utilizan para mostrar ese impacto de positivos o negativos de los cambios naturales del entorno, debido a su resistencia a la variabilidad ecológica (Parmar et al., 2016). Las características para considerar un bioindicador son, alta sensibilidad a factores de estrés ambiental, taxonómicamente bien documentado y de fácil reconocimiento, abundante y

común, alta capacidad de cuantificación, poca movilidad, idóneo para experimentación en laboratorio, con resultados interpretables con facilidad, su respuesta reflejada de la población, comunidad y ecosistema (Li et al., 2010). En ecosistemas acuáticos las microalgas y los peces son organismos detectores, explotadores y acumuladores del medio y resultan útiles como bioindicadores debido a su sensibilidad, ciclo de vida y que pertenecen al nivel uno y tres de la cadena alimenticia.

En la presente investigación se realizó la caracterización fisicoquímica del agua, la identificación de microalgas y peces, la comparación de riquezas y abundancias, así como la determinación de metales pesados de los peces en las lagunas La Encantada y Bosque Azul del PNLM. Asimismo, se propusieron algunas especies útiles como bioindicadores del estado de contaminación o la calidad del agua del sitio.

## 2. Materiales y métodos

El estudio se realizó en dos temporadas (estiaje y lluvias). Se seleccionaron tres puntos de muestreo P1(16°07'38.7", 91°43'57.9"), P2 (16°07'14.8", 91°43'54") y P3 (16°07'31.5", 91°43'16.6"). La Figura 1 muestra el polígono que delimita el área del PNLM donde también pueden observarse las dos lagunas de estudio y la ubicación de los tres diferentes puntos de muestreo. Las muestras se colectaron en botellas de polietileno estériles sumergidas a una profundidad de 15-30 cm, por triplicado, en los mismos puntos se realizó la colecta de microalgas en botellas estériles color ámbar, por el método de filtración y preservadas a 4 °C en oscuridad para su traslado al “Polo Tecnológico Nacional de Pruebas Analíticas en Biocombustibles” del Instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

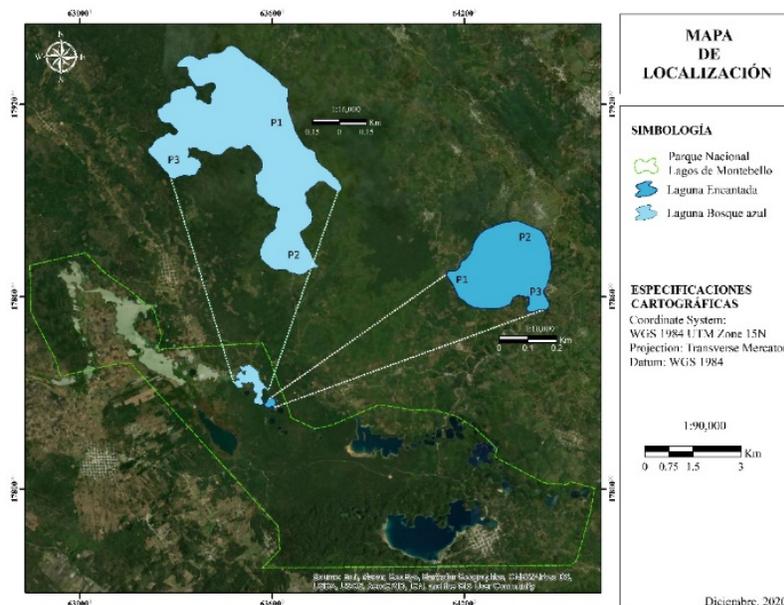


Figura 1. Mapa de ubicación de dos lagunas del PNLM.

### 2.1. Determinación de parámetros en campo

Se midieron cuatro parámetros: pH, temperatura, conductividad eléctrica (CE) y oxígeno disuelto (OD), evaluados con una sonda multiparamétrica Global Water®.

### 2.2. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Se realizó de acuerdo con el método 8000 de la US-EPA para aguas, empleando un reactor digital Hach® DRB200 y un espectrofotómetro Hach® DR-5000.

### 2.3. Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>)

Se obtuvo de acuerdo con el método respirométrico BOD Trak II mediante la diferencia de concentración de oxígeno disuelto inicial y posterior a cinco días.

### 2.4. Fosfatos disueltos

Se determinó por espectrofotometría (Murphy y Riley, 1962) con modificaciones. Se prepararon soluciones de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 5N, molibdato de amonio

((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>) 4 g aforados con 100 mL de agua destilada, tartrato de antimonio y potasio (K<sub>2</sub>Sb<sub>2</sub>C<sub>8</sub>H<sub>4</sub>O<sub>12</sub>·3H<sub>2</sub>O) 0.137 g aforados a 50 mL de agua destilada y ácido ascórbico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>) al 0.1 M. Se realizó una mezcla con 48 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 14.4 mL de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 28.8 mL de C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub> y 4.8 mL de K<sub>2</sub>Sb<sub>2</sub>C<sub>8</sub>H<sub>4</sub>O<sub>12</sub>·3H<sub>2</sub>O. Para la determinación se agregaron 1.6 mL del mix de reactivos en 8.4 mL de muestra, realizando las lecturas a 882 nm en tubos de ensayo.

### 2.5. Clorofila

Se determinó por el método 10200H de *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, donde se filtraron 150 mL de muestra usando una membrana de 47 mm, se refrigeró por 24 h a -20 °C, posteriormente se agregaron 10 mL de solución de extracción (90% acetona, 10% MgCO<sub>3</sub>) y se refrigeró a 4 °C por 2 h, transcurrido el tiempo se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 min. Se realizaron las lecturas en un espectrofotómetro Hach® DR-5000 a 630, 647, 664 y 750 nm. Los cálculos de las concentraciones en mg L<sup>-1</sup> de clorofila se realizarán de acuerdo a la siguiente fórmula que establece el método.

$$Cl a \left( \frac{mg}{m^3} \right) = (Ve) \frac{[(11.85x(A_{664} - A_{750})) - (1.54x(A_{647} - A_{750})) - (0.08x(A_{630} - A_{750}))]}{(V_f \times L)}$$

Donde, A<sub>750</sub> = densidad óptica del extracto 750 nm, A<sub>664</sub> = densidad óptica del extracto 664 nm, A<sub>647</sub> = densidad óptica del extracto 647 nm, A<sub>630</sub> = densidad óptica del extracto 630 nm, V<sub>e</sub> = volumen de acetona (mL) y V<sub>f</sub> = volumen de agua filtrada (L).

### 2.6. Nitratos y nitritos

Nitratos por el método reducción de cadmio HACH 8192 de *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* y nitritos por el método diazotización HACH 8507.

### 2.7. Colecta, identificación y análisis de peces

Se utilizaron atarrayas, trampas, anzuelos y redes para captura de los peces utilizando el equipo *Fishfinder Ff1108-1* para localizar los puntos con mayor abundancia; en colaboración con el laboratorio de ictiología de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) Unidad San Cristóbal, Chiapas, México. Con el material capturado se realizó la identificación taxonómica (Miller et al., 2009) y cuantificación reportando la riqueza como el número de especies en el sitio (Miranda, 2006). La abundancia relativa se reportó en términos de porcentajes, donde se consideró el número de individuos capturados por especie en relación con el número total de individuos colectados (Miranda, 2006).

### 2.8. Aislamiento e Identificación de microalgas

Se inocularon las muestras en medio BG11 (Andersen y Kawachi, 2004). El aislamiento se realizó por el método de diluciones seriadas en tubo Eppendorf (Andersen y Kawachi, 2004) observando en microscopio óptico binocular Zeiss

Primo Star usando los objetivos 40X y 100X y aplicando la técnica de siembra en caja por extensión con perlas de cristal y posteriormente en estría (Andersen y Kawachi, 2004).

Las cepas se mantuvieron a 24 °C con un fotoperiodo 12:12 con lámparas LED de 18 W con una intensidad de 2000 luxes.

Para la identificación morfológica se utilizó un microscopio Nikon ECLIPSE 80i con cámara para la documentación fotográfica en 40X observando la forma, largo, ancho, vainas y presencia de tilacoides.

### Análisis de datos

Los datos de parámetros fisicoquímicos se analizaron usando una prueba de Tukey con un nivel de confiabilidad de 95% en el programa *Statgraphics*®. Con las especies identificadas en ambas lagunas y de acuerdo con las características de un bioindicador (Li et al., 2010) se proponen microalgas y peces con potencial bioindicador.

## 3. Resultados

Los resultados permitieron conocer la calidad del agua de ambas lagunas, el estado trófico y las consecuencias que podría ocasionar a las comunidades biológicas, así como los organismos identificados permitieron conocer el panorama y la relación que existe entre ellas y el medio que habitan, estudio sin antecedentes en el sitio de trabajo.

### 3.1. Parámetros fisicoquímicos

Los parámetros *in situ* se presentan en el Cuadro 1, donde se observa diferencias significativas en los parámetros de

temperatura y conductividad eléctrica entre lagunas, a pesar de tener un área limítrofe común.

**Cuadro 1.** Determinación de parámetros fisicoquímicos *in situ*.

Temporada	Lagunas	pH	T (°C)	CE (μS cm <sup>-1</sup> )	OD (mg L <sup>-1</sup> )
Estiaje	La Encantada	8.21±0.10 <sup>a</sup>	25.47±0.55 <sup>b</sup>	370.80±29.90 <sup>a</sup>	6.88±0.42 <sup>a</sup>
	Bosque Azul	8.15±0.09 <sup>a</sup>	23.27±0.21 <sup>ab</sup>	415.40±32.60 <sup>b</sup>	6.67±0.12 <sup>a</sup>
Lluvias	La Encantada	8.60±0.89 <sup>a</sup>	21.27±1.00 <sup>a</sup>	427.25±1.83 <sup>bc</sup>	6.50±0.27 <sup>a</sup>
	Bosque Azul	8.36±0.18 <sup>a</sup>	22.63±1.66 <sup>a</sup>	445.00±4.10 <sup>c</sup>	6.74±0.39 <sup>a</sup>

Letras diferentes en la misma columna denotan diferencia significativa a partir del ANOVA y la prueba *a posteriori* de Tukey.

En el Cuadro 2, se presentan los parámetros que se encuentran estrechamente relacionados con la cantidad de materia orgánica presente en las lagunas. Por lo tanto, según la clasificación de la SEMARNAT (2016), el agua de ambas lagunas en las dos temporadas se clasifica como contaminada y de acuerdo con lo establecido por la OMS (2017), el agua no es apta para consumo humano, debido a que puede ocasionar enfermedades gastrointestinales. En la temporada de lluvias las concentraciones fueron menores comparadas con estiaje, debido a las diluciones ocasionadas por la lluvia.

**Cuadro 2.** Determinación de parámetros fisicoquímicos relacionados con la cantidad de materia orgánica presente en el medio.

Temporada	Lagunas	DQO (mg L <sup>-1</sup> )	DBO (mg L <sup>-1</sup> )
Estiaje	La Encantada	130.87±12.3 <sup>b</sup>	18.87±1.53 <sup>b</sup>
	Bosque Azul	129.00±4.33 <sup>b</sup>	18.87±1.22 <sup>b</sup>
Lluvias	La Encantada	110.75±5.42 <sup>a</sup>	15.2±1.25 <sup>ab</sup>
	Bosque Azul	102.75±3.50 <sup>a</sup>	12.87±1.97 <sup>a</sup>

Letras diferentes en la misma columna denotan diferencia significativa a partir del ANOVA y la prueba *a posteriori* de Tukey.

En el Cuadro 3 se presentan los parámetros relacionados con nutrientes, los cuales originan la con la productividad primaria de las lagunas. La SEMARNAT (2012) establece una concentración de 0.1 mg L<sup>-1</sup>, como límite máximo para prevenir el desarrollo de especies biológicas indeseables y controlar la eutrofización acelerada de cuerpos de agua. La OCDE (1970) declara que cuerpos de agua con concentración superior a 0.0844 mg L<sup>-1</sup> son considerados eutrofizados. Es decir, ambas lagunas presentan eutrofización.

**Cuadro 3.** Determinación de parámetros fisicoquímicos relacionados con el estado trófico de las lagunas.

Temporada	Lagunas	Fosfatos (mg L <sup>-1</sup> )	Nitratos (mg L <sup>-1</sup> )	Nitritos (mg L <sup>-1</sup> )	Clorofila-a (μg L <sup>-1</sup> )
Estiaje	La Encantada	0.88±0.017 <sup>a</sup>	0.230±0.06 <sup>ab</sup>	0.016±0.002 <sup>bc</sup>	22.88± 1.88 <sup>ab</sup>
	Bosque Azul	0.88±0.016 <sup>a</sup>	0.360±0.15 <sup>b</sup>	0.017±0.002 <sup>c</sup>	54.47±9.35 <sup>c</sup>
Lluvias	La Encantada	1.19±0.140 <sup>b</sup>	0.029±0.01 <sup>a</sup>	0.012±0.002 <sup>ab</sup>	33.31±1.55 <sup>b</sup>
	Bosque Azul	1.29±0.100 <sup>b</sup>	0.040±0.01 <sup>a</sup>	0.009±0.001 <sup>a</sup>	22.72±2.34 <sup>a</sup>

Letras diferentes en la misma columna denotan diferencia significativa a partir del ANOVA y la prueba *a posteriori* de Tukey.

3.2. Identificación de peces

En la laguna La Encantada estiaje y lluvias se obtuvo una riqueza de 4 y 3 especies, respectivamente, y en Bosque Azul una riqueza de 7 especies en cada temporada. Las abundancias relativas variaron en cada temporada, *P. sphenops* presentó mayor abundancia en temporada de estiaje con 84.62 y 52.38% en La Encantada y Bosque Azul, respectivamente (Figura 2). Cuatro especies se reportan como nativas de acuerdo a su ubicación dentro de estas: *Chuco intermedium* se encuentra sujeta a protección especial geográfica (Miller et al., 2009) enlistada en la NOM-059-SEMARNAT-2010, la especies restantes se categorizan como especies introducidas al medio para consumo humano geográfica (Miller et al., 2009).

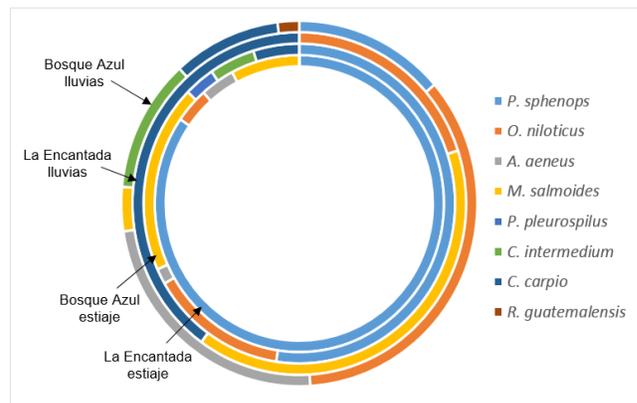
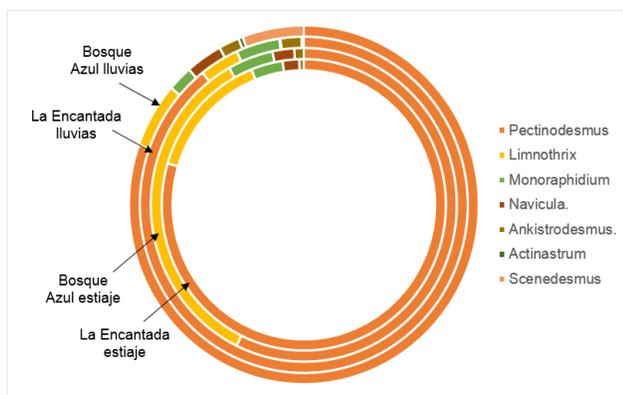


Figura 2. Abundancia de especies de peces, en dos lagunas, en las temporadas de lluvias y estiaje.

### 3.3. Identificación de microalgas

No se presentaron diferencias en la diversidad de las microalgas identificadas, en La Encantada y Bosque Azul, se obtuvo una riqueza de 5 géneros en temporada de estiaje, mientras para temporada de lluvias La Encantada se obtuvo una riqueza de 6 géneros y Bosque Azul una riqueza de 7 géneros (Figura 3). Las abundancias relativas variaron en cada temporada, presentando mayor abundancia el género *Pectinodesmus*, con 79.6-57.3% en La Encantada y Bosque Azul estiaje, respectivamente, en temporada de lluvia presentó una abundancia de 89.4-80.5% en La Encantada y Bosque Azul, respectivamente. *Limnothrix* continuó con mayor abundancia en estiaje con 14.4-34.7% en La Encantada y Bosque Azul, respectivamente y en lluvias 3.9 - 5.9% en La Encantada y Bosque Azul, respectivamente.



**Figura 3.** Abundancia relativa de géneros de microalgas identificadas en el PNLM.

## 4. Discusión

Los parámetros obtenidos en campo se encuentran dentro de los límites establecidos en la NOM-127-SSA1-1994. Sin embargo, en cuanto a la DQO ambas lagunas presentan concentraciones superiores a 40 mg L<sup>-1</sup>, La Encantada presentó concentraciones de 130.87 y 110.75 mg L<sup>-1</sup> y Bosque Azul de 129 y 102.75 mg L<sup>-1</sup> en temporada de estiaje y lluvias, respectivamente. Dichas concentraciones son superiores a lo reportado por Díaz et al. (2018) donde el promedio en La Encantada fue 48.3±27.57 y 82.36±4.64 mg L<sup>-1</sup> en temporada de estiaje y lluvias, respectivamente y en Bosque Azul Olán et al. (2018) reportaron concentraciones de 1-30 mg L<sup>-1</sup> en temporada de estiaje, muy inferior a lo que se reporta en este estudio. Se observa un aumento considerable de la DQO y DBO en las lagunas conforme el paso de los años, de acuerdo con los reportes y resultados actuales. Tales concentraciones permiten categorizar la calidad del agua de ambas lagunas como contaminadas (SEMARNAT, 2016) por las concentraciones de DQO que oscilan entre 40-200 mg L<sup>-1</sup>. En cuanto a la DBO se categoriza como aceptable porque oscila en el rango 6-30 mg L<sup>-1</sup>. Estas condiciones se deben principalmente a la presencia de descargas de aguas residuales crudas (CONAGUA, 2014), lo que podría ocasionar malas condiciones para la vida

acuática, especialmente para organismos mayores como los peces.

La concentración de clorofila se usa como indicadora de la cantidad de biomasa del fitoplancton (Aubriot y Bonilla, 2013) lo cual permite conocer un medio y los procesos de eutrofización. En cuanto a las concentraciones de clorofila, en La Encantada fueron de 22.8 y 33.3 mg L<sup>-1</sup> y en Bosque Azul de 54.4 y 22.7 mg L<sup>-1</sup> en temporada de estiaje y lluvias, respectivamente. Se reportan concentraciones promedio de clorofila en temporada de estiaje de lagos impactados dentro de los cuales clasifica a la Encantada y Bosque Azul de 31.9±27.6 µg L<sup>-1</sup> (Rivera et al., 2019). En 2020 se reportaron concentraciones de clorofila en la Encantada entre 22.8 y 29.86 µg L (Aubriot y Bonilla, 2013). Las concentraciones de clorofila-a según el índice OCDE pueden clasificar a un lago como oligotrófico (1-2.5 µg L<sup>-1</sup>), mesotrófico (2.5-7.9 µg L<sup>-1</sup>), eutrófico (8-25 µg L<sup>-1</sup>) e hipetrófico (>25 µg L<sup>-1</sup>). De acuerdo con esta clasificación, ambas lagunas presentan un estado hipetrófico. Esto repercute en la salud de las lagunas reflejado un cambio en la coloración del agua, y el enriquecimiento de nutrientes reflejado en las concentraciones de nitratos y fosfatos, favoreciendo la proliferación de organismos productores, que inicialmente pueden oxigenar el agua, pero a medida que los nutrientes escasean, las algas mueren y su descomposición viene acompañada de la disminución del oxígeno, que lleva a la eliminación casi completa de la fauna normal (Lemley y Adams, 2019). La Encantada presentó concentraciones de 0.88 y 1.19 mg L<sup>-1</sup> y Bosque Azul de 0.88 y 1.29 mg L<sup>-1</sup> en temporada de estiaje y lluvias, respectivamente. En 2019 se reportaron concentraciones de fosfatos disueltos en la Encantada en un rango de 0.004-0.23 mg L (Rivera et al., 2019). Observando el incremento de nutrientes en el transcurso de un año y a pesar de que, por la pandemia ocasionada por COVID-19, el área tuvo una baja afluencia turística.

Estas características en las lagunas podrían estar ocasionando pérdida de especies icticas y proliferación de microalgas principalmente en La Encantada donde se observan menor riqueza de peces; sin embargo, en cuanto a microalgas en la riqueza no hay variación. Los peces tienen características específicas, especialmente las especies introducidas que podrían causar interacciones perjudiciales con especies nativas o en el funcionamiento del ecosistema pudiendo afectar a la biodiversidad a través de la depredación, competencia, hibridación, uso de hábitat, reproducción, crianza y transmisión de enfermedades. Los impactos se reflejan sobre la fauna nativa, especialmente si adquieren el carácter de invasoras, debido a que proliferan a costa de las autóctonas (Gozlan et al., 2010) como es el caso de *O. niloticus* y *M. salmoides* que presentan altas abundancias principalmente en Bosque Azul. Muchas de estas especies no nativas, invasoras, son hábiles colonizadoras que toman ventaja de la limitada competencia, y suelen ser resistentes a la degradación de los hábitats (Elvira, 2005), por tal motivo una especie introducida puede resultar útil como

bioindicadora. No obstante, las especies nativas debido a las afectaciones que podrían tener en su hábitat y disminución o aumento de abundancias también podrían presentar información relevante.

Por otro lado, las microalgas son de los principales detectores de contaminación debido a su vida corta y sensibilidad a los cambios en el ambiente (Yassin y Mahmoud, 2016); éstas, al formar parte del primer eslabón de la cadena trófica pueden repercutir en gran manera en los organismos mayores que se alimentan de ellas como algunos peces omnívoros; así como en el medio, debido a que microalgas pertenecientes a la clase Bacillariophyceae producen toxinas que pueden llegar a ser nocivas para los peces (Sandoval et al., 2017) y algunas otras del género *Navicula* y *Ankistrodesmus* se han identificado en ambientes contaminados (Yassin y Mahmoud, 2016) o cuerpos de agua dulces con cargas altas de materia orgánica (Vélez et al., 2016) siendo altamente tolerantes a estos sitios. Durante el periodo de estudios se identificaron cuatro distintos géneros de fitoplancton que muestran una diversidad taxonómica. Chlorophyta fue el filo predominante durante el periodo de estudio.

La relación entre el enriquecimiento de nutrientes y la riqueza de fitoplancton ha demostrado muy a menudo ser proporcional (Fanuko, 1984). No obstante, el ingreso de contaminantes en un medio puede ocasionar la reducción tanto de riqueza, como de abundancia del fitoplancton. La clase Bacillariophyceae, comúnmente llamadas diatomeas, son comunes y abundantes tanto en zonas enriquecidas orgánicamente como zonas no enriquecidas (Nather, 1990), de acuerdo a los resultados de los parámetros como DQO, DBO y nutrientes, podría ser el caso de su presencia en zonas enriquecidas.

Se identificaron microalgas que por su riqueza fueron relacionadas con la eutrofización y contaminación del agua dentro de las cuales se encuentran los filos Euglenófitos, Chlorophytas y Diatomeas (Serrano et al., 2014). De los géneros identificados, se reportan *Pectinodesmus* y *Limnothrix* en Bosque Azul, Montebello, Chiapas (Olan et al., 2018), sin embargo, no hay reporte de estos géneros en La Encantada. De estas especies, se menciona *Pectinodesmus*, la cual se caracteriza por su abundancia en ambientes eutróficos (Olan et al., 2018), tal es el caso de ambas lagunas, por lo tanto, es importante prestar atención en estos sitios con la presencia de este.

## 5. Conclusión

Ambas lagunas estudiadas presentan un estado de contaminación debido a las altas concentraciones de DQO y DBO. El estado trófico de las dos lagunas aumentó considerablemente a lo largo de los años evidenciando el impacto en la Bosque Azul que en años anteriores, no se clasificó como contaminada. Es de suma importancia la atención oportuna a las lagunas estudiadas ya que ambas están contaminadas, lo que podría reflejar afectación en los organismos evidenciado en la disminución de las abundancias en especies nativas. La diversidad de peces fue

mayor en Bosque Azul, sin embargo, ambas lagunas presentaron la misma diversidad de microalgas. Por lo tanto, especies como *P. sphenops*, *O. niloticus*, *Pectinodesmus* y de la clase Bacillariophyceae pueden ser útiles como bioindicadores de contaminación debido a su presencia en ambas lagunas, mayores abundancias, de fácil identificación, taxonomía conocida e idóneos para experimentación. Es necesaria la evaluación de estas por si solas en bioensayos para conocer su comportamiento.

Es necesaria implementar parte de educación ambiental en la zona y atención a la problemática de la contaminación antes de que pueda llegar a afectar a otras lagunas; así como realizar estudios similares en otras temporadas y en los próximos años, para mayor cantidad de información y una toma oportuna de decisiones por los gobiernos locales, estatales y nacionales para la conservación del PNLM.

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONHACYT) por la beca otorgada, para estudios de la Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica de Silvia Monserrat Morales Hernández y al Tecnológico Nacional de México, por el financiamiento para el proyecto de investigación con clave 10175.21-P.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Referencias

- Andersen RA, Kawachi M. 2004. Traditional microalgae isolation techniques. En Andersen RA. (compilador). Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press. EUA, Pp. 83-100.
- Aubriot L, Bonilla S. 2013. Protocolo para la extracción y el análisis de clorofila-a por espectrofotometría. Sección Limnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República de Uruguay. Uruguay.
- CONAGUA. 2014. El medio ambiente en México, agua y calidad. Recuperado de [www.apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe\\_resumen14/06\\_ua/6\\_2\\_1.html](http://www.apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_resumen14/06_ua/6_2_1.html). Fecha de consulta 18 de junio de 2020.
- Díaz CC, Castañón GJ, Villalobos MJ, Ruíz VV, Baez SR, Gómez JA, Trejo VR. 2018. Quantification of pesticides and heavy metals in sediments of the “Enchanted” lake of the national park ponds of Montebello, Chiapas, Mexico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 34: Proceedings: 6th International Symposium on Sediment Management 99-104.
- Elvira B. 2005. Peces invasores: una amenaza a escala mundial para la biodiversidad. *Trofeo Pesca* 136: 104-105.
- Fanuko N. 1984. The influence of experimental sewage pollution on lagoon phytoplankton. *Marine Pollution Bulletin* 5: 195-198.
- García RJ, Castañón GJ, Gutiérrez MF, Peña OB, Trejo VR, Ruíz VV. 2018. Assessment of methods for extraction of

- metagenomic DNA from sediments of lakes of the National Park "Lagunas de Montebello", Chiapas, Mexico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 34: Proceedings: 6th International Symposium on Sediment Management 91-98.
- Gozlan RE, Britton JR, Cowx I, Copp GH. 2010. Current knowledge on non-native freshwater fish introductions. *Journal of Fish Biology* 76: 751-786.
- Lemley DA, Adams JB. 2019. Eutrophication. En: Fath B. (ed.). *Encyclopedia of Ecology*. 2a edición. Pp. 86-90.
- Li L, Zheng B, Liu L. 2010. Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: Definitions, approaches and trends. *Procedia Environmental Sciences* 2: 1510-1524.
- Miller RR, Minckley WL, Norris SM, Schmitter SJ. 2009. Peces dulceacuícolas de México. CONABIO, Sociedad Ictiológica Mexicana, ECOSUR, Consejo de Peces del Desierto.
- Miranda CG. 2006. Distribución altitudinal, abundancia relativa y densidad de peces en el Río Huarinilla y sus tributarios (Cotapata, Bolivia). *Ecología en Bolivia* 41(1): 79-93.
- Murphy J, Riley JP. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27: 31-36.
- Nather KISA. 1990. Assessment of water pollution using diatom community structure and species distribution: a case study in a tropical river basin. *Hydrobiology* 75(3): 317-338.
- Olan JK, Rosales QA, Novelo E, Álvarez GP, Castañón GJ, Enciso SS. 2018. Microalgas del lago Bosque Azul, primer reporte de *Limnithrix planctonica* en Montebello, Chiapas, México. *Agroproductividad* 12(11): 27-31.
- Parmar TK, Rawtani D, Agrawal YK. 2016. Bioindicators: The natural indicator of environmental pollution. *Frontiers in Life Science* 2(9): 110-118.
- Peña SJ, Cantera KJ, Muñoz E. 2018. Evaluación de la contaminación en sistemas acuáticos. Ed. Universidad del Valle. 312 p.
- Pulido M. 2020. Simulación del Estado Trófico en la Laguna la Encantada del Parque Nacional Lagunas de Montebello, con Modelos Matemáticos. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. México.
- Rivera HE, Vargas SM, Alcocer J, Oseguera PL. 2019. Impacto antrópico en la biomasa fitoplanctónica de lagos kársticos, Chiapas, México. En: Paz F, Velázquez A, Rojo M. (eds). 2019. Estado Actual del Conocimiento del Ciclo del Carbono y sus Interacciones en México: Síntesis a 2019. Serie Síntesis Nacionales. Programa Mexicano del Carbono en colaboración con el Centro Nayarita de Innovación y Transferencia de Tecnología, Universidad Autónoma de Nayarit, Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Nayarit y Stanford University México Economía Limpia 2050-USAID. Texcoco, Estado de México, México. Pp. 318-324.
- Sandoval HC, Paredes HE, Mejía M, Aguilera A, Uribe C. 2017. Floraciones algales nocivas y su impacto en peces. *Microalga* 2017: 12-15.
- SEMARNAT. 2016. Indicadores de calidad. Gerencia de calidad del agua. Fecha de consulta 18 de junio de 2020.
- Serrano JY, Núñez DW, Najjar AP, Mondragón JM, Pereira DT. 2014. Microalgas: indicadores ambientales de calidad de agua del humedal Torca. Resumen de congreso. Fundación Universitaria del Área Andina. Colombia.
- Vélez A, Lozano S, Cáceres T. 2016. Diversidad de fitoplancton como indicador de calidad de agua en la cuenca baja del río Lurín, Lima, Perú. *Ecología Aplicada* 15(2): 69-79.
- Yassin H, Mahmoud S. 2016. Phytoplankton abundance and structure as indicator of water quality in the drainage system of the Burullus Lagoon, southern Mediterranean coast, Egypt. *Environmental Monitoring and Assessment* 188: 530.