



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

IDENTIFICACIÓN Y FLUCTUACIÓN DE *Diatraea* spp. ASOCIADO CON GRAMÍNEAS CULTIVADAS Y SUS ENEMIGOS NATURALES EN EL ESTADO DE GUANAJUATO

JOSÉ ANTONIO RAMOS MARTÍNEZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2023



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **IDENTIFICACIÓN Y FLUCTUACIÓN DE *Diatraea* spp. ASOCIADO CON GRAMÍNEAS CULTIVADAS Y SUS ENEMIGOS NATURALES EN EL ESTADO DE GUANAJUATO**, realizada por el estudiante: **JOSÉ ANTONIO RAMOS MARTÍNEZ**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

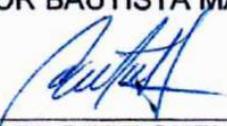
DOCTOR EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO


DR. NÉSTOR BAUTISTA MARTÍNEZ

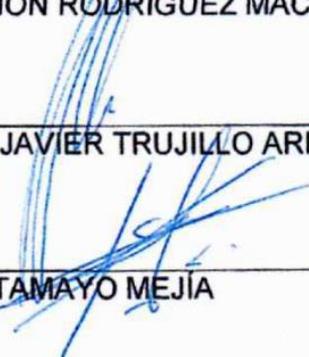
ASESOR


DR. ARIEL WILBERT GUZMÁN FRANCO

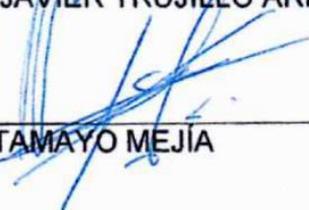
ASESOR


DR. J. CONCEPCIÓN RODRÍGUEZ MACIEL

ASESOR


DR. FRANCISCO JAVIER TRUJILLO ARRIAGA

ASESOR


DR. FERNANDO TAMAYO MEJÍA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, enero de 2023

IDENTIFICACIÓN Y FLUCTUACIÓN DE *Diatraea* spp. ASOCIADO CON GRAMÍNEAS CULTIVADAS Y SUS ENEMIGOS NATURALES EN EL ESTADO DE GUANAJUATO

José Antonio Ramos Martínez, D.C.
Colegio de Postgraduados, 2023

RESUMEN

El cultivo del maíz es atacado por muchas plagas, dentro de las más importantes, debido a la dificultad que se tiene en su manejo, tenemos a los barrenadores del tallo del género *Diatraea*, ya que estas dañan el tallo de la planta y es difícil detectarlas hasta que éste es muy avanzado. El control químico ha sido ineficaz, por lo que su manejo se ha basado en el uso de parasitoides y hongos entomopatógenos. En esta investigación, se realizaron colectas de larvas en parcelas de maíz de los municipios de Pénjamo, Abasolo, Huanímaro y Valle de Santiago con el fin de identificar morfológica y molecularmente las especies presentes en el estado de Guanajuato, así como conocer los enemigos naturales que regulan las poblaciones de esta plaga. En esta etapa se llegó a la conclusión que la única especie de barrenadores del tallo del género *Diatraea* presente en el estado de Guanajuato es *Diatraea grandiosella*, la cual es regulada naturalmente por los parasitoides *Digonogastra kimballi* y *Chrysoexorista lineata*, el depredador *Enoclerus bombycinus* y los hongos entomopatógenos *Beuveria bassiana* y *Metarhizium rileyi*. Además, se realizó una prueba de patogenicidad de los hongos entomopatógenos aislados directamente de las larvas colectadas en campo, con el fin de seleccionar las cepas más patogénicas que nos puedan servir como agentes de control biológico, en este sentido, se observó un porcentaje de mortalidad de larvas del 71% (*B. bassiana* cepa BbP001), 50% (*B. bassiana* cepa BbP002), 27% (*M. rileyi* cepa MrP001). Por último, se inoculó semilla de maíz con una dilución que contenía 1×10^8 conidios mL^{-1} de seis cepas de hongos entomopatógenos (tres de *B. bassiana* y tres de *M. anisopliae*) con el fin de llevar a cabo un ensayo sobre el efecto endofítico para determinar la capacidad de colonizar diferentes órganos (raíz, tallo y hoja) en plantas de maíz; en este ensayo se observó colonización solamente en hojas y tallos por parte de *B. bassiana*, sin llegar a observar crecimiento de *M. anisopliae*.

Palabras clave: Parasitoides, hongos entomopatógenos, hongos endófitos.

IDENTIFICATION AND FLUCTUATION OF *Diatraea* spp. ASSOCIATED WITH CULTIVATED GRASSES AND THEIR NATURAL ENEMIES IN THE STATE OF GUANAJUATO

José Antonio Ramos Martínez, D.C.
Colegio de Postgraduados, 2023

ABSTRACT

The corn crop is attacked by many pests, among the most important are the stem borers of the genus *Diatraea*. These insect pest bore the stalk of the plant and it is difficult to detect them before their damage is notorious. Chemical control has been ineffective, so their management has been based on the use of parasitoids and entomopathogenic fungi. In this research, larval field-collections were made in corn fields from communities in the municipalities of Pénjamo, Abasolo, Huanímaro and Valle de Santiago. The field-collected individuals were identified morphologically and molecularly at the level of species. We also identified the species of natural enemies that regulate the populations of stem borers. The only species of stalk borer of the genus *Diatraea* present in the state of Guanajuato that attacks the corn crop is *Diatraea grandiosella*, which is naturally regulated by the parasitoids *Digonogastra kimballi* and *Chrysoexorista lineata*, the predator *Enoclerus bombicinus* and the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium rileyi*. In addition, a pathogenicity test of the entomopathogenic fungi isolated directly from the larvae collected in the field was carried out to select the most pathogenic strains that could serve as biological control agents in the future. A percentage of larval mortality of 71% (*B. bassiana* strain BbP001), 50% (*B. bassiana* strain BbP002), 27% (*M. rileyi* strain MrP001) and 8% (control) was observed. Corn seeds were inoculated with a dilution containing 1×10^8 conidia mL⁻¹ of six strains of entomopathogenic fungi (three of *Beauveria bassiana* and three of *Metarhizium anisopliae*) to estimate the endophytic effect test and the ability to colonize different organs (root, stalk and leaf) in corn plants. Colonization was observed only in leaves and stalks by *B. bassiana*, without observing the growth of *M. anisopliae*.

Key words: Parasitoid, entomopathogenic fungi, endophytic fungi.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación y efectuar estudios de doctorado.

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, en especial al Postgrado en Fitosanidad Entomología y Acarología, por brindarme la oportunidad de lograr esta meta en mi vida.

Al Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato (CESAVEG), por el apoyo incondicional durante la fase de campo.

Al Dr. Néstor Bautista Martínez por su apoyo incondicional y sus acertadas sugerencias.

Al Dr. Ariel Wilbert Guzmán Franco, quien siempre estuvo orientándome y sugiriéndome de la manera más acertada en todas las etapas del presente trabajo.

A mis asesores, el Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel, Dr. Francisco Javier Trujillo Arriaga, Dr. Fernando Tamayo Mejía por su valiosa orientación.

Al Dr. Refugio Lomelí Flores, Dr. Jesús Romero Nápoles, Dr. José Antonio Sánchez García y Dra. Dulce H. Zetina por la ayuda brindada en la identificación de los parasitoides y depredadores.

A la Dra. Raquel Alatorre Rosas por sus sugerencias y acertada orientación en el manejo y aislamiento de los hongos entomopatógenos.

Al Dr. Guadalupe Vejar Cota por su acertada orientación y sugerencias durante la cría de los insectos.

A la M. C. Edith Blanco Rodríguez por su ayuda durante la extracción de la genitalia de los insectos y por su gran amistad.

A los ingenieros Manuel Cabrera, Carlos Ramos, Diego Castro y Ezequiel García por su apoyo brindado durante las colectas del material biológico en campo.

A mi compañera y compañeros: Raquel Salas, Eduardo Vázquez, Santos Martínez, Sigifredo y Saúl Pardo por su amistad.

A mis compañeros Salvador Lule, Jesús Alonso, Pepito y José Alfredo Arroyo por su valioso apoyo durante las colectas en Campo.

A todas aquellas personas que de algún modo intervinieron en la realización del presente trabajo.

DEDICATORIA

A Dios nuestro Señor.

A mi esposa Ma. Carmen Raya Hernández y a mis hijos Jesús Vladimir y Obed Antonio con todo mi amor, porque gracias a su apoyo, comprensión y paciencia fue posible la realización de este importante objetivo en mi vida.

A mis queridos padres J. Moisés[†] y María Luisa[†] por el apoyo moral que siempre me brindaron y por el gran sacrificio que con amor hicieron por mi para poder formarme profesionalmente.

A mis hermanos:

María Margarita

Josefina

Moisés

María Luisa

Ma. Roció

Olga Lidia

José

Por el apoyo moral que siempre me han brindado.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
DEDICATORIA	vii
LISTAS DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
Objetivo General	3
Objetivos particulares	3
Hipótesis.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Importancia del maíz (<i>Zea mays</i> L.).....	4
Importancia de los barrenadores en gramíneas cultivadas	4
Principales especies de barrenadores del género <i>Diatraea</i>	5
Ecología, biología y hábitos de <i>Diatraea</i>	6
Métodos de control de los barrenadores del tallo	7
Enemigos naturales asociados a <i>Diatraea</i> spp.	8
CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE <i>Diatraea grandiosella</i> (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) Y SUS ENEMIGOS NATURALES EN GUANAJUATO, MÉXICO, ASOCIADOS AL CULTIVO DE MAÍZ	10
1.1 RESUMEN	10
1.2 ABSTRACT	11
1.3 INTRODUCCIÓN	12
1.4 MATERIALES Y MÉTODOS	14
1.4.1 Identificación morfológica y molecular	14
1.4.2 Identificación de enemigos naturales	15
1.4.3 Análisis de datos	18
1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
1.5.1 Identificación morfológica y molecular	19
1.5.2 Identificación de enemigos naturales	21

1.6 CONCLUSIONES	25
CAPÍTULO II. EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS AISLADOS DE LARVAS DEL BARRENADOR DEL TALLO DEL MAÍZ <i>Diatraea grandiosella</i> Dyar (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)	26
2.1 RESUMEN	26
2.2 ABSTRACT	27
2.3 INTRODUCCIÓN	28
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.4.1 Obtención de los hongos entomopatógenos (HE).....	30
2.4.2 Aislamiento de los HE	30
2.4.3 Obtención de cultivos monoesporicos	31
2.4.4 Tratamientos	31
2.4.5 Porcentaje de germinación	32
2.4.6 Bioensayo de patogenicidad de <i>Beauveria bassiana</i>	32
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
2.5.1 Patogenicidad de hongos entomopatógenos	34
2.5.2 Concentración letal mediana y 90.	35
2.6 CONCLUSIONES	37
CAPÍTULO III. COMPORTAMIENTO ENDÓFITO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE PLANTAS DE MAÍZ (<i>Zea mays</i> L.).....	38
3.1 RESUMEN	38
3.2 ABSTRACT	39
3.3 INTRODUCCIÓN	40
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS	42
3.4.1 Comportamiento endófito sobre planta de maíz.....	42
3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
3.5.1 Comportamiento endófito sobre planta de maíz.....	44
3.6 CONCLUSIONES	46
CONCLUSIONES GENERALES	47
LITERATURA CITADA.....	48

LISTAS DE CUADROS

Cuadro 1. Enemigos naturales recuperados de larvas de <i>D. grandiosella</i> colectadas en diferentes sitios de muestreo en el estado de Guanajuato.....	24
Cuadro 2. Tratamientos utilizados en prueba de patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre larvas de <i>D. grandiosella</i>	32
Cuadro 3. Patogenicidad de tres cepas de hongos entomopatógenos aislados de larvas de <i>D. grandiosella</i> sobre larvas de esta misma especie a los 21 días después de la aplicación de los tratamientos.	35
Cuadro 4. CL50 y CL90 de dos cepas de <i>B. bassiana</i> sobre larvas de <i>D. grandiosella</i>	36
Cuadro 5. Manifestación endofítica de hongos entomopatógenos y otros patógenos sobre hoja, raíz y tallo de maíz 24 días después del tratamiento.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Genitales masculinos de <i>Diatraea grandiosella</i> : A) Aedeagus, B) Uncus y Gnatos, C) Valva, Vinculum, Juxta y Lobulo basal en la costa de la Valva.	20
Figura 2. Árbol de Máxima Verosimilitud de las secuencias obtenidas de <i>Diatraea grandiosella</i> (JQ888353).	21
Figura 3. Enemigos naturales obobservados en larvas de <i>Diatraea grandiosella</i> recolectadas en el estado de Guanajuato, México: a) <i>Digonogastra Kimballi</i> (adulto), b) Larva de <i>D. grandiosella</i> parasitada por <i>D. kimballi</i> , c) <i>Chrysoexorista lineata</i> (adulto), d) Pupa de <i>C. lineata</i> sobre larva de <i>D. grandiosella</i> parasitada, e) Larva de <i>Enoclerus bombicinus</i> depredando una larva de <i>D. grandiosella</i> , f) Larva de <i>D. grandiosella</i> infectada naturalmente por <i>Beauveria bassiana</i> , g) Larva de <i>D. grandiosella</i> infectada naturalmente por <i>Metarhizium rileyi</i>	22
Figura 4. Árbol de Máxima Verosimilitud de las secuencias obtenidas A) <i>Beauveria bassiana</i> (KC461051, KC461075, y KC461043) y B) <i>Metarhizium rileyi</i> (KJ398798).	23
Figura 5. % de mortalidad de larvas de <i>D. grandiosella</i> causada por la aplicación de diferentes hongos entomopatógenos a los 21 días después de la aplicación.	35

INTRODUCCIÓN GENERAL

México es considerado el centro de origen, domesticación y diversificación del maíz (*Zea mays* L.) (Fernández et al., 2013). Con una producción estimada de 22,004,274 toneladas en 2021 y se ubica como el séptimo productor a nivel mundial (SIAP, 2021).

La producción de maíz se ve afectada por una serie de plagas que le ocasionan pérdidas en el rendimiento al no ser controladas adecuadamente. Dentro de éstas, los barrenadores del tallo son considerados como una de las principales, ya que las larvas perforan el tallo alimentándose de los tejidos de conducción, debilitando a la planta, produciéndole daños fisiológicos y quebrado del tallo, provocando la caída de la planta. Además, favorece el desarrollo de hongos y bacterias agravando aún más el problema (Arispe et al., 2019).

Los productos químicos que se han empleado para el control de *Diatraea* spp. no han sido efectivos por múltiples razones, principalmente debido a los hábitos de alimentación crípticos del insecto (Hernández et al., 2012). Por tal motivo, el control debe basarse en el manejo integrado, incluyendo, por ejemplo, el control biológico y el uso de cebos con feromona (Freitas et al., 2007). El control biológico mediante la liberación de parasitoides y el uso de hongos entomopatógenos, ha sido la principal estrategia de manejo de esta plaga (Leyton-Flor et al., 2018; Rivera-Escobar y Soto-Giraldo, 2017).

Dado que los enemigos naturales tienen una respuesta diferencial en cada especie, la identificación correcta tanto de *Diatraea* como de sus agentes naturales de control, es de suma importancia (Vejar-Cota et al., 2016 y Vargas et al., 2013). Sin embargo, la identificación de los barrenadores se complica dado que comparten características similares, principalmente en el estado de huevo, larva y pupa (Passoa, 2014). Afortunadamente, la morfología de la genitalia proporciona excelentes caracteres para la correcta identificación de la mayoría de las especies de *Diatraea* (Solís y Metz, 2016), esto permite seleccionar con mayor precisión los agentes de control biológico de acuerdo a la especie de barrenador (Agnew et al., 1988).

Las ventajas de las técnicas moleculares basadas en PCR, incluyen la posibilidad de trabajar con insectos extremadamente pequeños, como muchos de los parasitoides más

efectivos en el control biológico. Además, tienen la ventaja de no verse afectadas por la edad o el estadio de los insectos. Por otro lado, en algunos casos pueden ser utilizadas en insectos secos o almacenados en alcohol por algún tiempo, como en el caso de las muestras de museo. Las técnicas moleculares permiten diferenciar especies de huevos o larvas de parasitoides dentro de sus hospedantes, lo cual suele ser imposible mediante el análisis morfológico tradicional (Alvarez et al., 2005).

La secuenciación de la subunidad I de la citocromo C oxidasa (COI) del ADN ha permitido agilizar la identificación de las especies de barrenadores en cualquier estado de su desarrollo, sin embargo, no sustituye a la taxonomía alfa o la filogenia (Vejar-Cota et al., 2016).

Considerando que, en los últimos años, los daños causados por los barrenadores del tallo del género *Diatraea* se han venido incrementando en el cultivo de maíz en el estado de Guanajuato, se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo General

Identificar las especies de barrenadores del tallo del género *Diatraea*, así como sus enemigos naturales asociados, en el cultivo de maíz en el estado de Guanajuato, México.

Objetivos particulares

- Identificar mediante las características de la genitalia masculina y mediante la secuenciación del gen de la citocromo oxidasa I (COI) las especies de *Diatraea* spp., así como a sus enemigos naturales, asociadas al cultivo de maíz en el estado de Guanajuato.
- Evaluar la patogenicidad de aislamientos provenientes de larvas de *Diatraea grandiosella* colectadas en cultivos de maíz en el estado de Guanajuato.
- Determinar el efecto dendofítico de *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el cultivo de maíz mediante los métodos de inoculación de tratamiento a la semilla.

Hipótesis

- En el estado de Guanajuato se encuentra presente sólo una especie de barrenadores del tallo del maíz del género *Diatraea* atacando a este cultivo.
- El barrenador del tallo del maíz del género *Diatraea* presente en el estado de Guanajuato es regulado naturalmente por sus enemigos naturales.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia del maíz (*Zea mays* L.)

México, es el centro de origen, domesticación y diversificación del maíz, desde el punto de vista alimentario, político, económico y social, es el cultivo más importante del país (Fernandez et al., 2013). En los últimos años, debido a la elaboración de la tortilla a partir de harina nixtamalizada el consumo se ha transformado. Sin embargo, de manera tradicional se consume como tortilla (Trigo y Montenegro, 2002). En 2021 se sembraron en el país 7,310,675 hectáreas de maíz para grano con una producción de 22,004,274 toneladas. En el estado de Guanajuato se sembraron 400, 690 hectáreas aportando una producción de 1,778,172 toneladas (SIAP, 2021).

A nivel mundial, el maíz tiene gran importancia económica como alimento humano, para el ganado o como materia prima de productos industriales (Sánchez y Pérez, 2014). Dentro de estos productos podemos mencionar el biocombustible a base de etanol a partir del almidón (Sánchez y Pérez, 2014; Raju et al., 2017), aceite comestible, en la industria farmacéutica los estilos se usan como diuréticos (Sánchez y Pérez, 2014).

Importancia de los barrenadores en gramíneas cultivadas

El complejo *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Crambidae) se presenta en una forma bastante generalizada en cualquier región del mundo donde se cultiva alguna gramínea, existiendo al menos una especie de barrenador ocupando el nicho suculento y críptico que ofrece el tallo (Smith et al., 1992, Wiedenmann et al., 2003). Es el grupo más importante de barrenadores que ocasionalmente ataca a maíz, sorgo y caña de azúcar en México, América Central y Sudamérica (Mihm, 1985, Osorio et al., 2015), además, de los hospedantes mencionados, también infesta trigo, arroz y una variedad de malezas como zacate Johnson *Sorghum halepense* (Grimi et al., 2018). No se conoce con certeza hasta qué punto la intensidad del ataque de *Diatraea* spp. afecta la producción de maíz (López et al., 1989). Estos barrenadores constituyen un complejo de especies (Vargas et al., 2018), el cual se distribuye desde los Estados Unidos de América hasta Río de La Plata (Argentina), incluyendo las Antillas (Zarate et al., 2016).

Principales especies de barrenadores del género *Diatraea*

Riley y Solís (2005), mencionan que en el hemisferio occidental documentan 57 especies de *Diatraea* que son plagas de muchos cultivos de la familia Poaceae como caña de azúcar, maíz, arroz y sorgo. Barrera et al., (2017), Solís y Metz, (2016) han reconocido por lo menos 41 especies.

La especie *Diatraea saccharalis* se encuentra distribuida desde Florida (Estados Unidos de América) hasta la región sur de Argentina; y *D. indigenella* Dyar & Heinrich, *D. centrella* Moeschler, *D. rosa* Heinrich, *D. busckella* Dyar & Heinrich, *D. crambidoidea*, *D. tabernella* Dyar, *D. guatemallela*, *D. lineolata* Walker, *D. impersonatella* Walker, son importantes a nivel suramericano (Pérez y Martínez, 2011).

La diversidad de barrenadores del tallo de gramíneas en México es amplia (Solís, 2004). Solís y Metz (2016) reportan en México ocho especies afectando a diversos cultivos, de las cuales cinco se alimentan de maíz: *D. muellerella* Dyar & Heinrich, *D. postlineella* Schaus, *D. grandiosella* Dyar, *D. lineolata* y *D. saccharalis*.

***Diatraea grandiosella* Dyar.** Localidad tipo: Guadalajara, Jalisco (Solís y Metz, 2016). Daña principalmente al maíz en Chihuahua, Colima, Jalisco, Michoacán, Morelos, Puebla, Sinaloa y Veracruz. Curiosamente, también ataca caña de azúcar solamente en Sinaloa (Box, 1953).

***Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794).** Localidad tipo: América Meridional (presumiblemente Surinam) (Solís y Metz, 2016). Es la especie del género *Diatraea* con la distribución geográfica más amplia, e incluye el sur de los E.U.A., México, el Caribe, Centroamérica y Sudamérica. Ataca más de 60 especies vegetales, entre ellas el maíz y la caña de azúcar (Bleszynski 1969, Roe et al., 1981). En México, se distribuye principalmente en Campeche, Chiapas, Guerrero, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán; se alimenta comúnmente del maíz y caña de azúcar (Box 1956,).

***Diatraea considerata* Heinrich.** Localidad tipo: El Dorado, Sinaloa (Solís y Metz, 2016). Ataca caña de azúcar y rara vez al maíz. Su distribución incluye Colima, Jalisco, Nayarit, Michoacán y Sinaloa (Box 1956, Smith y Rodríguez-del-Bosque 1994).

***Diatraea magnifactella* Dyar, 1911.** Localidad tipo: Cuernavaca, Morelos y Oaxaca (Solís y Metz, 2016). Esta especie ataca caña de azúcar y ocasionalmente al maíz. Se distribuye en Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz (Box 1953, Smith y Rodríguez-del-Bosque 1994).

Diatraea veracruzana. Box (1953) la reportó en Veracruz causando daños a caña de azúcar. Además, se ha reconocido su presencia en la parte del Pacífico mexicano en la parte norte de Sinaloa y reportada para la zona de Zacatecas, Jalisco y Colima.

***Diatraea instructella* Dyar, 1911.** Localidad tipo: Parque Popocatepetl, México. Solo se conocen dos especímenes, el holotipo femenino en el United States National Museum (USNM) Collections y un macho que se determinó que eran conespecíficos según los caracteres externos y la localidad tipo. El macho y la hembra pueden no ser realmente conespecíficos (Solís y Metz, 2016).

***Diatraea muellerella* Dyar & Heinrich, 1927.** Localidad tipo: Guerrero (Solís y Metz, 2016). Se ha reportado en maíz en los estados de Morelos y Guerrero (Riley y Solís, 2005).

***Diatraea pedidoccta* Dyar, 1911.** Localidad tipo: Córdoba, Veracruz (Solís y Metz, 2016).

Ecología, biología y hábitos de *Diatraea*

El ciclo biológico de los barrenadores presenta de una a tres generaciones por año o hasta cinco (Capineira, 2020).

Las hembras tienen un color más claro y líneas más tenues sobre sus alas, son más grandes que los machos teniendo una expansión alar de 30 a 38 mm de longitud con manchas oscuras blancuzcas, mientras los machos la envergadura alar es de 15 a 20 mm (Capineira, 2001).

Los adultos son muy activos en la noche y en el día permanecen ocultos en la base de las plantas (Serrato y Posadas, 2005). La cópula sucede en la noche y la longevidad del adulto varía de tres a siete días, la proporción de sexos es 1:1 (Rolston, 1955).

Métodos de control de los barrenadores del tallo

Control cultural: Destrucción de residuos de cosecha, los restos de la cosecha son un sitio ideal para la sobrevivencia de la plaga, por tal razón, se recomienda destruir los residuos de la cosecha y los rastrojos. Control de malezas dentro y fuera del cultivo principalmente zacates ya que estas son sitios de refugio de los barrenadores. Evitar cultivos mixtos, especialmente sorgo. Evitar el estrés de la planta por falta de agua, por lo que se deben de dar los riegos oportunamente, además de realizar una fertilización adecuada que permita un mejor desarrollo de los tallos (Vázquez y Valdez, 2012).

Control químico: El uso de insecticidas químicos nunca ha sido una opción eficiente para el manejo de los barrenadores del tallo debido a que la mayor parte de su desarrollo se lleva a cabo en el interior del tallo, además, de los problemas de resistencia a los insecticidas y los impactos negativos sobre los humanos, la biodiversidad y el medio ambiente (Atencio et al., 2021). En México se usó por mucho tiempo en los ingenios para controlar barrenadores de la caña de azúcar sin resultados satisfactorios, por lo que fueron descontinuados (Flores, 2007). Ramírez et al., 2018, realizó un estudio en el que menciona el uso histórico de plaguicidas en Veracruz en el que menciona 14 diferentes marcas comerciales dentro de los organofosforados, piretroides, carbamatos y neonicotinoides, muchos de los cuales ya están descontinuados en la actualidad.

Control biológico: Se considera que los hongos entomopatógenos juegan un papel vital como agente de control biológico de las poblaciones de insectos (Gul et al., 2014), dentro de los entomopatógenos usados para el control de los barrenadores del tallo destacan los hongos *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin y *Beauveria*

bassiana Vuillemin que infectan principalmente las larvas, aunque también pueden llegar a infectar pupas. Dentro de los parasitoides podemos utilizar como fuente de control biológico a *Trichogramma atopovorilla* (Trichogrammatidae), la cual es recomendable realizar liberaciones de este parasitoide en la etapa de huevo de *Diatraea* y *Eoreuma*; *Chelonus sonorensis* (Braconidae) en huevo y pupa. Para el caso de parasitoides de larvas de *Diatraea* se emplea a *Apanteles diatraeae* (Braconidae), *Digonogastra* sp. (Braconidae), *Conura* sp. (Chalcididae) y *Paratheresia claripalpis* (Tachinidae). También diversos depredadores se alimentan de los barrenadores en los túneles, tales como hormigas (Formicidae), tijeretas (Forficulidae) y diversas familias de escarabajos (Coleoptera) (Vázquez y Valdez, 2012).

Enemigos naturales asociados a *Diatraea* spp.

Parasitoides y depredadores.

Los principales parasitoides de barrenadores del género *Diatraea* son los Hymenópteros y los Dípteros los cuales parasitan principalmente huevos y larvas, dentro de los Hymenópteros se encuentran los microhimenópteros de la familia Trichogrammatidae (*T. minutum*, *T. fascialum*, *T. evanescens*, *T. pretiosum* y *T. galivi*) y Scelionidae (*Telenomus* sp), los cuales se han empleado en programas de control biológico en Puerto Rico, Perú, Colombia y Bolivia (Risco-Briceño, 1996). Dentro de los dípteros tenemos a *Paratheresia claripalpis* y *Metagonistylum minense* (Tachinidae), los cuales liberan comúnmente en programas de control biológico en la región azucarera del Rio Cauca en Colombia (Lastra y Gómez, 2006). Sin embargo, existen una gran variedad de especies de Dípteros que se encuentran distribuidos en diferentes países de América y las Antillas, de los cuales se pueden mencionar a *Paratheresia claripalpis* Wolp., *Lixophaga diatraea* Tons., *Metagonistylum minense* Tons., *Jayneleskia jaynesi* Aldr., *Leskiopalpus diadema* Wied. Y *Palpozenilla palpalis* Aldr. (Risco-Briceño, 1996), además parasitoide de huevos *Trichogramma exiguum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), de larvas *Lydella minense*, *Billaea claripalpis* (Diptera: Tachinidae) y *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) (Rivera-Escobar y Soto-Giraldo, 2017), *Chelonus sonorensis* (Hymenoptera: Braconidae), *Digonogastra* sp. (Hymenoptera: Braconidae), *Orgilus gelechiaeverus*

(Cushman), *Glyptapanteles* sp., *Spilochalcis* sp. y *Eucelatoria* sp. (Rodríguez del Bosque et al., 1990).

Referente a los depredadores se mencionan principalmente a hormigas y arañas que comen huevos, larvas y pupas de *Diatraea* spp. (Atencio et al., 2020), sin embargo, en estudios de depredación sobre *Diatraea* spp. que fueron conducidos por la Universidad de Florida indican la importancia de artrópodos tales como: *Solenopsis invicta* Buren, *Pheidole dentata* Mayr, *Pheidole floridana* Emery (Hymenoptera: Formicidae), *Orius* spp. (Hemiptera: Anthocoridae), *Chrysopa* sp. (Neuroptera: Chrysopidae), *Cicindela* spp. (Coleoptera: Carabidae) y diversas especies de arañas). Además, también dentro de los enemigos naturales se encuentran dípteros depredadores como taquínidos y sírfidos (Lastra y Gómez, 2006).

En un estudio reciente, *D. tabernella* revelaron bajos niveles de parasitismo por parte de *L. minense* en comparación con *D. saccharalis*, lo que sugiere cierto nivel de resistencia del huésped (Aya et al., 2019).

Entomopatógenos. Otros agentes de control biológico de los barrenadores son los entomopatógenos, que incluye bacterias, virus, hongos, nemátodos y protozoarios (Nicholls-Estrada, 2008); dentro de los cuales podemos mencionar a los nemátodos de las familias Mermithidae, Heterorabditidae y Steinernematidae; la bacteria *Bacillus thuringiensis* y los hongos *Lecanicillium* (*Verticillium* spp), *Iecanii* spp., *Metarhizium* spp y *Cordyceps* spp. (Hernández-Rosas y Figueroa-Rodríguez, 2011).

CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Diatraea grandiosella* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) Y SUS ENEMIGOS NATURALES EN GUANAJUATO, MÉXICO, ASOCIADOS AL CULTIVO DE MAÍZ

1.1 RESUMEN

Se realizó la identificación morfológica y molecular del barrenador del tallo del maíz (*Diatraea* spp.) colectados en diferentes municipios del estado de Guanajuato, México, así como de sus enemigos naturales asociados. La identificación molecular del barrenador se realizó mediante la comparación de las características de la genitalia masculina, mientras que la caracterización molecular se hizo mediante la secuenciación del gen de la subunidad I de la enzima citocromo c oxidasa (COI) del ADN mitocondrial. La identificación molecular de los hongos entomopatógenos aislados de las larvas colectadas en campo, se realizó usando como cebadores a los espaciadores transcritos internos del ADN ribosomal (ITS). La especie identificada de barrenador del tallo tanto morfológica como molecular correspondió a *Diatraea grandiosella* Dyar. Respecto a los hongos entomopatógenos, las secuencias de nucleótidos confirman que corresponden a *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Metarizhium rileyi* (Farlow) Kleper. Además, se recuperaron dos parasitoides y un depredador de larvas de *D. grandiosella*, los cuales corresponden a *Digonogastra kimballi* Kircland, *Chrysoexorista lineata* Wolp y *Enoclerus bombicinus* Chevrolat respectivamente.

1.2 ABSTRACT

We identified morphologically and molecularly the cane borer (*Diatraea* spp.) field-collected in different municipalities of the state of Guanajuato, México, together with its associated natural enemies. Morphological identification was achieved by comparing characteristics of masculine genitalia, while molecular identification was achieved by gene sequencing of subunit I of the mitochondrial DNA enzyme cytochrome c oxidase. Entomopathogenic fungi isolated from larvae field-collected were identified molecularly using internal transcribed spacers (ITS) of ribosomal DNA. The species of cane borer identified both morphologically and molecularly was *Diatraea grandiosella* Dyar. The maximum likelihood tree grouped the sequences of the species *D. grandiosella* with 99% confidence, corroborating precise identification of the species. Regarding entomopathogenic fungi, the nucleotide sequences confirm the identity of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarizhium rileyi* (Farlow) Kleper⁵ with 100% confidence. Moreover, two parasitoids and one predator of *D. grandiosella* larvae were recovered: *Digonogastra kimballi* Kircland and *Chrysoexorista lineata* Wolp and *Enoclerus bombicinus* Chevrolat, respectively.

1.3 INTRODUCCIÓN

Los barrenadores del tallo del género *Diatraea*, están ampliamente distribuidos en México, América del Sur, América Central, el Caribe y el sur de los Estados Unidos, ocasionalmente atacan a maíz (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L.) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) (Arispe et al., 2019, Osorio-Osorio et al., 2015; Francischini et al., 2017); además a trigo (*Triticum aestivum* L.), arroz (*Oriza sativa* L.) y una variedad de malezas como zacate Johnson *Sorghum halepense* (L.) Pers (Grimi et al., 2018). Estos barrenadores constituyen un complejo de especies (Vargas et al., 2015); en México se reportan 8 especies: *D. considerata* Heinrich, *D. grandiosella* Dyar, *D. instructella* Dyar, *D. lisetta* Dyar, *D. magnifactella* (Dyar & Heinrich), *D. muellerella* (Dyar & Heinrich), *D. pedidocata* Dyar y *D. veracruzana* Box, de las cuales cinco se alimentan de maíz: *D. muellerella*, *D. postlineella* Schaus, *D. grandiosella*, *D. lineolata* y *D. saceharalis*. (Solís y Metz, 2016).

La identificación de las especies del género *Diatraea* se ha basado principalmente en la disección de los genitales de los adultos machos (Barrera et al., 2017); las especies de este género no se pueden identificar utilizando únicamente caracteres externos ya que se compone de especies externamente similares (Solís y Metz, 2016). La identificación de inmaduros de *Diatraea* spp. es arriesgada y tentativa ya que comparten características similares y las técnicas de separación de especies son escasas y no siempre funciona para larvas recolectadas en el campo (Vejar-Cota et al. 2016 y Passoa, 2014). Para reconocer las especies con poca divergencia morfológica, las técnicas de ADN son útiles para tener una identificación de especies más precisa (Bravo et al., 2008). La identificación correcta de la plaga es importante para tener éxito en un programa de control biológico de *Diatraea* spp., ya que los enemigos naturales tienen una respuesta diferencial en cada especie (Vejar-Cota et al., 2016 y Vargas et al., 2013).

El manejo de *Diatraea* spp. se ha basado en gran medida en el control biológico (Vargas et al., 2015). En América Latina, el control de *Diatraea* spp. en caña de azúcar se ha basado en la cría y liberación de parasitoides, lo que se ha considerado como la práctica más eficiente (Van Lenteren y Bueno, 2003). Dentro de los enemigos naturales podemos mencionar principalmente a los parasitoides (Braconidae y Tachinidae) y depredadores

(Formicidae y Salticidae) (Atencio et al., 2020). Los parasitoides más usados en programas de control biológico son *Cotesia flavipes* Cameron (Wiedenmann et al. 2003), *Trichogramma* spp. y las moscas taquinidas *Lixophaga diatraeae* Towns., *Billaea (Paratheresia) claripalpis* Wulp., *Lydella (Metagonistylum) minense* Towns., *Palpozenillia palpalis* Aldr. y *Diatraeophaga striatalis* Towns. (Atencio, 2020).

Los hongos entomopatógenos también son agentes naturales que regulan las poblaciones de plagas y *Diatraea* spp. no es la excepción, dentro de estos hongos, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. y *Beauveria bassiana* son los más importantes; para el caso de *M. anisopliae* puede ser patogénico para todos los estadios de desarrollo del barrenador (Yasem de Romero et al., 2008, Zuñiga-Oviedo y Soto-Giraldo, 2018).

El objetivo de la presente investigación fue identificar morfológica y molecularmente las especies de *Diatraea* spp., así como a sus enemigos naturales, asociadas al cultivo de maíz en el estado de Guanajuato.

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1 Identificación morfológica y molecular

Colecta de larvas. Se realizaron colectas de larvas de *Diatraea* spp. durante el mes de noviembre de 2020 (n=100 en cada sitio de muestreo) en parcelas de maíz en las comunidades de “La granja” (N 20.3580, W -101.5720), “Las Pomas” (N 20.3510, W -101.5851), “Labor de Armenta” (N 20.409211, W -101.6572) y “Cerro Colorado” (N 20.3989, W -101.3226) perteneciente a los municipios de Huanímaro, Abasolo, Pénjamo y Valle de Santiago respectivamente, en el estado de Guanajuato, México. Las plantas de maíz que presentaban daño causado por el barrenador se abrieron longitudinalmente para extraer la larva, las cuales se colocaron individualmente en vasos de plástico debidamente sellados, se llevaron a la cámara de cría del Área de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados donde se mantuvieron a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa del $70\% \pm 10\%$ y una relación 12:12 luz-obscuridad, alimentadas con trozos de tallo de maíz.

Selección de larvas para la identificación. A las cuatro semanas de permanecer en la cámara de cría, se seleccionaron al azar 20 larvas de cada sitio de muestreo, se colocaron en agua en ebullición durante 10 segundos y se conservaron en alcohol 70% para posteriormente utilizarlas en la caracterización molecular, el resto se mantuvieron en la cámara de cría hasta que llegaron al estado adulto. De los adultos se seleccionaron los machos, a los cuales se extrajeron sus genitales para la caracterización morfológica.

Extracción de genitales. Para realizar la identificación de las especies, se extrajeron los genitales de los adultos macho. Los adultos se separaron por localidad y sitio de muestreo, a los cuales se les corto la parte distal del abdomen con una pinza entomológica en una caja Petri, siguiendo los pasos de López-Pérez (2016), se colocaron las muestras en un tubo de ensayo con 2 ml de hidróxido de potasio (KOH) al 40%, enseguida se colocó el tubo de ensayo en un vaso de precipitados con agua en ebullición a baño maría durante 20 minutos (revolviendo cada 2 minutos para acelerar la entrada del KOH en el cuerpo de la muestra), enseguida se drenó el KOH y se enjuago 3 veces en agua destilada, a continuación se colocó la muestra en alcohol etílico al 96% durante

tres minutos (repetiendo este proceso dos veces), por último se transfirió la muestra a aceite de clavo durante dos minutos para posteriormente montar los genitales en un portaobjetos con bálsamo de Canadá (Acebedo-Reyes, 2019 y Agnew et al. 1988), una vez realizado el montaje, se compararon las genitalias con las claves taxonómicas de Solís y Mets, 2016 para su identificación morfológica.

Extracción de ADN. A las larvas seleccionadas se les cortó la región cefálica, se dejaron secar durante tres horas, la cabeza se colocó en un tubo vial de 1.5 ml al cual se le agregó nitrógeno líquido a -70°C dejándolo evaporar por completo para posteriormente triturarla con una punta de mortero de plástico. Para la extracción se utilizó el kit comercial DNeasy® Blood & Tissue (United States of America), siguiendo las instrucciones del fabricante.

PCR y Secuenciación. La reacción PCR consistió de una mezcla de 14.15 μl de agua libre de nucleasas, 5 μl de Buffer GoTaq® 1X, 1 μl de MgCl_2 , 1.25 μl de dNTP's 0.2 mM, 0.75 μl del primer HCO2198, 0.75 μl del primer LCO1490, 0.1 μl de ADN polimerasa GoTaq® 1.25 U y 2 μl de ADN; para obtener un volumen total de 25 μl . La amplificación de la región COI del ADNmt se realizó en un termociclador MyCycler (BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules, CA, EE. UU.). Los regímenes térmicos de PCR para la amplificación del ADN consistió en un ciclo de 1 min a 94°C ; cinco ciclos de 1 min a 94°C , 1.5 min a 45°C y 1.5 min a 72°C ; 35 ciclos de 1 min a 94°C , 1.5 min a 50°C y 1 min a 72°C y un ciclo final de 5 min a 72°C (Hebert et al., 2003). Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.5 % en TAE 1X. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y se observaron con un fotodocumentador (Viber Lourmat Infinity-1000/26MX, Francia). Las muestras se enviaron a MacroGen Inc. (Geumchengu, Seúl, Corea) para la secuenciación directa.

1.4.2 Identificación de enemigos naturales

Obtención de enemigos naturales. Para la obtención, en cada sitio de muestreo, de los enemigos naturales, se colectaron 100 larvas en maíz próximo a cosechar (las colectas se realizaron durante el mes de noviembre de los años 2019, 2020 y 2021) (Cuadro 1). El material biológico se llevó a la cámara de cría del Área de Entomología y

Acarología del Colegio de Postgraduados, manteniéndolas individualmente en vasos de plástico transparente, las cuales se alimentaron con trozos de tallo de maíz y se mantuvieron a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $70\pm 10\%$ y un fotoperiodo de 12:12 horas luz-obscuridad; se dejaron en observación hasta que emergían los enemigos naturales. El conteo se realizó semanalmente desde el momento de la colecta hasta que el insecto llegó al estado adulto. Se realizó la suma del total de larvas que presentaron algún enemigo natural y se calculó el porcentaje de éstas.

Identificación molecular de hongos entomopatógenos. Para el caso de los hongos entomopatógenos, durante los muestreos en campo, las larvas que presentaron signos de infección por hongos se colocaron en vasos del N° 0 de una onza los cuales se llevaron al laboratorio de Patología de Insectos del Posgrado en Entomología y Acarología donde se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.5% y se colocaron en cajas Petri de 9 cm de diámetro sobre un círculo de papel filtro humedecido para generar cámara húmeda y propiciar el crecimiento de los hongos entomopatógenos. A los siete días, una vez que los insectos manifestaron los hongos, se raspó el insecto esporulado y se sembró en cajas Petri sobre medio de cultivo Agar Maltosa Sabourand Difco™ más Extracto de Levadura BD Bioxon (insectos con micelio color verde) y Agar Destrosa Sabourand BD Bioxon (insectos con micelio color blanco), se mantuvieron en incubación durante 10 días a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Una vez que crecieron los hongos, se realizó un cultivo monoesporico, los cuales una vez obtenidos, se sembraron sobre un círculo de celofán dulce estéril del mismo diámetro del interior de la caja Petri que contenía medio de cultivo como se indicó anteriormente de acuerdo a la coloración del hongo, de la cual se obtuvo el inóculo que fue utilizado para la extracción del ADN.

Extracción de ADN de hongos entomopatógenos. Para la extracción, se utilizó el kit Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep. Se pesaron 50 mg de micelio de cada hongo (cuatro de color blanco y dos de color verde) obtenido de los cultivos monoesporicos, se colocaron individualmente en tubos para Lysis BashingBead™ ZR (2.00 mm), se adicionaron 750 μl de Buffer BashingBead™, se sometieron a un disruptor (Retsch MM400, Germany) a una frecuencia de oscilación de 30 Hz durante 15 minutos. A continuación, se siguieron los pasos según las instrucciones del fabricante del kit de

extracción. La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de Agrosa al 1.5% en TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio y se observaron con un fotodocumentador (Viber Lourmat Infinity-1000/26MX, Francia).

El control biológico puede ser beneficiado al adoptar técnicas moleculares en la extracción del ADN para la identificación de especies, ya que por este medio se pueden resolver problemas inadecuados de sistemática de los enemigos naturales e insectos plaga.

PCR y secuenciación de hongos entomopatógenos. Para los hongos de coloración blanca se utilizaron los cebadores B22U y B822L; mientras que para los de color verde se emplearon los cebadores EF 1T y EF 2t. La mezcla para la reacción PCR para hongos de color blanco consistió de 18.4 µl de agua libre de nucleasa, 7 µl de Buffer 5X, 0.7 µl de dNTP's 0.2 mM, 2.8 µl de MgCl 25 mM, 1.5 µl del primer B22U, 1.5 µl del primer B822L, 0.1 µl de Taq. Polimerasa y 3 µl de ADN; para obtener un volumen total de 35 µl. La mezcla para la reacción PCR para hongos color verde fue similar a la empleada para los hongos color blanco cambiando solamente los primer's, siendo en este caso los EF1T y EF2t. La amplificación se realizó en un termociclador MyCycler (BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules, CA, EE. UU.). Los regímenes térmicos de PCR para la amplificación del ADN de los hongos color blanco consistió en un ciclo de: 1) 2 min a 94 °C; 2) 30 seg a 94 °C, 3) 30 seg a 56 °C, 4) 2 min a 72 °C (paso 2 al 4 por 40 ciclos), 5) 15 min a 72 °C y 6) ∞ a 12 °C; mientras que para los hongos color verde consistió en 1) 5 min a 95 °C, 2) 30 seg a 94 °C, 3) 30 seg a 56 °C (aumentando un °C por cada ciclo por 10 ciclos), 4). 1 min a 72 °C, 5). 30 seg a 94 °C, 6). 30 seg a 56 °C, 7). 1 min a 72 °C (pasos 5 a 7 por 36 ciclos), 8). 10 min a 72 °C y ∞ a 12 °C. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1,5 % en TAE 1X. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,1 µg mL⁻¹) y se visualizaron en un fotodocumentador (Viber Lourmat Infinity-1000/26MX, Francia). Las muestras se enviaron a Macrogen Inc. (Geumchengu, Seúl, Corea) para la secuenciación directa.

1.4.3 Análisis de datos

Los rastros de secuenciación tanto de las muestras de *Diatraea* como de los hongos entomopatógenos se ensamblaron utilizando BioEdit (Hall, 1999). Los análisis de Máxima Verosimilitud se realizaron utilizando el software Molecular Evolutionary Genetic Analysis versión 7 (MEGA 7) para Windows (Kumar et al., 2016).

1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.5.1 Identificación morfológica y molecular

Comparando las genitalias de adultos machos y siguiendo las claves de Solís y Metz (2016), no mostraron variación, independientemente del sitio en el que fueron colectados. Las características de los genitales extraídos de adultos machos presentaron el Uncus triangular, estrechándose en el ápice, en forma de pico (Figura 1A); Juxta con dos proyecciones laterales; margen costal de valva sin proceso accesorio estrecho, lóbulo costal basal puede estar presente (Figura 1C). Ápice del brazo de la juxta bidentado, con dos puntas distintas (Figura 1C). Ápice de la Juxta plano, ápice puntiagudo con un diente subapical más pequeño; ápice del brazo lateral de la juxta atenuado, gnathos sin proceso; ápice de los gnathos espatulado. Estos individuos se identificaron como *D. grandiosella* (Figura 1).

Vejar-Cota et al. (2016) menciona que la característica principal de los genitales masculinos de esta especie son la ausencia del lóbulo teguminal y la presencia de una espina subapical en los brazos de la juxta. Solis y Mets (2016), indican que en México se reportan cinco especies de *Diatraea* que atacan al cultivo de maíz en diferentes entidades federativa, sin hacer referencia al estado de Guanajuato. Las especies que mencionan son *D. muellerella* (Dyar & Heinrich), *D. postlineella* Schaus, *D. grandiosella* Dyar, *D. lineolata* y *D. sacharalis*. Este estudio sugiere que *D. grandiosella* Dyar también está presente en el estado de Guanajuato dañando principalmente al maíz difiriendo de lo reportado por Vejar-Cota (2004) quienes documentan su presencia en Chihuahua, Colima, Jalisco, Michoacán, Morelos, Puebla, Sinaloa y Veracruz. Además, este mismo autor menciona que, también ataca caña de azúcar solamente en Sinaloa y se desconoce si se trata de un biotipo diferente al que ataca al maíz en otras regiones del país. Esta especie emigró hacia los E.U.A., donde se le considera desde hace tiempo como una de las plagas más severas del maíz (Chippendale 1979).

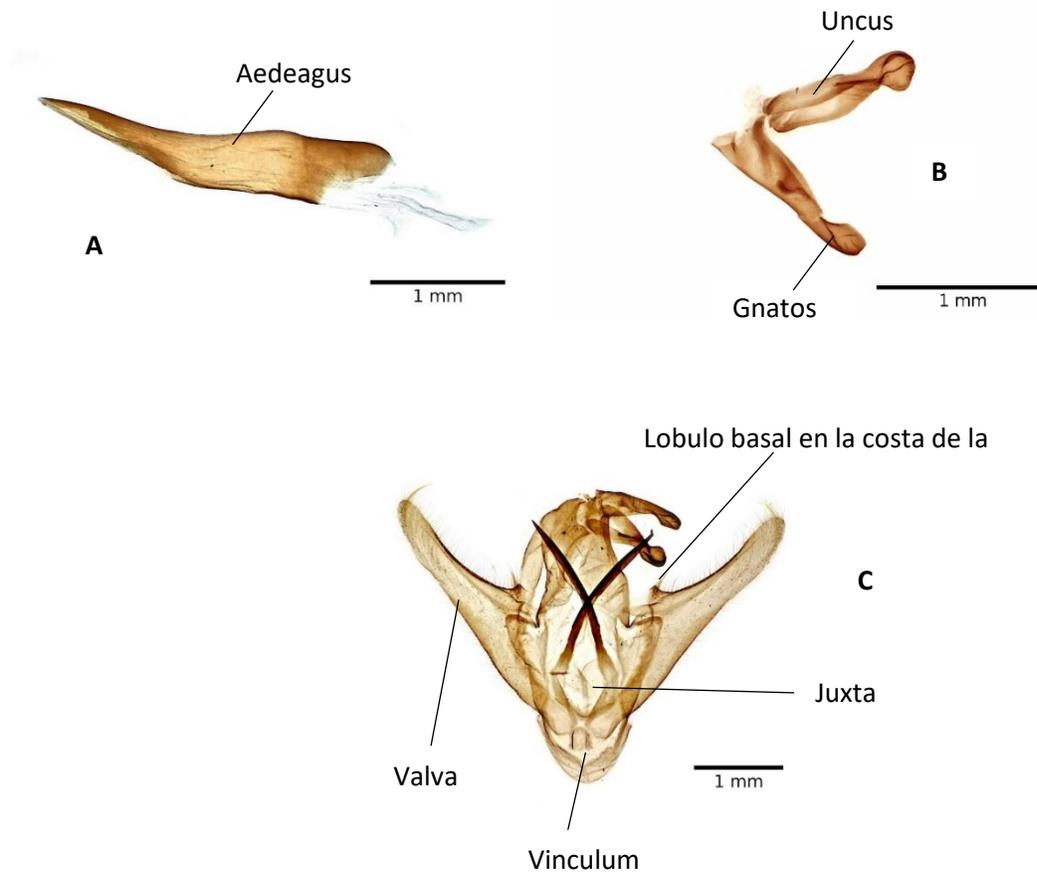


Figura 1. Genitales masculinos de *Diatraea grandiosella*: A) Aedeagus, B) Uncus y Gnatos, C) Valva, Vinculum, Juxta y Lobulo basal en la costa de la Valva.

Además de la identificación de las especies a partir de las características morfológicas de los machos adultos, también se realizó la clasificación molecular a través de la secuenciación del gen de la subunidad I (COI) de la citocromo C oxidasa. De las muestras amplificadas se tomaron al azar tres correspondientes al municipio de Pénjamo, cinco del municipio de Huanímaro y cinco del municipio de Abasolo. El agrupamiento por unión de vecinos de las secuencias de COI produjo un solo grupo que coincide perfectamente con lo encontrado a través de la comparación morfológica de los genitales masculinos de los insectos adultos, lo que nos indica claramente que la especie detectada en los sitios donde fueron colectadas todas las larvas correspondieron únicamente a *D. grandiosella*.

El árbol de Máxima Verosimilitud (Figura 2) agrupó las secuencias P5, P6, P7, H19, H21, H22, H23, H28, A5, A6, A7, A8, y A14 (P=Pénjamo, H=Huanimaro y A=Abasolo respectivamente) de la especie *D. grandiosella* con 99% de confianza, lo que corrobora la identificación precisa de esta especie.

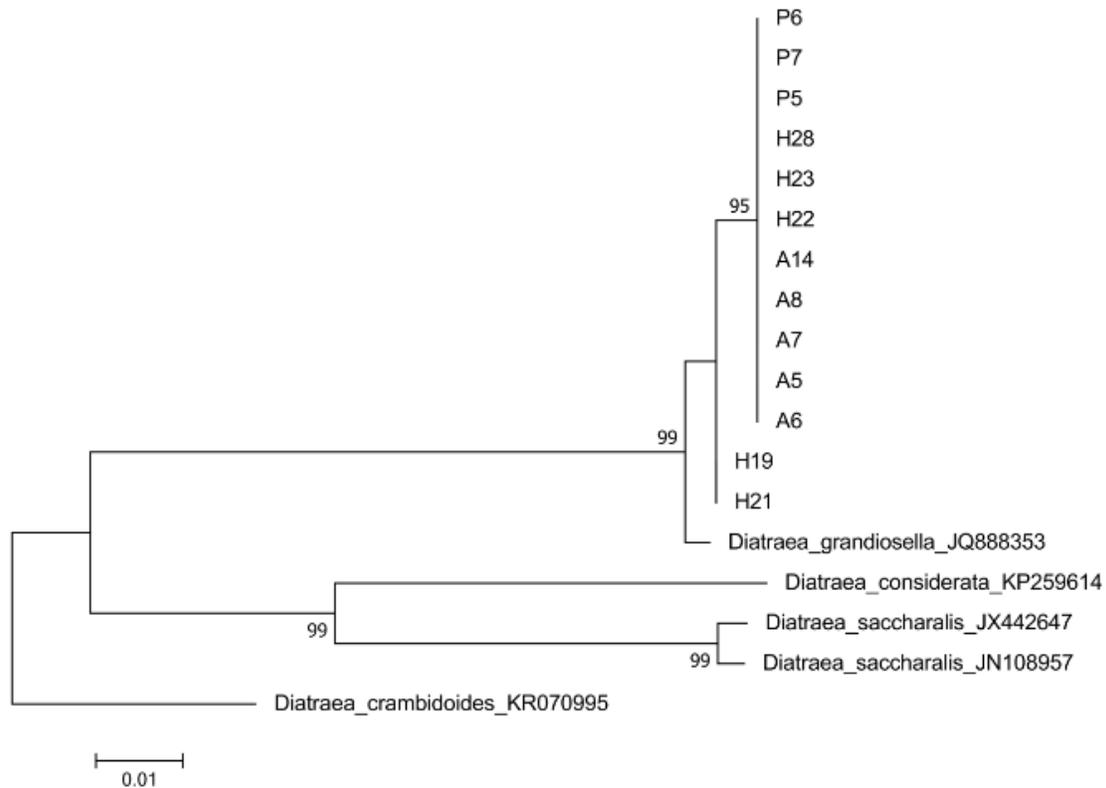


Figura 2. Árbol de Máxima Verosimilitud de las secuencias obtenidas de *Diatraea grandiosella* (JQ888353).

1.5.2 Identificación de enemigos naturales

En el Cuadro 1, se muestran los enemigos naturales asociados a larvas de *D. grandiosella* recolectadas en las diferentes comunidades y municipios del estado de Guanajuato, donde se observó el parasitoide de larva *Digonogastra kimballi* Kirkland 1989 (Hymenoptera: Braconidae) (Figura 3 a y b) y *Chrysoexorista lineata* (Diptera: Tachinidae) (Figura 3 c y d). El parasitoide *D. kimballi* fue el más abundante, estando presente en todos los sitios de recolecta. Este braconido se identificó siguiendo las claves taxonómicas de Warton et al., (1997). También se detectó a *Enoclerus bombicinus*

(Coleoptera: Cleridae) (parte del material está depositado en la Colección de Insectos del Colegio de Postgraduados) depredando larvas del barrenador del tallo del maíz (Figura 3e), solamente en la comunidad de “El Talón”, perteneciente al municipio de Pénjamo.

Además de los parasitoides mencionados, también se recuperaron hongos entomopatógenos de larvas de *D. grandiosella*, se obtuvieron hongos con micelio color blanco (Figura 3f) y hongos con micelio color verde (Figura 3g), los cuales se caracterizaron molecularmente. Las secuencias que se obtuvieron en los árboles de Máxima Verosimilitud (Figura 4A y 4B) agrupan con un 100% de confianza a los hongos con micelio color blanco obtenidos de larvas que se encontraron en el interior del tallo como *B. bassiana*; al igual, el agrupamiento de las cepas M1 y M2 obtenidas de larvas con micelio color verde y que aún no penetraban el tallo es del 100%, correspondiendo a *M. rileyi*.

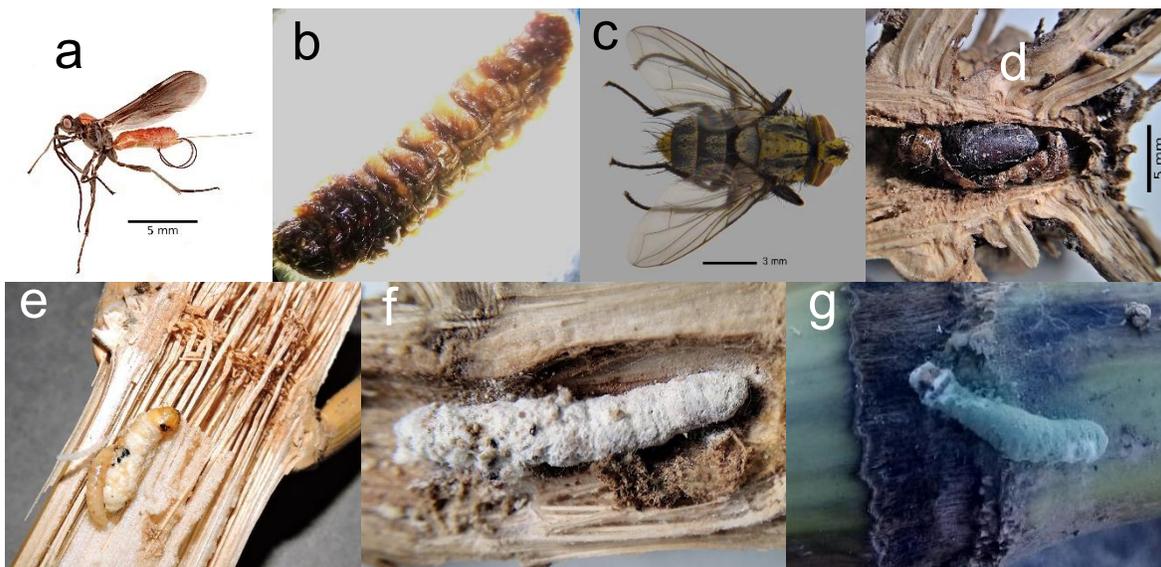


Figura 3. Enemigos naturales obobservados en larvas de *Diatraea grandiosella* recolectadas en el estado de Guanajuato, México: a) *Digonogastra Kimballi* (adulto), b) Larva de *D. grandiosella* parasitada por *D. kimballi*, c) *Chrysoexorista lineata* (adulto), d) Pupa de *C. lineata* sobre larva de *D. grandiosella* parasitada, e) Larva de *Enoclerus bombicinus* depredando una larva de *D. grandiosella*, f) Larva de *D. grandiosella* infectada naturalmente por *Beauveria bassiana*, g) Larva de *D. grandiosella* infectada naturalmente por *Metarhizium rileyi*.

Rodríguez del Bosque et al., (2020), mencionan que los barrenadores del tallo de la caña de azúcar son regulados naturalmente en el sur de Tamaulipas por los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae*; además por los parasitoides *Trichogramma atopovirila* (Trichogrammatidae), *Chelonus sonorensis* (Braconidae), *Digonogastra* sp. (Braconidae), *Apanteles diatraeae* (Braconidae), *Conura* sp. (Chalcididae) y *Paratheresia claripalpis* (Tachinidae).

Los aislamientos de *B.bassiana* se obtuvieron de larvas colectadas en el interior del tallo de maíz en las localidades de El Varal de Morales y El talón del municipio de Pénjamo, mientras que los de *M. rileyi* se aislaron de larvas que aún no habían penetrado el tallo del maíz, colectadas en El Varal de Morales y las Pomas en los municipios de Pénjamo y Abasolo respectivamente (Cuadro 1).

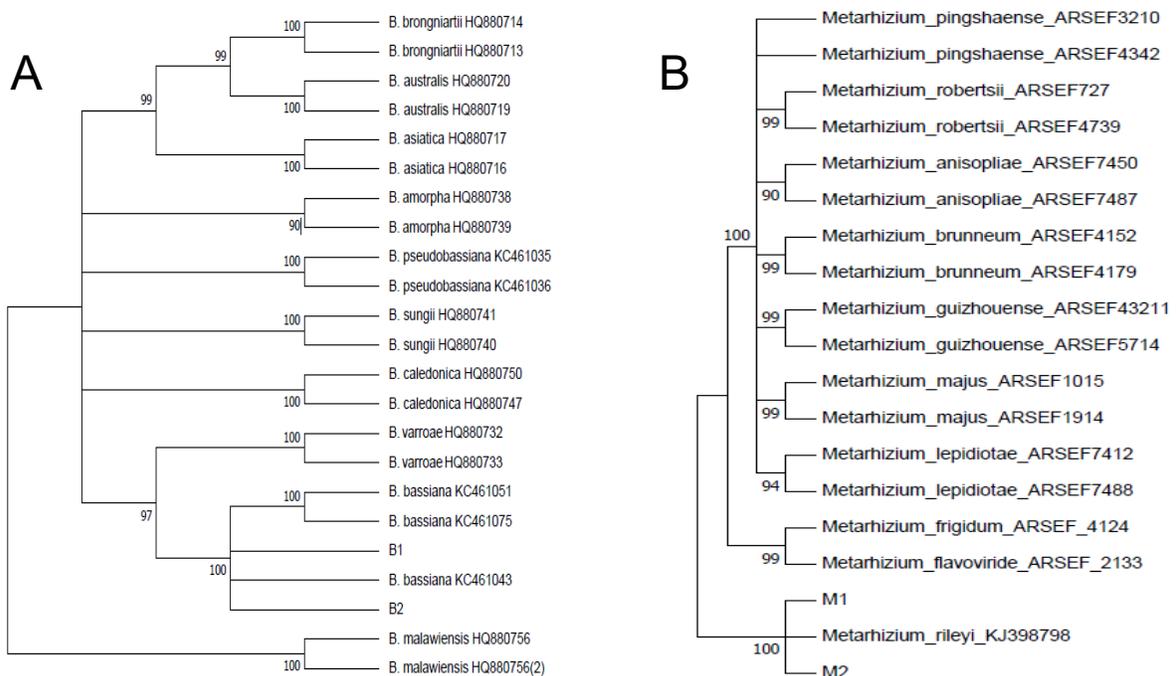


Figura 4. Árbol de Máxima Verosimilitud de las secuencias obtenidas A) *Beauveria bassiana* (KC461051, KC461075, y KC461043) y B) *Metarhizium rileyi* (KJ398798).

Cuadro 1. Enemigos naturales recuperados de larvas de *D. grandiosella* colectadas en diferentes sitios de muestreo en el estado de Guanajuato.

Municipio	Localidad	Ubicación	Enemigo natural recuperado	% de larvas con presencia de enemigos naturales	Fecha de colecta
Pénjamo	Labor de Armenta	N 20.409211	<i>Digonogastra kimbali</i>	32	Noviembre de 2019
		W -101.6572	<i>Metarhizium rileyi</i>	--	
	El Varal de Morales	N 20.317955	<i>Digonogastra kimbali</i>	14	Noviembre de 2020
W -101.7835		<i>Metarhizium rileyi</i>	--		
		<i>Beauveria bassiana</i>	4		
El Talón	N 20.3387 W -101.8639	<i>Digonogastra kimbali</i>	8	Noviembre de 2021	
		<i>Beauveria bassiana</i>	7		
		<i>Chrysoexorista lineata</i>	12		
		<i>Enoclerus bombicinus</i>	--		
Abasolo	Las Pomas	N 20.3510	<i>Digonogastra kimbali</i>	10	Noviembre de 2020
		W -101.5851	<i>Metarhizium rileyi</i>	--	
Huanímaro	La Granja	N 20.3580 W -101.5720	<i>Digonogastra kimbali</i>	7	Noviembre de 2019
Valle de Santiago	Cerro Colorado	N 20.3989 W -101.3226	<i>Digonogastra kimbali</i>	12	Noviembre de 2020

1.6 CONCLUSIONES

La combinación de la caracterización morfológica y molecular nos permitió concluir que la única especie de barrenadores del tallo del género *Diatraea* en el cultivo de maíz en el estado de Guanajuato fue *D. grandiosella*.

Las especies parasitoides de larvas del barrenador del tallo más abundantes en el estado de Guanajuato son *Digonogastra kimballi* Kirkland 1889 (Hymenoptera: Braconidae) y *Chrysoexorista lineata* Wulp 1890 (Diptera: Tachinidae), lo cual abre una ventana para la introducción de otros parasitoides de larva de esta plaga como *Cotesia flavipes* (Lepidoptera: Braconidae) y *Paratheresia claripalpis* (Tachinidae) como complemento de control biológico.

Las especies de hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium rileyi* se encuentran regulando de forma natural larvas de *Diatraea grandiosella* en el estado de Guanajuato. Estos dos hongos pueden ser aislados para reproducción masiva y emplearlos en programas de control biológico de esta plaga.

Derivado de ellos, se pueden establecer tácticas de manejo integrado mediante el uso de los productos de control biológico existentes en el mercado, disminuyendo las aplicaciones de insecticidas químicos y propiciando con esto el incremento de los enemigos naturales nativos.

CAPÍTULO II. EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS AISLADOS DE LARVAS DEL BARRENADOR DEL TALLO DEL MAÍZ *Diatraea grandiosella* Dyar (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

2.1 RESUMEN

Los barrenadores del tallo del género *Diatraea* son plagas importantes en el cultivo del maíz (*Zea mays* L.) debido a la dificultad que se tiene en su manejo, ya que estas barrenan el tallo de la planta y es difícil de presenciar su daño. Los hongos entomopatógenos constituyen una opción para su manejo. Se evaluó la patogenicidad de dos cepas de *Beauveria bassiana* (BbP 001 y BbP 002) y una de *Metarhizium rileyi* (MrP 001) con el objetivo de seleccionar la más patogénica sobre larvas del cuarto instar de *Diatraea grandiosella*. Para determinar la patogenicidad de estas cepas, se empleó una concentración de 1×10^8 esporas mL^{-1} para lo cual se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones, aplicando los tratamientos sobre trozos de tallos de maíz de 5 cm de longitud para posteriormente colocarles una larva a cada tallo (12 tallos y larvas por cada repetición, en total 48 larvas por tratamiento). La mortalidad se analizó mediante un ANOVA y una prueba de Tukey donde se observaron diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) entre los tratamientos, en el cual se presentó un porcentaje de mortalidad del 71%, 50%, 27% ocasionado por las cepas BbP 001, BbP 002, MrP 001 respectivamente. Se seleccionaron las cepas de *B. bassiana* para determinar la concentración letal 50 mediante un análisis PROBIT con el paquete estadístico SAS 9.0, se evaluaron las concentraciones (conidios mL^{-1}) de 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 4×10^8 y 7×10^8 , la cepa más patogénica fue la BbP 001 presentando una CL 50 de 1.8×10^7 y una CL 90 de 1.3×10^9 , mientras que la cepa BbP 002 fue menos patogénica con una CL 50 de 7.2×10^8 y una CL90 de 4.5×10^9 . Con base en estos resultados se concluyó que existen hongos entomopatógenos presentes en forma natural que infectan a las larvas de *D. grandiosella* que pueden ser aislados para emplearlos como fuente de control biológico.

2.2 ABSTRACT

Stem borers of the genus *Diatraea* are considered important pests in corn cultivation due to the difficulty in managing them since they bore the stem of the plant and it is difficult to witness their damage. Entomopathogenic fungi are an option for its management. The pathogenicity of two strains of *Beauveria bassiana* (BbP 001 & BbP 002) and one of *Matharhizium rileyi* (MrP 001) was evaluated to select the most virulent on the larvae of the fourth instar of *Diatraea grandiosella*. To determine the pathogenicity of these strains, a concentration of 1×10^8 spores mL^{-1} was used, for which a completely randomized design with four repetitions was used, applying the treatments on pieces of corn stems 5 cm. long to subsequently placing a larva to each stem (12 stems and larvae for each repetition, a total of 48 larvae per treatment). Mortality was analyzed by means of an ANOVA and a Tukey test, where significant differences ($\alpha=0,05$) were observed between the treatments, in which a percentage of mortality of 71%, 50%, 27% and 8% caused by the strains BbP 001, BbP 002, MrP 001 and the control, respectively, was presented. *B. bassiana* strains were selected to determine the median lethal dose through a PROBIT analysis with the SAS 9.0 statistical package. Concentrations were evaluated (conidia mL^{-1}) of 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 4×10^8 and 7×10^8 , the most pathogenic strain was BbP 001, presenting an LC50 of 1.8×10^7 and an LC90 of 1.3×10^9 , while the BbP 002 strain had an LC50 of 7.2×10^8 and an LC90 4.5×10^9 . Based on these results, it was concluded that there are existing fungi naturally present that infect the *D. Grandiosella* larva that can be isolated to use as a biological control source.

2.3 INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos constituyen un grupo con más de 750 especies, diseminados en el medio ambiente, provocando infecciones fungosas a poblaciones de artrópodos, por lo que tienen un gran potencial como agentes de control de plagas (Toledo et al., 2021; Cardona y Giraldo, 2015), ya que prácticamente todos los órdenes de insectos son vulnerables a las enfermedades fúngicas (Hernández et al., 2012). Muchas especies de hongos se utilizan actualmente como agentes de control biológico de plagas porque brindan una alternativa efectiva al uso de productos químicos y son amigables con el medio ambiente (Lovera et al., 2020) y en general son inofensivos para el hombre, los animales y las plantas (Zeimmermann, 2007).

Los hongos entomopatógenos son importantes enemigos naturales en poblaciones de insectos en los agroecosistemas, los cuales tienen la capacidad de regular las plagas (Motta-Delgado y Murcia-Ordoñez, 2011) muchos de los cuales se manifiestan con frecuencia e intensidad en determinados cultivos y plagas, constituyendo lo que se conoce como epizootias naturales (Moreno y Claro, 2010).

Los hongos fueron los primeros agentes biológicos en ser utilizados para el control de plagas. Estos microorganismos infectan a los artrópodos directamente, a través de la penetración de la cutícula y ejercen múltiples mecanismos de acción, confiriéndoles una alta capacidad para evitar que el hospedero desarrolle resistencia (Mota-Delgado y Murcia-Ordoñez, 2011).

Los géneros de mayor importancia son *Metarhizium*, *Beauveria* y *Paecilomyces*, ya que atacan un alto rango de insectos plaga (Toledo et al., 2021, Cardona y Giraldo, 2015). Para el caso de barrenadores del tallo (*Diatraea* spp.) los hongos que tienen un gran potencial como agentes candidatos de control biológico son *Beauveria bassiana* (Balsamo-Criv.) Vuill., *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch, *Metarhizium anisopliae* Metch. (Srikanth et al., 2011), *Phaecilomyces fumosoroseus*, *Hirsutella* sp., *Cylindrocarpon* sp., *Isaria* spp y *Nomuraea rileyi* (Hernández-Velázquez et al., 2012 y Vejar-Cota, 2016). Bajo ciertas condiciones climáticas, se ha informado que *B. bassiana* causa epizootias naturales en *D. grandiosella* (Hernández et al., 2012). Los hongos

tienen algunas ventajas únicas entre los entomopatógenos ya que son capaces de infectar al hospedero por contacto y adhesión de las esporas a las paredes bucales, membranales, intersegmentales o a través de los espiráculos, por lo que la ingestión del microorganismo es innecesaria (Carrillo-Rayas y Blanco-Labra, 2009). Los hongos son los entomopatógenos potencialmente más versátiles ya que estos producen toxinas, lo que les provee de un potencial para dañar rápidamente. Sin embargo, usualmente son patógenos de acción lenta. Estos hongos infectan huevos, larvas, ninfas, pupas o adultos y la infección puede ocurrir después de la germinación de la espora dentro de los intestinos del hospedero o en la superficie de la cutícula (Mantzoukas y Eliopoulos, 2020), la ruta más común de invasión del huésped es a través del tegumento externo, aunque es posible la infección a través del tracto digestivo. Los hongos producen esporas que germinan y crecen en el cuerpo del insecto huésped provocando una infección que se inicia cuando las esporas se adhieren al tegumento del insecto, donde comienza la formación del tubo germinativo y la excreción de enzimas (Hernández et al., 2012). Los conidios se adhieren a la cutícula, germinan y penetran en ella (Inglis et al., 2012), la penetración se logra por la presión mecánica del apresorio, y por la acción degradante de enzimas (Hernández et al., 2012). La mayoría de los hongos entomopatógenos, si no todos, tienen ciclos de vida que se sincronizan con las etapas del huésped del insecto y las condiciones ambientales (Shah y Pell, 2003). La muerte del huésped a menudo se debe a una combinación de la acción de una toxina fúngica, obstrucción física de la circulación de la hemolinfa, agotamiento de nutrientes e invasión de órganos (Inglis et al., 2012) debido a la formación de hifas fúngicas que invaden tejidos y órganos dentro del hemocele (Hernández et al., 2012).

Los hongos tienen varias propiedades significativas, como alta reproductividad, especificidad de objetivo, tiempo de generación corto y una fase saprobia, lo cual asegura que sobrevivan más tiempo incluso en ausencia de un huésped (Hernández et al., 2012). El objetivo de este trabajo fue evaluar la patogenicidad de aislamientos provenientes de larvas de *Diatraea grandiosella* colectadas en cultivos de maíz en el estado de Guanajuato.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1 Obtención de los hongos entomopatógenos (HE)

Se emplearon tres HE, aislados de larvas del barrenador del tallo del maíz *Diatraea grandiosella* recolectadas en campo en diferentes comunidades de Abasolo y Pénjamo, Guanajuato, México. Los hongos aislados y utilizados en el presente estudio fueron las cepas *Metarhizium rileyi* (MrP 001), *Beauveria bassina* (BbP 001) y *B. bassiana* (BbP 002). Para el caso de MrP 001 se aisló de larvas de segundo instar recolectadas sobre mazorca de maíz en la comunidad de las Pomas, Abasolo, Guanajuato ubicado en las coordenadas N 20.3510166 y W -101.5851277. Para el caso de las cepas BbP 001 y BbP 002, se aislaron de larvas de cuarto instar recolectadas del interior del tallo de maíz en la comunidad de El Varal de Morales, Pénjamo, Guanajuato ubicado en las coordenadas N 20.317955 y W -101.783519. Las larvas con presencia de HE que fueron recolectadas en campo se colocaron en forma individual en vasos de plástico de una onza y se llevaron al laboratorio de patología de insectos del Colegio de Postgraduados, donde se llevó a cabo el aislamiento.

2.4.2 Aislamiento de los HE

El aislamiento de los HE se realizó de forma directa a partir del cuerpo del insecto, para lo cual se realizó una desinfección externa del insecto con hipoclorito de sodio al 0.5% durante 3 minutos, enjuagándose con agua destilada estéril (3 veces), se pasaron los insectos a una caja Petri con papel de filtro y 2 ml de agua destilada todo estéril, se selló la caja Petri con parafilm y se dejó incubar por 7 días a temperatura ambiente. Posteriormente se raspó el insecto esporulado con un asa bacteriológica seca y estéril dentro de la campana de flujo laminar y se colocó sobre la superficie del medio de cultivo; para el caso de *Beauveria* se colocó en Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) y para el caso de *Metarhizium* en Maltosa Agar Sabourand mas extracto de lavadura (SMAy) y se incubó durante 10 días a una temperatura de 25 ± 2 °C en completa oscuridad.

2.4.3 Obtención de cultivos monoesporicos

Con el asa de siembra se extrajeron esporas de una placa de los hongos aislados, se sembraron en 10 ml de Tween 80 al 0.03% y se realizaron diluciones hasta obtener la dilución 10^{-2} . Las placas con medio de cultivo se marcaron con unas líneas guía en forma de W en el reverso de la placa con el fin de facilitar la lectura en el microscopio. Se tomó una gota de la dilución con un asa de siembra en aro y se depositó en el extremo superior de la estría, arrastrando la gota por la estría dibujada, se incubaron durante 24 horas a 25 ± 2 °C. Transcurridas las 24 horas, se ubicó una espora germinada, se cortó el bloque de agar con la espora y se llevó a una caja Petri con medio de cultivo SDA, se incubó a 25 ± 2 °C por 10 días y se seleccionaron los cultivos monoesporicos. De los cultivos monoesporicos se sembraron 10 cajas Petri de cada uno, para el caso de *Beauveria* se utilizó el SDA como medio de cultivo y para el caso de *Metarhizium* el Sabouraud Maltosa Agar y extracto de Levadura (SMAy) para la obtención de la concentración deseada para realizar los tratamientos.

2.4.4 Tratamientos

Los tratamientos empleados fueron: *Metarhizium rileyi* (MrP 001), *Beauveria bassiana* (BbP 001), *Beauveria bassiana* (BbP 002) y un testigo (Cuadro 1). Se utilizó una concentración de 1×10^8 esporas mL^{-1} en cada tratamiento. Se recolectaron larvas en campo en la comunidad de Providencia de Morales del municipio de Pénjamo, Guanajuato, las cuales se mantuvieron en el laboratorio con dieta natural a base de trozos de tallo de maíz verde de 5 cm de longitud (desinfectados con alcohol 70% durante 2 minutos, agua clorada al 5% durante 5 minutos y agua destilada durante 2 minutos tres veces), durante tres semanas para asegurar que las larvas a utilizarse en los tratamientos fueran larvas sanas del cuarto instar. Para la aplicación de los tratamientos, se rasparon 10 cajas Petri que contenían los hongos que se reprodujeron de los cultivos monoesporicos y se preparó una dilución de 1×10^8 esporas mL^{-1} para lo cual se emplearon 200 ml de esta dilución donde fueron sumergidos 12 trozos de tallo de maíz de la etapa fenológica de floración durante 10 segundos, se colocaron en forma individual en vasos de plástico transparente del número 7 a los cuales se les colocó una larva y se dejaron a temperatura ambiente durante una semana, posteriormente se revisaron las

larvas y al mismo tiempo se les cambió el alimento el cual consistió nuevamente de trozos de tallo de maíz desinfectados pero ya sin tratamiento. Se dejaron otras dos semanas y se realizó otro conteo de larvas muertas y esporuladas.

Cuadro 1. Tratamientos utilizados en prueba de patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre larvas de *D. grandiosella*.

Tratamiento	Cepa	Aislado de:	Colectada en:
1. <i>B. bassiana</i>	BbP 001	Larva de <i>D. grandiosella</i> 4° instar	Interior de tallo de maíz
2. <i>B. bassiana</i>	BbP 002	Larva de <i>D. grandiosella</i> 4° instar	Interior de tallo de maíz
3. <i>Metarhizium rileyi</i>	MrP 001	Larva de <i>D. grandiosella</i> 2° instar	Mazorca de maíz
4. Testigo	-----	-----	-----

2.4.5 Porcentaje de germinación

Para determinar el porcentaje de germinación, se marcaron 3 círculos de 1 cm de diámetro en la parte de debajo de una caja Petri con medio nutritivo SDA y SMAy para las Beauverias y Metarhizium respectivamente por cada hongo entomopatógeno donde se sembraron 10 µl de la concentración 10⁶ conidias mL⁻¹ por cada círculo marcado, dejándose en incubación a 25°C por 16 horas, transcurridas las 16 horas se observaron las conidias al microscopio contando 100 en cada círculo marcado anteriormente, calculando de esta forma el porcentaje de germinación mediante la fórmula: % G = (Nº conidias germinadas / Nº total de conidias) x 100.

2.4.6 Bioensayo de patogenicidad de *Beauveria bassiana*

Para determinar la concentración letal mediana (CL 50), se tomaron en cuenta las cepas de *B. bassiana* BbP 001 y BbP 002 las cuales fueron las que ocasionaron el mayor porcentaje de mortalidad en las larvas en las pruebas de patogenicidad. Se evaluó una serie de concentraciones preparadas por dilución a partir de la solución madre (3x10⁹ en ambas cepas). Se emplearon 5 dosis (conidias mL⁻¹) diferentes de cada hongo, 1x10⁶,

1×10^7 , 1×10^8 , 4×10^8 y 7×10^8 , las cuales se aplicaron en forma Per os (Toledo et al., 2021), a trozos de tallo de maíz en etapa de floración de 5 cm de longitud (desinfectados en alcohol 70% durante 2 minutos, agua clorada durante 5 minutos, tres enjuagadas en agua destilada estéril durante 2 minutos cada una y secados en papel toalla estéril). Se comprobó la desinfección colocando 10 μ L del agua del último lavado en tres círculos de 1 cm en una caja Petri con solución nutritiva SDA para verificar que no crecieran microorganismos en estas. Los trozos de tallo se sumergieron durante 10 segundos en una dilución de 200 mL de cada concentración del inóculo, los cuales se colocaron en forma individual en vasos de plástico transparente del número 7. Se utilizaron 48 larvas por cada dosis aplicada colocando una larva por vaso por trozo de tallo, para lo cual se emplearon 4 repeticiones de 12 larvas cada una. Los trozos de alimento fueron dejados a temperatura ambiente durante 2 semanas, tiempo en el cual fue cambiado colocándoles otro trozo de tallo de maíz desinfectados como se mencionó anteriormente pero ya sin tratamiento. El conteo final de larvas muertas se hizo a los 21 días después del tratamiento.

El diseño experimental fue completamente al azar y se utilizaron 48 insectos por tratamiento, el cual incluyó cuatro repeticiones de 12 larvas cada uno. Los datos se analizaron mediante un análisis PROBIT usando el programa estadístico SAS System 9.0.

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1 Patogenicidad de hongos entomopatógenos

En cuanto a la evaluación de la mortalidad ocasionada por la aplicación de los diferentes tratamientos en larvas de *D. grandiosella*, se observaron diferencias significativas ($\alpha=0,05$) (Cuadro 2), donde se presentó un porcentaje de mortalidad del 71%, 50%, 27% y 8% ocasionado por las cepas BbP 001, BbP 002, MrP 001 y el testigo respectivamente (Figura 1). Vejar-Cota (2016) documentó una mortalidad de larvas de *D. considerata* en caña de azúcar causada por cepas nativas del estado de Sinaloa de *B. bassiana* que va del 58.2 al 98.8% y de *M. anisopliae* del 98.2%. Por otra parte, Díaz y Lecuona (1995) evaluaron 30 cepas de *B. bassiana* aisladas de *D. sacharalis*, observando una mortalidad de larvas de la misma especie de barrenador que va del 30 al 96% de las cuales solo 6 provocaron una mortalidad igual o mayor al 80%. Los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* han mostrado un control eficiente sobre diferentes especies de barrenadores, (Lagaspi et al., 2000). En otro estudio realizado por Zúñiga-Oviedo et al., (2016) con diferentes bacterias y hongos entomopatógenos (*B. bassiana* y *M. anisopliae*) reportaron una mortalidad del 100% con los productos químicos mientras que con los hongos *B. bassiana* la mortalidad oscilo entre el 55 y el 70% y con *M. anisoplie* la mortalidad fue del 31% empleando una concentración de ambos entomopatógenos de 2×10^6 .

Cuadro 2. Patogenicidad de tres aislamientos de hongos entomopatógenos aislados de larvas de *D. grandiosella* sobre larvas de esta misma especie a los 21 días después de la aplicación de los tratamientos.

Cepa	% de mortalidad
<i>B. bassiana</i> (BbP 001)	71 a*
<i>B. bassiana</i> (BbP 002)	50 ab
<i>M. rileyi</i>	27 bc
Testigo	08 c

* Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0,05$).

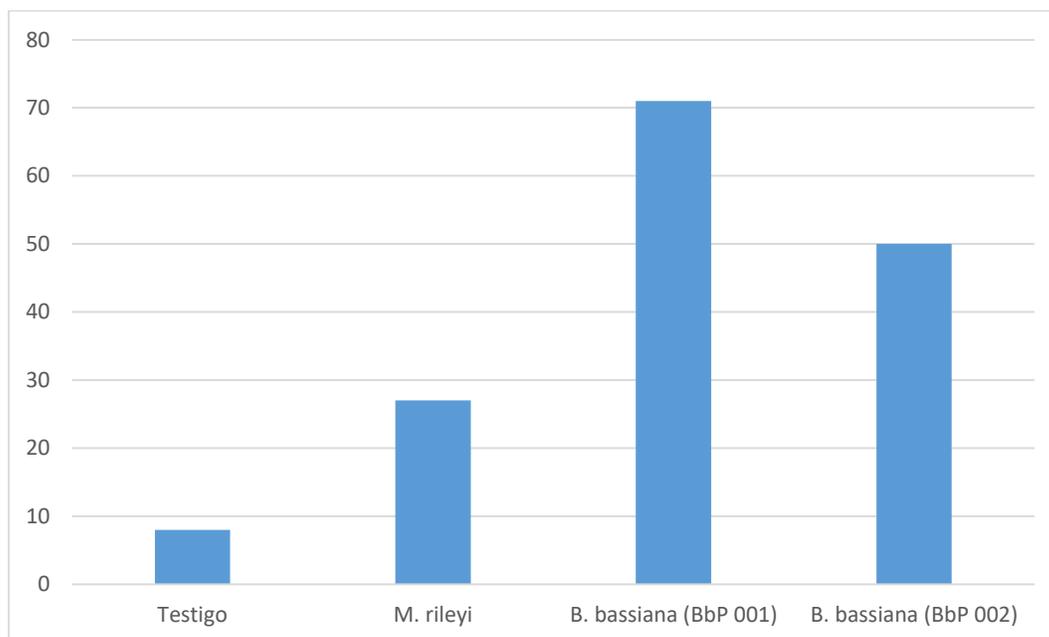


Figura 5. % de mortalidad de larvas de *D. grandiosella* causada por la aplicación de diferentes hongos entomopatógenos a los 21 días después de la aplicación.

2.5.2 Concentración letal mediana y 90.

La cepa más patogénica fue la BbP 001 presentando una CL 50 de 1.8×10^7 y una CL 90 de 1.3×10^9 , mientras que la cepa BbP 002 la CL 50 fue de 7.2×10^8 y una CL90 de 4.5×10^9 (Cuadro 3).

Cuadro 3. CL50 y CL90 de dos cepas de *B. bassiana* sobre larvas de *D. grandiosella*

Cepa	CL50	Limites fiduciales 95%	CL90	Limites fiduciales 95%
BbP 001	1.8×10^7	$8.9 \times 10^6 - 3.2 \times 10^7$	1.3×10^9	$5.3 \times 10^8 - 4.8 \times 10^9$
BbP 002	7.2×10^7	$4 \times 10^7 - 1.3 \times 10^8$	4.5×10^9	$1.7 \times 10^9 - 2.2 \times 10^{10}$

Zuñiga et al., (2016) realizaron un estudio en el cual emplearon diferentes hongos y bacterias entomopatógenos, donde observaron que la dosis requerida de una cepa de *B. bassiana* (Bb-HN1) requería una concentración de esporas de 1.6×10^6 y 1.2×10^8 para ocasionar la muerte del 50% y del 90% respectivamente de larvas de *D. sacharalis*.

Por otro lado, Wenzel et al., (2006) observaron que la mortalidad a concentraciones de 5×10^7 , 1×10^8 y 5×10^8 conidios mL^{-1} fue estadísticamente igual y alcanzó valores entre 65 y 89%. La CL 50 determinada para el día 6 fue de $1,58 \times 10^7$ conidios mL^{-1} . Los autores encontraron que la CL50 para la etapa prepupal fue de $1,27 \times 10^5$ conidios mL^{-1} . También en este trabajo se evaluaron concentraciones de $5,5 \times 10^4$ a $5,5 \times 10^8$ conidios mL^{-1} y los valores de mortalidad obtenidos oscilaron entre 40 y 97,5 % de menor a mayor concentración, observados nueve días después de la inoculación del hongo.

Alves et al., (2002) mencionan que en bioensayos realizados donde emplearon cepas de *B. bassiana* en levadura y en conidios, la mortalidad aumentó con el tiempo y con las dosis, independientemente de la estructura (células levaduriformes o conidios), donde las mortalidades en los tratamientos con 10^7 y 10^8 células mL^{-1} fueron significativamente más altas que la mortalidad de testigo después de 15 días.

2.6 CONCLUSIONES

Las cepas del hongo entomopatógeno *B. bassiana* que fueron empleadas en esta investigación, representan una buena opción para emplearse en programas de control biológico de *D. grandiosella* ya que la evaluación de la patogenicidad mostro buenos resultados, causando un mayor porcentaje de mortalidad en comparación con *M. rileyi* de larvas del cuarto instar de ésta palga.

Las dosis requeridas de *B. bassiana* de las cepas BbP 001 y BbP 002 para lograr el 50% de mortalidad de larvas de *D. grandiosella* es de 1.810^7 y 7.2×10^7 respectivamente.

Las dosis requeridas de *B. bassiana* de las cepas BbP 001 y BbP 002 para lograr el 90% de mortalidad de larvas de *D. grandiosella* es de 1.310^9 y 4.5×10^9 respectivamente.

De acuerdo a lo anterior podemos mencionar que existe una diversidad de hongos entomopatógenos con diferentes grados de patogenicidad, los cuales deben ser seleccionados para elegir aquellos que presenten las mejores características para crear cepas que nos permitan tener el mayor éxito posible en el control de plagas.

CAPÍTULO III. COMPORTAMIENTO ENDÓFITO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE PLANTAS DE MAÍZ (*Zea mays* L.)

3.1 RESUMEN

Muchas especies de hongos entomopatógenos pueden colonizar los tejidos de las plantas, por lo que podrían ser la alternativa más viable para el control de los barrenadores del tallo en estado larval en el interior de las plantas. Se trató semilla de maíz híbrido Berrendo de Asgrow® con una dilución fúngica de 1×10^8 conidios mL^{-1} de tres cepas de *Beauveria bassiana* (Bb 88, BB 53 y 30M) y tres cepas de *Metarhizium anisopliae* (Ma 129, MGC Nat y 140 M). Se cultivaron las plantas de maíz a partir de la semilla tratada con los hongos mencionados, se cosecharon en la etapa fenológica V4 y se tomaron muestras de raíz, tallo y hoja para evaluar la colonización de los hongos. Se revisaron las muestras cada 2 días para observar el crecimiento de otros patógenos asociados con los órganos de las plantas. Se observó que solamente las tres cepas de *B. bassiana* colonizaron los tejidos de hoja y el tallo de la planta de maíz, no se observó colonización en las raíces por ninguna de las cepas fúngicas. Nuestro estudio sirve de base para determinar la capacidad de los hongos entomopatógenos de colonizar los tejidos de la planta de maíz y de esta forma hacer llegar el hongo al interior de la planta para contrarrestar el daño ocasionado por los barrenadores del tallo ya que estos no pueden ser alcanzados por los productos químicos que son utilizados para su control.

3.2 ABSTRACT

Many species of entomopathogenic fungi can colonize plant tissues, so they could be the most viable alternative for the control of stem borers in the larval stage inside plants. Maize seed was treated with a fungal dilution of 1×10^8 conidia mL⁻¹ of three strains of *Beauveria bassiana* (Bb 88, BB 53, and 30M) and three strains of *Metarhizium anisopliae* (Ma 129, MGC Nat, and 140 M), maize plants were grown from seed treated with the aforementioned fungi, maize plants were harvested at phenological stage V4 and root, stem and leaf samples were taken to evaluate fungal colonization. Samples were individually sterilized, cut into multiple sections, and incubated for 24 days in 9 cm diameter Petri dishes with Destrosa Sabourand Agar culture medium. Samples were checked every 2 days for the growth of other pathogens associated with plant organs. It was observed that only *B. bassiana* strains colonized the leaf tissues and stem of the maize plant. No colonization was observed in the roots by any of the fungal strains. Our study serves as a basis to determine the ability of entomopathogenic fungi to colonize corn plant tissues and thus reach the fungus inside the plant to counteract the damage caused by stalk borers since they cannot be reached by the chemical products used to control them.

3.3 INTRODUCCIÓN

Las plantas superiores proporcionan hábitats complejos donde pueden albergar múltiples especies de microorganismos, predominando los hongos y bacterias, pudiendo colonizar cualquier parte de la planta sin causar síntomas de enfermedad visibles (Stone et al., 2004; Russo et al., 2019; Jaber y Ownley, 2018)

Una de las características más notables de los hongos entomopatógenos es su diversidad en la especificidad del huésped, que va desde muy estrecha para los patógenos obligados hasta muy amplia para los más facultativos, de esta manera, varios de los géneros de entomopatógenos fúngicos con amplios rangos de huéspedes son endófitos (Wraight et al., 2007).

Los microorganismos endófitos pueden o no crecer en medios de cultivo, es decir, ser o no cultivados, y habitar el interior de los tejidos y órganos de la planta sin causar daño a su huésped y sin producir estructuras que emerjan del exterior de la planta (Sun y Guo, 2012).

Los hongos entomopatógenos endófitos juegan un importante papel en la protección de las plantas contra plagas y enfermedades, estos podrían ser la alternativa más apropiada para el control de plagas en estado larval en el interior de la planta (Gavira et al., 2020).

Existe evidencia que muchas especies de hongos entomopatógenos pueden colonizar los tejidos de ciertas plantas (Mantzoukas y Eliopoulos, 2020). Aunque solo unas pocas especies de hongos entomopatógenos se han reportado como endófitos naturales, ha habido muchos intentos exitosos de introducirlos artificialmente en las plantas usando diferentes técnicas de inoculación como aspersión foliar, inmersión de raíces, inyección de tallos o empapando el suelo (Russo et al., 2019).

Varios estudios han mostrado que los hongos endófitos pueden causar efectos perjudiciales razonables sobre los insectos que se alimentan de plantas que albergan estos tipos de hongos (Vidal y Jaber, 2015). *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin es el hongo endófito entomopatógeno más estudiado (Gavira et al., 2020; Parsa et al., 2013), éste ha sido reportado como endófito en maíz (Vega et al., 2008) donde ha sido

inoculado para el control de *Ostrinia nubilalis* (Hübner), y en otros cultivos como palma aceitera, en café, cocoa y banano, para el control de barrenadores (Gavira et al., 2020). Recientemente varios géneros de hongos entomopatógenos se han aislado como endófitos naturales de varios tejidos de la planta del café en varios países, estos hongos incluyen a los géneros *Acremonium*, *Cladosporium*, *Clonostachys* y *Paecilomyces* (Jaber y Ownley, 2018). El objetivo del presente estudio es evaluar el efecto dendofítico de *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el cultivo de maíz mediante los métodos de inoculación de tratamiento a la semilla.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Comportamiento endófito sobre planta de maíz

Cultivos fúngicos. En este ensayo se utilizaron tres cepas de *Beauveria bassiana* (Bb 88, BB 53 y 30 M) y tres cepas de *Metarhizium anisopliae* (Ma 129, MGC Nat y 140 M) pertenecientes a la colección de patología de insectos del Posgrado de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados. Para su reactivación, se preparó una dilución de cada cepa en tubos viales de 1.5 mL, tomando 1 μL de la dilución madre conservada en ultra congelador a -20°C ésta se diluyó en 999 μL de Tween 80 al 0.03%, mezclándola con un Bortex durante 1 minuto, de ésta dilución se tomaron 10 μL , se colocaron en cajas de Petri con medio de cultivo Sabourand Dextrosa Agar (SDA) y con una espátula Drigalski se distribuyó en la superficie del medio de cultivo; se pusieron a incubar a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ en total obscuridad durante 10 días para propiciar su esporulación. Para la obtención del inóculo, se rasparon cinco cajas Petri que contenían los hongos que fueron cultivados y se colocó el inóculo en tubos Falcon con 30 mL de Tween 80 al 0.03%, se agitaron en el bortex durante un minuto, se filtraron con una gasa estéril para eliminar los restos de micelio, colocando la dilución obtenida en matraces Erlenmeyer de 250 ml.

Preparación del inóculo. De la dilución obtenida (dilución madre) se tomó una alícuota de 10 μL de cada una de las diluciones madre y se colocó en cámara de Neubauer en la que se realizó el conteo de esporas obteniendo de esta manera la concentración inicial (C_i). Para obtener la concentración final deseada (1×10^8 conidios mL^{-1}), se ajustó mediante la fórmula: $V_i \times C_i = V_f \times C_f$.

Una vez obtenida la dilución deseada de 1×10^8 conidios mL^{-1} se procedió a preparar la semilla de maíz para ser inoculada. La semilla de maíz que se utilizó fue el híbrido Berrendo de Asgrow®, la cual fue preparada dentro de la campana de flujo laminar de la siguiente manera:

1. Se lavó la semilla en agua corriente hasta eliminar el tratamiento químico.
2. Se dejó secar sobre papel toalla.

3. Se desinfectó la semilla sumergiéndola durante 2 minutos en alcohol 70%, enseguida se pasó a una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 3% durante 5 minutos, se enjuago tres veces en agua destilada estéril durante 2 minutos y se dejó secar en papel toalla estéril.

Para verificar la desinfección de la semilla se tomaron tres muestras de 10 µL cada una y se colocaron en tres puntos de una caja de Petri con medio de cultivo SDA para observar que no hubiera crecimiento de microorganismos no deseados.

La inoculación de la semilla se realizó mediante el método de inmersión, la cual consistió en preparar una dilución de 30 ml que contenía 1×10^8 conidios mL^{-1} en la cual fue sumergida la semilla durante 24 horas previo a la siembra. Para la siembra se usó como sustrato Peat Moss Turba de sphagnum OMRI, el cual fue esterilizado en autoclave a 120°C durante 45 minutos, se utilizaron bolsas negras para cultivo de 25 x 25 cm a las cuales se les colocó 1,300 gr de sustrato húmedo y se sembró la semilla, se dejó crecer hasta la etapa vegetativa V4, se extrajo la planta completa de la maseta y se lavó con agua del grifo para quitar los restos de sustrato, posteriormente se tomó un trozo de raíz, tallo y hoja de aproximadamente 5 cm cada uno; los trozos se colocaron individualmente en bolsas de papel estraza de 1/8 y se llevaron a la campana de flujo laminar donde se desinfectaron de la misma forma como se desinfectó la semilla, posteriormente se cortaron trocitos de 3 mm, cubitos de 3x3x3 mm y cuadros de 5x5 mm de raíz, tallo y hoja respectivamente. Se colocaron los trozos de cada órgano vegetal (raíz, tallo y hoja) en dos cajas de Petri con medio de cultivo SDA (seis en cada caja), se sellaron con parafilm y se llevaron a incubación a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Se revisaron cada 48 horas durante 15 días para contar el número de órganos que presentaban crecimientos fúngicos.

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1 Comportamiento endófito sobre planta de maíz

Se observó el efecto endófito de las cepas de *Beauveria* según el color del micelio, las cuales fueron las únicas que tuvieron este comportamiento, colonizando hoja y tallo (Cuadro 4). Respecto a hoja, la cepa BB 53 colonizó al 25% de los trozos, mientras que, en tallo las cepas Bb 88, 30M y BB 53 se manifestaron en un 10.4, 2.1 y 4.2% respectivamente. Se observó el crecimiento de bacterias, manifestándose en las raíces y tallos en todos los casos, así como el crecimiento de *Trichoderma* sp. y *Penicillium* sp (Cuadro 4).

Probablemente el desarrollo de bacteria, *Trichoderma* y *Penicillium* inhibieron el crecimiento de los hongos entomopatógenos, por lo que se recomienda repetir este estudio agregando un antibiótico para evitar el crecimiento de bacterias, además de utilizar otro tipo de sustrato, ya que el Peat moss por su origen contiene altas cantidades de microorganismos como el hongo *Trichoderma* y el tiempo de esterilización no es suficiente para eliminarlo en su totalidad.

Cuadro 4. Manifestación endofítica de hongos entomopatógenos y otros patógenos sobre hoja, raíz y tallo de maíz 24 días después del tratamiento.

Cepa	Endofitismo (%)			Bacterias (%)			Otros hongos (%) *		
	Hoja	Raíz	Tallo	Hoja	Raíz	Tallo	Hoja	Raíz	Tallo
Bb 88	0.0	0.0	10.4	0.0	50.0	8.3	0.00	35.4	2.1
30M	0.0	0.0	2.1	0.0	39.6	20.8	0.00	45.8	4.2
BB53	25.0	0.0	4.2	0.0	33.3	18.7	0.00	45.8	2.1
140 M	0.0	0.0	0.0	0.0	39.6	8.3	0.00	37.5	0.0
Ma 129	0.0	0.0	0.0	0.0	35.4	16.7	0.00	31.2	6.2
MGC Nat	0.0	0.0	0.0	8.3	31.2	6.2	0.00	62.5	18.7
Testigo	0.0	0.0	0.0	0.0	45.8	12.5	0.00	52.1	0.0

**Penicillium*, *Trichoderma* y *Fusarium*

En un estudio realizado por Posadas et al., (2007) donde evaluaron el efecto endofítico de *Beauveria bassiana* sobre plantas de café, documentan el aislamiento de *Penicillium citrinum* *Trichoderma* sp y *Fusarium oxysporum*, lo cual coincide con lo reportado en el presente trabajo.

La mayoría de los hongos entomopatogenos se han usado con el fin de controlar las plagas a través del método de inundación. Sin embargo, debido a que varias especies de hongos ocurren naturalmente en diferentes especies de plantas y pueden colonizar los tejidos de estas, es importante tratar de introducirlos artificialmente por medio de diferentes técnicas de inoculación como puede ser por medio de aspersión foliar, inmersión de raíces, inyección de tallos o empapando el suelo (Russo et al., 2019)

Mantzoukas y Eliopoulos (2020), mencionan que *B. bassiana* coloniza numerosos cultivos, como maíz, trigo, algodón, tomate, vid, sorgo y cítricos, los cuales reducen las infestaciones de plagas, principalmente de larvas.

En un estudio realizado por Gavira et al., (2020), donde inocularon plantas germinadas a partir de semilla de coco, por los métodos de aspersión, inyección al tallo y en drench al sustrato, documentan que los tres métodos de inoculación fueron efectivos para la colonización endófito de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. La inoculación por aspersión mostró mayor colonización en hojas que en peciolo, tallo y raíz; mientras que la inoculación por inyección de tallo la colonización fue mayor en el tallo que en raíces, sin llegarse a manifestar en hojas y peciolo; por último, la inoculación en drench fue más efectiva en las raíces.

En otra investigación realizada por Russo et al., (2015), menciona que *B. bassiana* se inoculó exitosamente como endófito en plantas de maíz, tabaco, trigo y soya, mediante aspersión foliar, inoculación de semilla y por inmersión de raíz. En maíz, la mayor recuperación de los hongos endófitos fue cuando se empleó el método de inoculación por tratamiento a la semilla, mientras que en café la mayor recuperación ocurrió con el método de inyección directa a la planta y en banano fue sumergiendo plantas en concentraciones de conidios.

3.6 CONCLUSIONES

Las cepas de *B. bassiana* fueron las únicas que mostraron comportamiento endófito, colonizando hojas y tallo de maíz 24 días después de la inoculación.

Dado que además de los hongos entomopatógenos con los que fueron inoculadas las semillas de maíz, se manifestaron también bacterias y otros hongos, en experimentos futuros debe considerarse el uso de algún antibiótico que inhiba el crecimiento de bacterias, además considerar el aumento en el tiempo de esterilización del sustrato o en su defecto utilizar un sustrato que facilite su esterilización.

Es necesario realizar más experimentos para determinar si las plantas inoculadas tienen algún efecto sobre las larvas de *D. grandiosella*.

CONCLUSIONES GENERALES

La especie de barrenadores del tallo que ataca al cultivo de maíz en el estado de Guanajuato, corresponde a *Diatraea grandiosella*. La corroboración de los individuos de esta especie recolecta de larvas en diferentes comunidades y municipios fue mediante la identificación morfológica por medio de la comparación de los genitales masculinos de los adultos, así como por medio de la técnica molecular a través de la secuenciación de la enzima citocromo c oxidasa (COI) del ADN mitocondrial.

Se detectó la presencia de enemigos naturales como *Digonogastra kimballi* (Hymenoptera: Braconidae), *Chrysoexorista lineata* (Diptera: Tachiniidae), *Enoclerus bombicinus* (Coleoptera: Cleridae) y los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metharizim rileyi* regulando naturalmente a ésta plaga, en este sentido, dado que el control químico no ha sido efectivo para el control de ésta plaga se sugiere dejar de aplicar insecticidas para de esta manera permitir el incremento de los enemigos naturales que regulan la población de dicha plaga.

Existen hongos entomopatógenos que colonizan los tejidos de las plantas comportándose como endófitos, en este caso *B. bassiana* tuvo ese comportamiento, siendo capaz de colonizar hoja y tallo del maíz. Dado que los resultados no fueron contundentes, se sugiere repetir este ensayo sustituyendo al Peat moss como sustrato e incrementar los tiempos de esterilización.

LITERATURA CITADA

- Acevedo-Reyes, N., Zetina, D. H., Blanco-Rodríguez, E., López-Buenfil, J. A., & Martínez-Rosas, R. (2019). Méndez-Herrera Technique: New Clearing Technique Proposed for Immature Stages and Internal Structures of Adult Insects. *Southwestern Entomologist*, 44(2), 519-522.
- Agnew, C. A., L. A. Rodríguez del Bosque, and J. W. Smith, Jr. (1988). Misidentification of Mexican stalkborers in the subfamily Crambinae (Lepidoptera: Pyralidae). *Folia Entomol. Mex.* 75: 63-75.
- Álvarez, J. M., Menalled, F., & Hoy, M. A. (2005). Las herramientas moleculares en el control biológico. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica) N° 74 p 4-11
- Alves, S. B., Rossi, L. S., Lopes, R. B., Tamai, M. A., & Pereira, R. M. (2002). *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of invertebrate Pathology*, 81(2), 70-77.
- Arispe, J. L., Sánchez, A., & Galindo, M. E. (2019). Presencia de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) en Tepalcingo, Morelos, México, con evaluación del daño causado en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Revista Chilena de Entomología*, 45 (4), 587-592.
- Atencio, R., Goebel, F. R., Guerra, A., & López, S. (2020). Uso de *Galleria mellonella* L. (Lep.: Pyralidae) como presa centinela para evaluar el impacto de enemigos naturales sobre *Diatraea tabernella* dyar (Lep.: Crambidae) en caña de azúcar en Panamá. *Revista Colegiada de Ciencia*, 1(2), 31-44.
- Atencio, R., Goebel, F. R., Guerra, A., Nikpay, A., & Collantes, R. D. (2021). Integrated pest management of the sugarcane stemborers *Diatraea* spp., *Elasmopalpus lignosellus* and *Telchin licus*. *Revista Semilla del Este*, 2(1), 37-58.
- Aya, V. M., Montoya-Lerma, J., Echeverri-Rubiano, C., Michaud, J. P., & Vargas, G. (2019). Host resistance to two parasitoids (Diptera: Tachinidae) helps explain a regional outbreak of novel *Diatraea* spp. stem borers (Lepidoptera: Crambidae) in Colombia sugarcane. *Biological Control*, 129, 18-23.
- Barrera, G. P., Villamizar, L. F., Espinel, C., Quintero, E. M., Belaich, M. N., Toloza, D. L., ... & Vargas, G. (2017). Identification of *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Crambidae) based on cytochrome oxidase II. *PLoS One*, 12(9), e0184053.
- Bleszynski S (1969) The taxonomy of the Crambine moth borers of sugarcane. Pests of Sugarcane (ed. by JR Williams, JR Metcalfe, RW Mungomery & R Mathes), pp. 11–59. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

- Box HE (1953) New crambine genera allied to *Diatraea* Guilding (Lepidoptera: Pyralidae).I. Proceedings of the Royal Entomological Society of London (B) 22: 178–180. doi: 10.1111/j.1365-3113.1953.tb00082.x
- Box, H. E. (1956). New species and records of *Diatraea* Guilding and *Zeadiatraea* Box from Mexico, Central and South America (Lepid., Pyral.). *Bulletin of Entomological Research*, 47(4), 755-776.
- Bravo, J. P., Silva, J. L. C., Munhoz, R. E. F., & Fernandez, M. A. (2008). DNA barcode information for the sugar cane moth borer *Diatraea saccharalis*. *Genet Mol Res*, 7(3), 741-748.
- Capinera, J. (2020). Order Lepidoptera—Caterpillars, Moths and Butterflies. *Handbook of Vegetable Pests; Capinera, J., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA*, 353-510.
- Cardona, L. F., & Giraldo, A. S. (2015). Susceptibilidad de *Diatraea saccharalis* (F) (Lepidoptera: Crambidae) a diferentes hongos entomopatógenos en caña panelera. *Boletín Científico. Centro de Museos*, 19(2), 95-103.
- Carrillo-Rayas, M. T., & Blanco-Labra, A. (2009). Potencial y algunos de los mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga. *Acta universitaria*, 19(2), 40-49.
- Chippendale, G.M. 1979. The southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*: case history of an invading insect. Res. Bull. 1031. University of Missouri Agr. Exp. Sta., 52 pp.
- Díaz, B. M., & Lecuona, R. E. (1995). Evaluación de cepas nativas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* Bals. (Vuill.) (Deuteromicotina) como base para la selección de bioinsecticidas contra el barrenador *Diatraea saccharalis* (F.). *Agriscientia*, 12, 33-38.
- Fernández Suárez, R., Morales Chávez, L. A., & Gálvez Mariscal, A. (2013). Importancia de los maíces nativos de México en la dieta nacional: Una revisión indispensable. *Revista fitotecnia mexicana*, 36, 275-283.
- Flores, C.S. (2007). Las plagas de la caña de azúcar en México. Servicios Gráficos Orejel. Córdoba, Veracruz. 350 pp.
- Francischini FJB, Campos JB, Alves-Pereira A, Gomes Viana JP, Grinter CC, Clough SJ & Zucchi MI (2017) Morphological and molecular characterization of Brazilian populations of *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) and the evolutionary relationship among species of *Diatraea* Guilding. *Plos one*, 12:11-24.
- Freitas M.R.T., Silva E.L., Mendonça A.L., Silva C.E., Fonseca A.P.P., Santos J., Nascimento R.R., Santana A.E.G. (2007). The biology of *Diatraea flavipennella*

- (Lepidoptera: Crambidae) reared under laboratory conditions. *Fla Entomol* 90(2): 309–313.
- Gaviria, J., Parra, P. P., & Gonzales, A. (2020). Selection of strains of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales) for endophytic colonization in coconut seedlings. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 36(1), 3-13.
- Grimi, D. A., Parody, B., Ramos, M. L., Machado, M., Ocampo, F., Willse, A., ... & Head, G. (2018). Field-evolved resistance to Bt maize in sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*) in Argentina. *Pest management science*, 74(4), 905-913.
- Gul, H. T., Saeed, S., & Khan, F. A. (2014). Entomopathogenic fungi as effective insect pest management tactic: A review. *Applied Sciences and Business Economics*, 1(1), 10-18.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
- Hernández-Velázquez, V. M., Lina-García, L. P., Obregón-Barboza, V., Trejo-Loyo, A. G., & Peña-Chora, G. (2012). Pathogens associated with sugarcane borers, *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Crambidae): a review. *International Journal of Zoology*, 2012. 2. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/303589>
- Hernández-Rosas F. Figueroa-Rodríguez K.A. (2011). Barrenador (*Diatraea saccharalis*) y mosca pinta (*Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp.) en caña de azúcar y sus enemigos naturales. *Agroproductividad*. 4 (2): 3-9.
- Inglis, G. D., Enkerli, J. U. E. R. G., & Goettel, M. S. (2012). Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. *Manual of techniques in invertebrate pathology*, 2, 18-53.
- Jaber, L. R., & Ownley, B. H. (2018). Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens?. *Biological control*, 116, 36-45.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Lastra Borja, L. A.; Gómez Laverde, L. A. (2006). La cría de *Diatraea saccharalis* (F.) para la producción masiva de sus enemigos naturales. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia (Cenicaña). Serie Técnica 36: 1-30. https://www.cenicana.org/pdf_privado/serie_tecnica/st_36/st_36.pdf [[Links](#)].

- Legaspi, J. C., Poprawski, T. J., & Legaspi Jr, B. C. (2000). Laboratory and field evaluation of *Beauveria bassiana* against sugarcane stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae) in the Lower Rio Grande Valley of Texas. *Journal of Economic Entomology*, 93(1), 54-59.
- Leyton-Flor, S. A., Gordillo, M., González, P. A., Ospina, J. A., & Vargas, G. (2018). Distribución espacio-temporal de *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Crambidae) en el valle del río Cauca, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 44(2), 177-186.
- López-Pérez, S. (2016). Descripción de la genitalia de *Coptocyclus (Psalidonota) leprosa* (Chrysomelidae: Cassidinae: Cassidini). *Revista mexicana de biodiversidad*, 87(3), 928-932.
- López, D., Pieschacón, R., & Muñoz, J. E. (1989). Efecto del daño de *Diatraea* spp. en la producción de varios genotipos de maíz, *Zea mays* L. en el Valle del Cauca. *Acta Agronómica*, 39(3-4), 36-44.
- Lovera, A., Belaich, M., Villamizar, L., Patarroyo, M. A., & Barrera, G. (2020). Enhanced virulence of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis* using a soluble recombinant enzyme with endo-and exochitinase activity. *Biological Control*, 144, 104211.
- Mantzoukas, S., & Eliopoulos, P. A. (2020). Endophytic entomopathogenic fungi: A valuable biological control tool against plant pests. *Applied Sciences*, 10(1), 360.
- Mihm, J. A. (1985). Breeding for host plant resistance to maize stem-borers. *International Journal of Tropical Insect Science*, 6(3), 369-377.
- Moreno, L. L. V., & Claro, O. E. (2010). Manejo de epizootias por hongos entomopatógenos. Capítulo 8. 145-161
- Motta-Delgado, P. A., & Murcia-Ordoñez, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente & Agua-An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 6(2), 77-90.
- Nicholls-Estrada CI. 2008. Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Editorial Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 282 pp.
- Osorio-Osorio, R., Hernández-García, V., Harris, M. K., Hernández-Hernández, L. U., Cruz-Lázaro, E. D. L., Márquez-Quiroz, C., ... & Aguirre-Uribe, L. A. (2015). Species of Stalk Borers (Lepidoptera: Crambidae) and Damage to Maize in Southeastern Mexico. *Southwestern Entomologist*, 40(4), 831-835.
- Parsa, S., Ortiz, V., & Vega, F. E. (2013). Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (74), e50360.
- Passoa, S. C. (2014). Morphological guide to known species of *Diatraea* intercepted at U.S. ports of entry from Mexico, pp. 3. In T. M. Gilligan and S.C. Passoa [eds.], *LepIntercept*, An identification resource for intercepted Lepidoptera larvae.

Identification Technology Program (ITP), USDA/APHIS/PPQ/S&T, Fort Collins, CO. (accessed at www.lepitercept.org).

- Perez R., E. F., Martinez T., S. K. (2011). Distribucion especial y ciclo de vida de *Diatraea* spp. en plantaciones de *Saccharum officinarum*. *Ingenieria y Amazonia*, 4(2) 122–130
- Posada, F., Aime, M. C., Peterson, S. W., Rehner, S. A., & Vega, F. E. (2007). Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Mycological research*, 111(6), 748-757.
- Ramírez-Mora, E., Pérez-Vázquez, A., Landeros-Sánchez, C., Martínez-Dávila, J. P., Villanueva-Jiménez, J. A., & Lagunes-Espinoza, L. D. C. (2018). Uso histórico de plaguicidas en caña de azúcar del DR035 La Antigua, Veracruz. *Acta universitaria*, 28(4), 42-49.
- Riley, D. R., & Solis, M. (2005). Keys to immatures of the sugarcane borer and neotropical cornstalk borer from Tamaulipas, Mexico. *Southwestern Entomologist*, 30: 35-39.
- Risco-Briceño, S. H. (1996). Existos históricos de taquínidos y bracónidos en el control biológico de *Diatraea* en caña de azúcar cultivada en América. *Revista Peruana de Entomología*, 39(1), 85-90.
- Rivera-Escobar, V. H. M., & Soto-Giraldo, A. (2017). Integración de enemigos naturales para el control de *Diatraea busckella* Dyar & Heinrich (Lepidoptera: Crambidae) en caña panelera. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 21(1), 52-58.
- Rodriguez-del-Bosque, L. A., Browning, H. W., & Smith Jr, J. W. (1990). Seasonal parasitism of corn stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae) by indigenous and introduced parasites in northeastern Mexico. *Environmental entomology*, 19: 393-402.
- Rodríguez-del-Bosque L.A., Jones W. A., Saldafia R.R. 2000. Incidence of mexican rice borer (Lepidoptera: Pyralidae) and Jalisco fly parasite (Diptera: Tachinidae) in Mexico. *Southwestern Entomologist. Texas* 25: 21-30.
- Roe, R.M., Hammond, A.M., Reagan, T.E. & Hensley, S.D. (1981) A bibliography of the Sugarcane Borer *Diatraea saccharalis* (Fabricius), 1887–1980. USDA Agricultural Research Service, Agricultural Reviews and Manuals, Southern Series 20, 1–2.
- Rolston, L. H. (1955). *The southwestern corn borer in Arkansas* (Doctoral dissertation, The Ohio State University).
- Russo, M. L., Pelizza, S. A., Vianna, M. F., Allegrucci, N., Cabello, M. N., Toledo, A. V., ... & Scorsetti, A. C. (2019). Effect of endophytic entomopathogenic fungi on soybean *Glycine max* (L.) Merr. growth and yield. *Journal of King Saud University-Science*, 31(4), 728-736.

- Sánchez Ortega, I., & Pérez-Urria Carril, E. (2014). Maíz I (*Zea mays*). *REDUCA Biología*, 7(2), 151-171.
- Saranraj, P., & Jayaparakash, A. (2017). Agrobeneficial entomopathogenic fungi—*Beauveria bassiana*: A review. *Indo-Asian Journal of Multidisciplinary Research*, 3(2), 1051-1087.
- Shah, P. A., & Pell, J. K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(5), 413-423.
- Serrato A, Posada FJ (2005) Descripción y hábitos de *Diatraea* sp. y registro de sus enemigos naturales en barreras vivas de limoncillo en la zona cafetera. *Rev UDCA Actual Divulg Científica* 8: 45-56.
- SIAP-SAGARPA. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2021). Available online: www.siap.gob.mx (acceso 07 de enero de 2022).
- Smith, Jr., J. W. & L. A. Rodríguez-del-Bosque. 1994. New distribution and host-range records for *Apanteles deplanatus* (Hymenoptera: Braconidae), a parasite of *Diatraea considerata* and *D. magnifactella* (Lepidoptera: Pyralidae), in Mexico. *Biological Control* 4: 249-253.
- Smith, J.W. Jr., R.N. Wiedenmann & W A . Overholt, 1992. Parasites of lepidopteran stemborers of tropical gramineous plants: 1-89. — Nairobi
- Solis M.A. (2004). Systematics of Mexican stalkboring crambine Pyraloidea In: Rodríguez del Bosque LA, Vejar Cota G, Cortez Mondaca E (Eds) Taller internacional sobre barrenadores del tallo de caña de azúcar, Los Mochis, Sinaloa, México. Sociedad Mexicana de Control Biológico, 6–22.
- Solis, M. A., & Metz, M. A. (2016). An illustrated guide to the identification of the known species of *Diatraea* Guilding (Lepidoptera, Crambidae, Crambinae) based on genitalia. *ZooKeys*, 565, 73-121.
- Srikanth, J., Santhalakshmi, G., & Nirmala, R. (2011). An improved bioassay method for entomopathogenic fungi of sugarcane pests and its evaluation in studies of virulence in subcultures. *Sugar tech*, 13(2), 156-165.
- Stone, J. K., Polishook, J. D., & White, J. F. (2004). Endophytic fungi. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*, 241, 270.
- Sun, X., & Guo, L. D. (2012). Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. *Mycology*, 3(1), 65-76.
- Toledo, A. V., Lopez Lastra, C. C., Gutierrez, A. C., Muttis, E., & Garcia, J. J. (2021). Bioensayos con entomopatógenos y uso de protocolos. En *Patología de insectos Metodologías y técnicas de laboratorio. Un aporte al trabajo experimental. Capítulo 8*. 71-83

- Trigo, Y. M., & Montenegro, J. L. (2002). El maíz en México: biodiversidad y cambios en el consumo. *Análisis económico*, 17(36), 281-303.
- Van Lenteren, J. C., & Bueno, V. H. (2003). Augmentative biological control of arthropods in Latin America. *BioControl*, 48(2), 123-139.
- Vargas, G., Lastra, L. A., & Solís, M. A. (2013). First record of *Diatraea tabernella* (Lepidoptera: Crambidae) in the Cauca river Valley of Colombia. *The Florida Entomologist*, 96(3), 1198-1201.
- Vargas, G., Gómez, L. A., & Michaud, J. P. (2015). Sugarcane stem borers of the Colombian Cauca River Valley: current pest status, biology, and control. *Florida entomologist*, 98(2), 728-735.
- Vargas, G., L. A. Lastra, G. D. Ramírez, and M. A. Solís. (2018). The *Diatraea* Complex (Lepidoptera: Crambidae) in Colombia's Cauca River Valley: Making a Case for the Geographically Localized Approach. *Neotrop. Entomol.* 47: 395–402.
- Vázquez, H. M., & Valdez, J. Á. (2012). Manejo integrado de barrenadores en caña de azúcar en el sur de Tamaulipas. *INIFAP*, 1, 1-18.
- Vega, F. E., Posada, F., Aime, M. C., Pava-Ripoll, M., Infante, F., & Rehner, S. A. (2008). Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological control*, 46(1), 72-82.
- Vejar-Cota, G. (2004). Control biológico del gusano barrenador del tallo (Lepidoptera: Crambidae) de la caña de azúcar en Sinaloa, pp. 70-84. (Rodríguez del Bosque, L.A.; Vejar-Cota, G. y Cortéz-Mondaca, E. eds.). Taller Internacional sobre Barrenadores del Tallo de Caña de Azúcar. Los Mochis, Sinaloa, México. 8 -10 nov.
- Vejar Cota, G. (2016). Evaluación de la efectividad de hongos entomopatógenos en barrenadores del tallo de la caña de azúcar (Lepidoptera: Crambidae) en Sinaloa. Instituto Politécnico Nacional.
- Vejar-Cota, G., García-Gutiérrez, C., Rosas-García, N. M., Rodríguez-Del-Bosque, L. A., & Saldamando-Benjumea, C. I. (2016). Identificación Morfológica y Molecular de Barrenadores del Tallo de la Caña de Azúcar1 Distribuidos en Sinaloa. *Southwestern Entomologist*, 41(1), 153-163.
- Vidal, S., & Jaber, L. R. (2015). Entomopathogenic fungi as endophytes: plant–endophyte–herbivore interactions and prospects for use in biological control. *Current science*, 46-54.
- Wenzel, I. M., Giometti, F. H. C., & Almeida, J. E. M. (2006). Patogenicidade do isolado IBCB 66 de *Beauveria bassiana* à broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* em condições de laboratório. *Arquivos do Instituto Biológico*, 73, 259-261.
- Wharton, R.A., P. Marsh & M.J. Sharkey. (Eds.). 1997. *Manual of the New World genera of the family Braconidae*. International Society of Hymenopterists, special publication No. 1, 439 pp.

- Wiedenmann, R.N., Smith Jr., J.W., Rodriguez del Bosque, L.A., 2003. Suitability of the New World stalkborer *Diatraea considerata* for the Old World *Cotesia* parasitoids. *BioControl* 48, 659–669.
- Wraight, S.P., Inglis, G.D., Goettel, M.S., 2007. Fungi. In: Lacey, L.A., Kaya, H.K. (Eds.), *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. second ed. The Netherlands, Dordrecht, pp. 223–248.
- Yasem de Romero, M. G., Salvatore, A. R., López, G., & Willink, E. (2008). Presencia natural de hongos hyphomycetes en larvas invernantes de *Diatraea saccharalis* F. en caña de azúcar en Tucumán, Argentina. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*, 85(2), 39-42.
- Zárate, L. L., Rodríguez, L. V., Espinoza, R. R., & Vergaray, H. E. (2016). Biología de *Diatraea saccharalis* Fabr. (Lepidoptera: pyralidae) alimentado con dos tipos de *Zea mays* (L.). *Pueblo Continente*, 18(1), 85-93.
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(6), 553-596.
- Zúñiga-Oviedo, M. A., Soto-Giraldo, A., & Cruz-Cerón, G. (2016). Actividad biológica de hongos y bacterias entomopatogenas sobre *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: crambide). *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 20(2), 82-92.