



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**Centro Interdisciplinario de Investigación para**  
**el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa**



**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**

**Evaluación de la efectividad de hongos entomopatógenos en  
barrenadores del tallo de la caña de azúcar (Lepidoptera:  
Crambidae) en Sinaloa**

**GUADALUPE VEJAR COTA**

**TESIS**

Presentada como requisito parcial  
para obtener el grado de

**DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

Guasave, Sinaloa, México. Diciembre de 2016

---



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa el día 15 del mes de noviembre del año 2016, el que suscribe **Guadalupe Vejar Cota** alumno del Programa de **Doctorado en Ciencias en Biotecnología**, con número de registro **A130564**, adscrita al **CIIDIR Unidad Sinaloa**, manifiesta que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Cipriano García Gutiérrez** y la **Dra. Ninfa María Rosas García** y cede los derechos del trabajo titulado **“Evaluación de la efectividad de hongos entomopatógenos en barrenadores del tallo de la caña de azúcar (Lepidoptera: Crambidae) en Sinaloa”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones [vejargpe@hotmail.com](mailto:vejargpe@hotmail.com), [cgarciag@ipn.mx](mailto:cgarciag@ipn.mx) y [nrosas@ipn.mx](mailto:nrosas@ipn.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



**GUADALUPE VEJAR COTA**



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

Guasave, Sin. a 26 de octubre del 2015

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del CIIDIR-Sinaloa en su sesión Ordinaria No. 9 celebrada el día 21 del mes de septiembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

<b>VEJAR</b> Apellido paterno	<b>COTA</b> Apellido materno	<b>GUADALUPE</b> Nombre (s)
----------------------------------	---------------------------------	--------------------------------

Con registro: 

A	1	3	0	5	6	4
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: **Doctorado en Ciencias en Biotecnología**

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:  
**Evaluación de la efectividad de hongos entomopatógenos en barrenadores del tallo de la caña de azúcar (Lepidoptera: Crambidae) en Sinaloa.**

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

- a. Seleccionar cepas de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *I. javanica* de colecciones de los estados de Sinaloa y Morelos.
- b. Corroborar morfológica y molecularmente la identidad de las especies de hongos entomopatógenos.
- c. Identificar morfológica y molecularmente las especies de barrenadores distribuidos en Sinaloa.
- d. Determinar la patogenicidad y virulencia de las cepas de hongos entomopatógenos en estudio mediante bioensayos.
- e. Producir y formular a nivel de laboratorio a la mejor cepa de hongo entomopatógeno.
- f. Evaluar la efectividad biológica de la cepa de hongo entomopatógeno seleccionada bajo condiciones de invernadero y campo.

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:  
Dr. Cipriano García Gutiérrez y la Dra. Ninfa María Rosas García

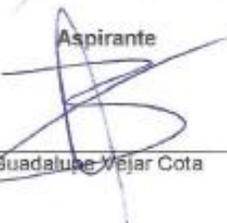
3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:  
*Laboratorio de Bioinsecticidas del CIIDIR-Sinaloa*, que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

  
Dr. Cipriano García Gutiérrez

  
Dra. Ninfa María Rosas García

Aspirante  
  
Guadalupe Vejar Cota

Presidente del Colegio  
  
Dra. Djeana C. Escobedo Urías



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa siendo las 10:00 horas del día 15 del mes de noviembre del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Sinaloa para examinar la tesis titulada:

**Evaluación de la efectividad de hongos entomopatógenos en barrenadores del tallo de la caña de azúcar (Lepidoptera: Crambidae) en Sinaloa**

Presentada por el alumno:

<u>Vejar</u>	<u>Cota</u>	<u>Guadalupe</u>
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
	Con registro:	A 1 3 0 5 6 4

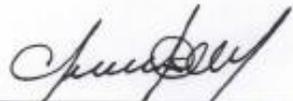
aspirante de:

### **Doctorado en Ciencia en Biotecnología**

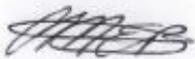
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

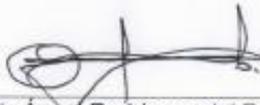
Directores de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Cipriano García Gutiérrez

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ninfa María Rosas García

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Cesar Marcial Escobedo Bonilla

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Héctor Abelardo González Ocampo

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Luis Ángel Rodríguez del Bosque

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Diana Cecilia Escobedo Urias



**CIIDIR - IPN**  
UNIDAD SINALOA  
DIRECCION

## DEDICATORIA

*A mi familia, mi esposa Erlín que me ha acompañado en todo momento y me ha alentado a seguir adelante, a mi hijo Juan Pablo que es nuestra inspiración para seguir buscando la superación.*

*A mi suegra Teresa que nos ha acompañado siempre en las buenas y en las malas.*

*A mis padres, Martín e Irene, y mis hermanos Caty, Martín, Rosa, Alma, Víctor y Adalberto que con mucho cariño me han alentado a continuar esforzándome en mi formación.*

*Los quiero a todos, ¡muchas gracias!*



*“Nobody can go back and start a new beginning, but anyone can start today and make a new ending”*

**-Maria Robinson**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco en primer lugar a Dios por la oportunidad de darme una experiencia más de vida.

Al CIIDIR Unidad Sinaloa por ser mi segunda casa durante mi programa de estudios.

A mis directores de tesis, Dr. Cipriano García Gutiérrez y Dra. Ninfa M. Rosas García por la orientación y apoyo brindado durante mi programa doctoral. Gracias por su paciencia.

A mi comité tutorial, Dr. Cesar M. Escobedo Bonilla, Dr. Héctor A. González Ocampo y al Dr. Luis A. Rodríguez del Bosque por su apoyo con comentarios y sugerencias durante cada exposición semestral.

A los profesores del CIIDIR Sinaloa, Dr. Juan Carlos Sainz Hernández, Dra. Apolinar Santamaría Miranda, Dr. Adolfo Dagoberto Armenta Bojórquez, Dr. Carlos L. Calderón Vázquez, Dr. Eusebio Nava Pérez, Dr. Francisco Roberto Quiroz Figueroa, Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza, Dr. Jorge Montiel Montoya, Dra. Laura Gabriela Espinosa Alonso, Dra. Melina López Meyer, M.C. Jesús Alicia Chávez Medina, M.C. Jesús Ricardo Camacho Báez, M.C. Luis Daniel García Rodríguez y al Dr. Omar Llanes Cárdenas por sus comentarios personales durante mi estancia en esta institución.

A mis amigos del Laboratorio de Bioinsecticidas, Nadia, Chevy, Claudia, Mónica, Arturo, Mancillas, Ricardo, Jaziel, Marina, Luis, Teresita, Paul, Rojo, Marycarmen, Lorena, Cosme, Gorety, Héctor, Israel, Yareli, Fernando, Irieth y otros más que compartieron conmigo momentos durante mi estancia. Gracias por sus consejos, comentarios y sugerencias.

Al personal del Laboratorio de Biotecnología Ambiental del Centro de Biotecnología Genómica, en Reynosa y al Campo Experimental Río Bravo del INIFAP, Tamaulipas por el apoyo y facilidades durante mi estancia en ese lugar. Gracias.

Al personal administrativo del CIIDIR Sinaloa, en especial a Dorín, Toño, Katty y Fátima por el apoyo y consejos. ¡Mil gracias!

A los amigos de otras instituciones, Dr. Víctor M. Hernández Vázquez (Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos), Dr. Héctor M. Cárdenas Cota (Centro de Ciencias de Sinaloa - Universidad Tecnológica de Culiacán), Ing. Eduardo Torres Sánchez e Ing. Enrique Garza G. (Agrobiológicos del Noroeste S.A. de C.V.), Dr. Rosalio Ramos Payan (Universidad Autónoma de Sinaloa), Ing. Cosme Laurian (Química Internacional Aplicada S.A. de C.V.). Gracias por su apoyo y consejos.

A los directivos del ingenio Mochis (Agrícola Ohuira) por alentarme a realizar el doctorado y recibir el apoyo durante el inicio de esta etapa, en especial al Ing. Martín Godínez P. y al Ing. Javier Velazco G. Estoy agradecido con ustedes, muchas gracias.

A todas aquellas personas que se me escapan sus nombres y que han formado parte de mi formación. Gracias.

Y por último a CONACyT (beca: 357687), BEIFI y COFAA del IPN por el apoyo económico durante todo mi programa doctoral. ¡Mil gracias!

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	<b>PÁGINA</b>
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
Importancia del barrenador en México	7
Especies de importancia económica	8
Biología y hábitos	8
Daños en caña de azúcar	10
Métodos de control	12
Resistencia varietal	12
Control cultural	13
Control químico	13
Control biológico	14
Entomopatógenos para el control del barrenador	15
Nematodos	15
Bacterias	17
Virus	18
Hongos	19
Literatura citada	22
CAPÍTULO II: IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE BARRENADORES DEL TALLO DE LA CAÑA DE AZÚCAR DISTRIBUIDOS EN SINALOA.	31
Resumen	32
Abstract	32
Introducción	33
Materiales y métodos	35
Obtención de los insectos	35
Extracción y montaje de genitales	35
Caracterización molecular	36
Análisis de datos	37
Resultados y discusión	37

Identificación de especies de barrenadores	37
Caracterización molecular	39
Agradecimiento	39
Literatura citada	44
CAPÍTULO III: MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI WITH POTENTIAL TO CONTROL SUGARCANE BORERS (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) IN SINALOA.	48
Abstract	49
Resumen	49
Introduction	50
Materials and methods	51
Source and growth conditions	51
Morphological identification	51
Molecular characterization	52
Data analysis	53
Results and discussion	54
Morphological identification	54
Molecular characterization	55
Conclusion	55
Acknowledgment	56
References cited	60
CAPÍTULO IV: EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS CONTRA EL BARRENADOR DEL TALLO DE CAÑA DE AZÚCAR <i>Diatraea considerata</i> HEINRICH EN CAMPO.	65
Resumen	66
Introducción	67
Materiales y métodos	69
Colecta y cría del barrenador	69
Obtención y reactivación de cepas	69
Bioensayos	70
Producción de esporas	71
Pruebas de campo	72

Porcentaje de viabilidad y concentración de esporas	73
Análisis de datos	74
Resultados y discusión	74
Bioensayos de patogenicidad	74
Bioensayos de virulencia	76
Producción de esporas	76
Pruebas de campo	77
Conclusión	79
Agradecimiento	80
Literatura citada	93
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>98</b>

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La caña de azúcar es uno de los cinco cultivos básicos que más se siembran en México con una superficie de 827 mil hectáreas, lo que genera un impacto socioeconómico en 12 millones de personas. Las plagas y enfermedades en el cultivo de caña juegan un papel importante como limitante de la producción tanto por los daños directos, como por los gastos adicionales que se derivan de la aplicación de métodos de control. Al respecto existen más de cien especies de insectos y roedores que atacan el cultivo de la caña de azúcar en México, de las cuales las de mayor importancia y que ameritan combate cada año son: los roedores, la mosca pinta y el barrenador del tallo. El barrenador del tallo se encuentra distribuido en todas las zonas cañeras de México, y en Sinaloa es considerado como el principal insecto plaga de este cultivo, donde las pérdidas estimadas alcanzan los 100 millones de pesos en alrededor de 25 mil hectáreas de cultivo cada año.

Un método económico y práctico para el control de plagas son los insecticidas, los cuales han sido usados por décadas por los productores. No obstante, su efecto en organismos no blanco, la contaminación del agua, residuos en los alimentos y el desarrollo de resistencia a estos químicos, han forzado a la industria y a los científicos a enfocarse en el desarrollo de alternativas de control más amigables. Entre estas alternativas se incluye al control biológico, el cual se ha usado por más de 20 años en Sinaloa mediante la movilización y liberación de parasitoides. Los hongos entomopatógenos (Hypocreales: Clavicipitaceae) son un grupo de agentes de control biológico con potencial que ha sido poco explorado, y su interés para el control de barrenadores se ha intensificado durante los últimos 25 años. Estos hongos se han usado ampliamente como agentes de control biológico para ciertos insectos plaga, principalmente los hongos de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria*. Aunque se han realizado trabajos aislados en el uso de entomopatógenos para el control de barrenadores, aún hace falta mayor información sobre la caracterización morfológica, fisiológica y molecular de nuevas cepas, así como estudios de patogenicidad y virulencia bajo condiciones de

laboratorio y campo. Por lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo general Identificar a las especies de barrenadores de la caña de azúcar y evaluar la efectividad de cepas de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, e *Isaria javanica* (Friederichs & Bally) Samson & Hywel-Jones contra el barrenador del tallo de la caña de azúcar en Sinaloa.

## **Justificación**

El barrenador de la caña de azúcar es una plaga cada vez más importante en las zonas cañeras de México tales como Veracruz, Oaxaca, Puebla y Morelos, donde no constituía un problema pero ahora se ha extendido. Otra preocupación es la dispersión de la plaga dentro del país o la introducción de nuevas especies de barrenadores a México como es el caso de *Blastobasis graminea* Adamski detectada en febrero del 2001 en Veracruz y Jalisco. Una de las probables razones de la migración de especies de barrenadores se debe a la movilización de material vegetativo infestado entre regiones cañeras y/o la migración natural debido al efecto ocasionado por el cambio climático, el cual cada vez va modificando microclimas que aprovechan las plagas para extender su distribución o incrementar sus poblaciones. Dentro de las alternativas de control, la selección de variedades y el uso de insecticidas químicos han sido las estrategias usadas para el control de barrenadores desde hace varias décadas, no obstante, la efectividad de estos últimos ha sido cuestionada debido al reducido efecto en la disminución de daños. Otras estrategias que se han utilizado incluye al control cultural y la quema de caña previa a la cosecha, además del control biológico por medio de parasitoides y entomopatógenos. Dentro del control biológico, una estrategia recomendable en los programas de manejo integrado de plagas es la combinación de parasitoides y entomopatógenos. En Sinaloa, durante los últimos 20 años se ha usado como estrategia principal de control de barrenadores a los parasitoides, no obstante, a pesar del establecimiento del parasitoide braconido *Macrocentrus prolificus*

Warthon, esta plaga aún sigue realizando daños de consideración. Por otro lado, los estudios con entomopatógenos se han intensificado en los últimos 25 años, principalmente para las especies *D. saccharalis* y *D. magnifactella* y se enfoca principalmente en los hongos *M. anisopliae* y *B. bassiana*. Las principales ventajas del uso de entomopatógenos son, (a) la seguridad para el humano y organismos no blanco, (b) disminución en los residuos de plaguicidas en medioambientes acuáticos y terrestres, (c) incremento en la actividad de la mayoría de otros enemigos naturales, y (d) incremento en la biodiversidad en ecosistemas acuáticos; otras ventajas son, (a) la especificidad en los organismos blanco o en un limitado número de especies hospederos, (b) poca o nula resistencia en los organismos blanco, sin desarrollo de plagas secundarias, (c) compatibilidad con otros agentes de control biológico, posibilidad de control a largo plazo, (e) fácil aplicación, sin restricción de tiempo a la cosecha, y (f) modificación genética a través de técnicas biotecnológicas. Debido a las preocupaciones ambientales y regulatorias, la demanda de insecticidas microbianos se ha incrementado entre los productores, sin embargo, existen riesgos que deben considerarse durante su producción y uso tanto para la salud como para las especies nativas.

Debido a la aparición de la resistencia de los insecticidas químicos convencionales y a las implicaciones adversas al medioambiente, es importante evaluar nuevas estrategias que mitiguen las pérdidas económicas que enfrentan los productores cañeros y que sean compatibles con los agentes de control biológico, además que sean económicas y de fácil acceso. Varios pasos son necesarios para encontrar candidatos viables para usarse en programas exitosos de control biológico de plagas. Algunos de ellos son la identificación precisa de la especie plaga y el agente de control biológico, así como su evaluación bajo condiciones de laboratorio y campo. Es por ello que en el presente trabajo se planteó evaluar el uso de hongos entomopatógenos como una alternativa amigable para disminuir los daños ocasionados por el barrenador en Sinaloa.

## **Hipótesis**

Una formulación a base de hongos entomopatógenos es efectiva para el control biológico del barrenador del tallo de la caña de azúcar en Sinaloa.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Identificar a las especies de barrenadores de la caña de azúcar y evaluar la efectividad de cepas de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *I. javanica* contra el barrenador del tallo de la caña de azúcar en Sinaloa.

### **Objetivos específicos**

- a) Identificar morfológica y molecularmente a las especies de barrenadores distribuidos en Sinaloa.
- b) Seleccionar aislados de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *I. javanica* de colecciones de los estados de Sinaloa y Morelos.
- c) Identificar morfológica y molecularmente a las especies de hongos entomopatógenos.
- d) Determinar la patogenicidad y virulencia de las cepas de hongos entomopatógenos en estudio mediante bioensayos.
- e) Producir a nivel de laboratorio las mejores cepas de hongos entomopatógenos.

- f) Evaluar la efectividad de las cepas seleccionadas de hongos entomopatógenos bajo condiciones de campo.

Los resultados de este trabajo se presentan en esta Tesis la cual consta de cinco capítulos:

- **Capítulo I**, Revisión bibliográfica: Importancia del barrenador en México, especies de importancia económica, biología y hábitos, daños en caña de azúcar, métodos de control y entomopatógenos para el control del barrenador.

- **Capítulo II**, primer artículo del trabajo de Tesis que cubre el *objetivo específico a*, el cual fue publicado en revista reconocida por el Journal Citation Reports (JCR). Título del artículo: "Identificación morfológica y molecular de barrenadores del tallo de la caña de azúcar distribuidos en Sinaloa", publicado en el Número 1, Volumen 41 de la Revista Southwestern Entomologist.

- **Capítulo III**, segundo artículo del trabajo de Tesis que cubre los *objetivos específicos b y c*, el cual fue sometido a revista reconocida por el Journal Citation Reports (JCR). Título del artículo: "Morphological and molecular characterization of entomopathogenic fungi with potential to control sugarcane borers (Lepidoptera: Crambidae) in Sinaloa", sometido a la revista Southwestern Entomologist.

- **Capítulo IV**, tercer artículo del trabajo de Tesis que cubre los *objetivos específicos d, e y f*, el cual se encuentra en manuscrito para su revisión. Título del manuscrito: "Evaluación de la efectividad de hongos entomopatógenos contra el barrenador del tallo de caña de azúcar *Diatraea considerata* Heinrich en campo".

- **Capítulo V**, Conclusiones generales y recomendaciones.

# Capítulo I

---

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## Importancia del barrenador en México

Los barrenadores del tallo (Lepidoptera: Crambidae) son una plaga importante para la producción de muchos cultivos en las regiones tropicales y subtropicales, principalmente en caña de azúcar y maíz debido a la importancia económica y social que tienen estos cultivos (Rodríguez del Bosque, 2004; Rodríguez del Bosque y Vejar-Cota, 2008). En México, el barrenador es el insecto plaga principal que limita la producción de caña de azúcar tanto por los daños directos como por los costos de la implementación de métodos de control eficaces (Humbert, 1974; Toledo, 1993; Flores, 2007). Aunque, el barrenador se encuentra distribuido en todas las zonas cañeras del país (Rodríguez del Bosque *et al.*, 2014), los mayores daños los ocasiona en los estados de Sinaloa, Tamaulipas y San Luis Potosí (Toledo, 1993; Flores, 2007). Flores (2007) mencionó que en Las Huastecas la intensidad de canutos barrenados fue del 15% y en la zona cañera de Los Mochis la infestación fue del 22 al 28% en 1987-1990 aún con la aplicación de insecticidas. Toledo (1993) mencionó que en Los Mochis algunos campos presentaron hasta el 40% de canutos barrenados, mientras que Humbert (1974) indicó que estudios realizados para la misma región mostraron pérdidas de 300 g de azúcar por tonelada de caña por cada 1% de daño por barrenador. Aunque esta plaga causa daños como perforaciones y galerías en el interior del tallo, el principal impacto económico lo realizan los hongos y bacterias que penetran y se diseminan por la actividad del barrenador (principalmente el hongo denominado “muermo rojo”, *Colletotrichum falcatum* Went.), el cual reduce la calidad de los jugos del tallo y dificulta el proceso de extracción del azúcar en fábrica (Flores y Abarca, 1961; Terán, 2009). Lo anterior ocasiona pérdidas estimadas en 100 millones de pesos en alrededor de 25 mil hectáreas de cultivo cada año, con daños que varían del 15 al 28% de canutos barrenados (Vejar-Cota, 2004; Rodríguez del Bosque y Vejar-Cota, 2008).

## **Especies de importancia económica**

En cualquier región del mundo donde se cultiva alguna gramínea, existe al menos una especie de barrenador que ocupa el succulento nicho del tallo (Jepson, 1954; Smith *et al.*, 1993; Wiedenmann, 2004). Las principales especies del barrenador alrededor del mundo pertenecen al orden Lepidoptera, en particular a las familias Crambidae, Pyralidae, Noctuidae, y Castniidae (Smith *et al.*, 1993), mientras que muy pocas son de importancia en el orden Coleoptera (Leslie, 2004). En México, los barrenadores se encuentran distribuidos en todas las zonas cañeras y existen alrededor de 14 especies pertenecientes a las familias Crambidae (*Diatraea*, *Eoreuma* y *Xubida*), Coleophoridae (*Blastobasis*) y Castniidae (*Telchin*); no obstante, las más importantes pertenecen a los géneros *Diatraea* – *Eoreuma* dentro de Crambidae (Solís, 2004; Flores, 2007; Rodríguez del Bosque *et al.*, 2014). Las especies más importantes de barrenadores en caña en México son: *Diatraea grandiosella* Dyar, *D. saccharalis* (F.), *D. considerata* Heinrich, *D. magnifactella* Dyar y *Eoreuma loftini* (Dyar) (Rodríguez del Bosque *et al.*, 2014). De las especies anteriores, están presentes en los tres ingenios de Sinaloa (Los Mochis, Navolato y El Dorado), a *D. considerata*, *D. grandiosella* y *E. loftini* (Fig. 1), siendo la primera la más importante y destructiva (Rodríguez del Bosque y Vejar-Cota, 2008; Vejar-Cota *et al.*, 2016).

## **Biología y hábitos**

El barrenador del tallo pasa por cuatro estados de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto (Flores, 2007; Terán, 2009). Más del 90% de las hembras de *D. considerata* se aparean durante las primeras 24 horas y lo realizan una sola vez en su vida, mientras que los machos lo pueden hacer 1.6 veces en promedio, con 1 o 3 apareamientos (Osorio y Cibrián, 2000). Las especies de *Diatraea* pueden colocar desde unos cuantos huevos hasta varios cientos en toda su vida (Smith *et al.*, 1993). Para el caso de *D. considerata*, la hembra coloca de 365 a 522 huevos dependiendo del retardo en su apareamiento (Osorio y Cibrián, 2000), mientras que otro estudio

reportó que la hembra colocó de 250 a 300 huevos dependiendo del tipo de dieta suministrada durante la etapa larval (Rojo, 2015).

La biología y ecología de los barrenadores es similar, y solo algunos hábitos como sitios de oviposición y de alimentación son diferentes entre las especies de los géneros *Diatraea* y *Eoreuma* (Leerdam *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1993; Leslie, 2004; Rodríguez del Bosque *et al.*, 2014). Los huevos de *Diatraea* se pueden encontrar tanto en el haz como en el envés de las hojas tiernas (Fig. 2a), y dependiendo de la especie, las oviposturas pueden variar de uno a más de 100 huevos. En el caso de *D. considerata* bajo condiciones de campo, la ovipostura presentó de 10 a 126 huevos (media de 22.7 huevos/masa), mientras que en *D. grandiosella* fue de 1 a 5, siendo más frecuente 2 huevos por ovipostura (Lugo, 2008). Por otro lado, las hembras de *E. loftini* colocan los huevos en los dobleces y hendiduras de las hojas secas de la base del tallo (Fig. 2b) (Leerdam *et al.*, 1986; Flores, 2007; Meagher y Gallo, 2008). En general, este estado de desarrollo dura de 8 a 15 días dependiendo de la especie y las condiciones ambientales (Flores, 2007). Rojo (2015) mencionó que independientemente de la dieta suministrada, los huevos de *D. considerata* tardaron 5 días para eclosionar bajo condiciones de laboratorio.

Las larvas recién emergidas de los barrenadores (*Diatraea-Eoreuma*) son muy activas y avanzan rápidamente devorando pequeñas áreas verdes de la lámina foliar, resguardándose en el centro del meristemo apical de la planta (Fig. 2c); posteriormente algunas larvas del segundo instar perforan la nervadura central albergándose en el tejido carnoso por corto tiempo. A partir del tercer instar las larvas descienden a través de las hojas del meristemo apical perforando los canutos en crecimiento, para posteriormente penetrar al tallo y realizar las galerías conforme se van alimentando (Fig. 2d) (Flores, 2007; Lugo, 2008; Meagher y Gallo, 2008).

Las larvas de *Diatraea* avanzan longitudinalmente barrenando uno o más canutos dependiendo de la dureza del tallo, mientras que las larvas de *E. loftini* lo hacen en ambas direcciones y cerca del nudo. A diferencia de *Diatraea* que

expulsas sus residuos a través de orificios, *E. loftini* los va empaquetando durante la formación de la galería. Lo anterior tiene implicaciones importantes para el control biológico de estas especies (Smith *et al.*, 1993). Dentro del tallo, la larva muda dos veces más hasta alcanzar el quinto instar en un lapso de 25 días, para enseguida transformarse en pupa (Fig. 2e), durando en este estado alrededor de 10 días. Antes de pupar, la larva en su último instar forma la cámara pupal en el interior del tallo, incluyendo al final de la galería, una cubierta débil en la corteza para formar una ventana de salida al momento de emerger el adulto (Fig. 2f). Los adultos pueden vivir de 3 a 4 días (Flores y Abarca, 1961; Flores, 2007; Terán, 2009), sin embargo la longevidad de *D. considerata* se ve afectada por el tiempo de la copula de la hembra, y este puede variar desde 6.2 días si el apareamiento ocurre en el primer día de la emergencia hasta 11.3 días si no hubo apareamiento (Osorio y Cibrián, 2000). El ciclo biológico completo del barrenador dura 43 días bajo las condiciones ambientales de Sinaloa y pueden ocurrir de 3 a 5 generaciones en el año (una bien definida en primavera y las otras en el verano, existiendo traslape de generaciones) (Flores y Abarca, 1961; Flores, 2007). En contraste, bajo condiciones de laboratorio, la pupa de *D. considerada* tardó seis días para emerger el adulto y el ciclo completo varió de 70 a 108 días dependiendo del tipo de dieta suministrada a la larva (Rojo, 2015)

### **Daños en caña de azúcar**

La caña de azúcar es atacada por el barrenador durante todo su desarrollo, desde el trozo utilizado en la siembra, hasta la cosecha. Los daños ocasionados en el follaje por larvas recién emergidas son insignificantes, mientras que los daños causados dentro del tallo y en las yemas pueden ser significativos dependiendo de su severidad. Los daños por el barrenador se pueden clasificar en directos e indirectos (Flores y Abarca, 1961; Flores, 2007; Vejar-Cota, 2010). El daño directo se refiere a los destrozos causados por la larva al realizar galerías en el interior del tallo (Fig. 2h) y a la perforación de las yemas (las cuales no germinan al usarse como semilla). Cuando la caña es pequeña se forman los denominados “cogollos

muertos”, originados por la muerte del meristemo apical de la planta en desarrollo (Fig. 2g). Cuando la planta presenta canutos y la larva ocasiona la muerte del meristemo apical, se inicia el brote de las yemas laterales, afectando la calidad de la materia prima (Flores y Abarca, 1961; Hall y Bennett, 1994; Flores, 2007).

El daño indirecto es considerado como el más importante, ya que está relacionado con la transmisión de enfermedades que se diseminan a través del tallo por los orificios realizados por el barrenador (Flores y Abarca, 1961). Entre estas enfermedades, principalmente se encuentra el llamado "muermo rojo", causado por el hongo *C. falcatum* (Estado perfecto: *Glomerella tucumanensis* [Speg.] Arx & Muller), el cual, ocasiona fermentaciones que disminuyen la pureza de la sacarosa y tiñen el interior del tallo de color rojo (Fig. 2i), dificultando la clarificación del jugo en el proceso de extracción del azúcar en fábrica (Hall y Bennett, 1994; Mendoza, 1996; Flores, 2007; Meagher y Gallo, 2008; Terán, 2009).

Las evaluaciones para estimar las pérdidas ocasionadas por los daños del barrenador en caña de azúcar han sido similares y existen varios estudios que relacionan el daño con algunos parámetros de producción, tales como, pureza, sacarosa, producción de caña o la combinación de éstas (Leslie, 2004). Terán (2009) mencionó que las pérdidas en producción de campo y fábrica ocasionadas por barrenadores están correlacionadas con la severidad del daño, y en muchas ocasiones están subestimadas. En el caso de las pérdidas de azúcar por cada 1 % de daño por barrenador, éstas pueden variar dependiendo de factores como: variedad de la caña, edad de los tallos examinados, localización del daño y la especie de barrenador, por lo que las pérdidas en azúcar pueden ser desde 0.18 % hasta 1.6 % (Terán, 2009). En México, no existen estudios documentados sobre la estimación de las pérdidas causadas por los barrenadores. Algunos datos fueron mencionados por Humbert (1974) desarrollados por Millán, quien comentó pérdidas de 300 g de azúcar por tonelada de caña por cada 1% de daño por barrenador. Vejar-Cota (2004) realizó un análisis económico de las pérdidas en producción basado en parámetros de producción del ingenio Mochis y al factor de pérdidas internacional (0.5% de sacarosa por cada 1% de daño por barrenador) definido por

Mendoza (1996), lo que se tradujo en pérdidas 9.4 kg de azúcar / ton caña con el 21.4 % de daño por barrenador (439 g / ton caña por cada 1 % barrenador). Esto significa pérdidas económicas en la región de 5.17 millones de dólares por cada millón de ton de caña molida.

### **Métodos de control**

Para el manejo de las poblaciones de barrenadores se han usado diversas técnicas, en las que se incluye al control químico, biológico, resistencia varietal (Meagher y Gallo, 2008) y cultural (Leslie, 2004; Flores, 2007; Vejar-Cota *et al.*, 2008).

### **Resistencia varietal**

El empleo de variedades resistentes al ataque de barrenador es la primer línea de defensa que se ha utilizado para reducir el efecto de los daños de este insecto (Mendoza, 1996). La obtención de variedades resistentes es una dinámica continua dentro de los programas de mejoramiento genético con el fin de generar variedades con características convenientes de explotación comercial (Meagher, 1997). Entre los factores implicados en la resistencia de la caña al daño de barrenador se citan a la dureza de su corteza, diámetro y atributos físicos del interior del tallo y la pubescencia de las hojas, aunados a ciertos mecanismos de resistencia en algunos genotipos de caña como antibiosis y disuasión de la alimentación (Meagher *et al.*, 1996; Meagher y Gallo, 2008).

Pérez y Hernández (1994) evaluaron la resistencia al daño del barrenador en variedades sembradas en el Ingenio Los Mochis resultando la MEX-68-1347, MEX-68-P23 y la CO-977 como las menos dañadas, sin embargo también concluyeron que estas variedades no son las más sembradas porque sus características agronómicas no son las más sobresalientes.

## **Control cultural**

Las buenas prácticas agronómicas que permitan el desarrollo y crecimiento adecuado de las plantas como la fertilización y los trabajos de cultivo oportunos así como la apropiada calendarización de riegos contribuyen a reducir las poblaciones del barrenador (Meagher, 1997). Otras prácticas culturales que influyen en la disminución del daño ocasionado por el barrenador son: la siembra de caña en la época más desfavorable al desarrollo de la plaga (Mendoza, 1996), la destrucción oportuna de malas hierbas para eliminar la presencia de la plaga en hospederos alternos (CAÑAMIP, 2000; Flores, 2007), la quema de los residuos de caña elimina prácticamente el 100 % de los barrenadores que quedan en las puntas que no se cosechan y hasta el 60 % en los troncos (cepas), ya que las larvas se protegen en los tallos subterráneos (Flores, 2007; Vejar-Cota *et al.*, 2009), el establecimiento de cultivos trampa como el sorgo cerca de los cañaverales permite la eliminación de las larvas que infestan estos cultivos al ser destruidos mecánicamente (Mendoza, 1996), el “destroncone” o eliminación de los trozos de tallo remanentes después de la cosecha también ayudan a disminuir las poblaciones del barrenador (Flores, 2007; Vejar-Cota *et al.*, 2009). Aunque en algunas zonas cañeras de México y Sudamérica se practica la eliminación de los meristemos apicales muertos “corazón muerto” en etapa de inicio de desarrollo de la caña “pelillo” (Pérez *et al.*, 1993; CAÑAMIP, 2000; Terán, 2009), no se considera una práctica económicamente factible, además de reducir el impacto de algunos agentes de control biológico (Flores, 2007; Vejar-Cota *et al.*, 2008).

## **Control químico**

Los insecticidas pueden ser efectivos si son aplicados para el control de adultos y estados iniciales de las larvas, aunque, una vez dentro del tallo su control es difícil (Meagher y Gallo, 2008). Las aplicaciones de insecticidas para el control del barrenador resultan costosas y con resultados inciertos (Flores y Abarca, 1961; Toledo, 1993; Meagher *et al.*, 1996; Meagher, 1997; Flores, 2007). Se han evaluado

y utilizado muchos productos químicos en las últimas décadas como el endosulfan, metamidofós, paration metílico, etc., sin embargo, estos no lograron reducir significativamente los problemas de los productores, que por el contrario, han elevado los costos de producción por su aplicación, aunado a la contaminación y eliminación de los enemigos naturales (Flores, 2007; Terán, 2009).

## **Control biológico**

Los insecticidas sintéticos han sido el pilar del control de plagas por más de 50 años, sin embargo, la resistencia, el resurgimiento de plagas y la preocupación por el impacto ambiental han motivado de manera urgente la búsqueda de alternativas basadas en el control biológico (Charnley y Collins, 2007). La caña de azúcar es un cultivo apropiado para implementar el uso de agentes de control biológico, debido a que es de ciclo largo, requiere pocas prácticas culturales y tolera cierto nivel de daño (Hall y Bennett, 1994; Legaspi *et al.*, 2000). El control biológico de los barrenadores se ha llevado a cabo en diferentes países, con diferentes agroecosistemas y diversas condiciones climáticas empleando diversos agentes (Rodríguez del Bosque, 1994) tales como parasitoides, depredadores y entomopatógenos que actúan sobre cualquiera de los estados de desarrollo (Smith *et al.*, 1993; Mendoza, 1996). Los enemigos naturales más utilizados en programas de control biológico contra barrenadores del tallo han sido tradicionalmente los parasitoides (Smith *et al.*, 1993; Smith, 2004). Vejar-Cota (2004) presentó información detallada del control biológico de barrenadores en el ingenio Mochis, donde se liberaron de 11 especies de parasitoides tanto exóticos como nativos, así como otros estudios de evaluación y seguimiento, concluyendo que después de 12 años, el control biológico sigue siendo la estrategia con mayores probabilidades de éxito. A pesar de todos los trabajos realizados para el control de barrenadores en los últimos 20 años en Sinaloa, aún no se ha logrado establecer un parasitoide que controle eficientemente al barrenador (Vejar-Cota, 2016). Una alternativa para el control biológico de barrenadores en el país es el uso de entomopatógenos, por lo que el interés en su

evaluación y utilización se ha incrementado como parte de la búsqueda de estrategias amigables para el control de esta plaga (Hernández, 1994; Hernández y Lezama, 2004; Vejar-Cota, 2016).

### **Entomopatógenos para el control del barrenador**

Los patógenos de insectos son una parte importante del control natural e incluyen bacterias, virus, hongos, nematodos y protozoarios (Kaya y Lacey, 2007; Hernández-Velázquez *et al.*, 2012), los cuales se aplican mediante el desarrollo de formulaciones biológicas (Driesche, 2007). Además de la infección natural y la introducción dentro del control biológico clásico, este grupo de microorganismos son utilizados comúnmente dentro de las estrategias de control biológico por inundación para el control de una plaga (Kaya y Lacey, 2007).

### **Nematodos**

Los nematodos entomopatógenos son altamente letales para los insectos de importancia económica y seguros para las plantas (Bustillo, 1976). Existen 23 familias de nematodos que infectan insectos, de las cuales siete tienen especies con potencial para su uso en los programas de control biológico de insectos; sin embargo solamente las familias Sterneinematidae y Heterorhabditidae presentan especies que se han utilizado como insecticidas microbiales comerciales alrededor del mundo (Koppenhofer, 2007). Ejemplos de estas familias son los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*, los cuales son muy efectivos en el suelo, y actúan en simbiosis con bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* (Bustillo, 1976). El estado juvenil infectivo de los nematodos acarrea a la bacteria simbiote en sus intestinos, y una vez que localiza a un hospedero apropiado, lo invade penetrando a través de las aberturas naturales (boca, espiráculos, ano) o por áreas delgadas de la cutícula hasta llegar al hemoceloma; una vez dentro, la bacteria

simbionte se propaga matando al hospedero por septicemia y metabolizando los tejidos. Los nematodos inician su desarrollo y se alimentan de la bacteria y los tejidos metabolizados del hospedero; después de 1 a 3 generaciones, una nueva generación de juveniles infectivos emerge del cadáver del hospedero (Koppenhofer, 2007).

Hernández-Velázquez *et al.*, (2012) realizaron una revisión de los nematodos evaluados en laboratorio para el control de *D. saccharalis* y *E. loftini* en el continente Americano, incluyendo a las especies *S. glaseri* (Steiner), *S. carpocapsae* (Weiser), *S. feltiae* (Filipjev), *S. rarum* (Doucet), *H. heliothis* (Khan, Brooks and Hirschmann), y *H. bacteriophora* (Poinar); sin embargo, no encontraron información de evaluaciones de campo. Aunque en México no hay reportes de evaluaciones de campo utilizando a los nematodos, existe potencial para el control biológico de las especies de *Diatraea* debido a que se han encontrado especies de nematodos en plantaciones de caña, aunado a su alta infectividad en *D. saccharalis* (Hernández-Velázquez *et al.*, 2012). Grifaldo (2010) aisló en suelos de los cañaverales de Veracruz a la especie *S. riobrave* (Cabanillas, Poinar and Raulston), y mediante bioensayos encontró patogenicidad en larvas de *D. saccharalis*. Por otro lado, Castro-Ortega *et al.* (2014) encontraron tres aislados de nematodos en Morelos, uno de ellos en larvas de *D. magnifactella* y los otros en el suelo, aunque aún desconocen la especie, consideran que tienen potencial para utilizarse en programas de control biológico de barrenadores. En otros estudios, Spaul (1990) evaluó a *Heterorhabditis* sp. como posible agente de biocontrol de larvas de *Eldana saccharina* Walker, encontrando una mortalidad mayor del 40% al realizar aplicaciones con una suspensión de 11,000 millones de juveniles infectivos en 7,400 L de agua/ha. Observó además, que la mortalidad de las larvas fue mayor cuando las aplicaciones se realizaron por la tarde que las realizadas en la mañana o a mediodía.

## Bacterias

Las bacterias patogénicas de insectos se pueden encontrar en una variedad de hábitats en cualquier parte del mundo, incluyendo agua, suelo, plantas y animales (Fisher y Garczynski, 2012). Alrededor de 90 especies de bacterias son causantes de enfermedades en los insectos, y sólo algunas tienen un alto potencial como agentes de control biológico (Nicholls, 2008). Estas bacterias patógenas de insectos se agrupan en las familias Bacillaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Streptococcaceae, y Micrococcaceae (Tanada y Kaya, 1993). Actualmente, el principal bioinsecticida utilizado a base de bacterias se encuentra en la familia Bacillaceae y la más conocida, estudiada y utilizada es *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*) (Ibarra, 2007), debido a que tiene un alto grado de toxicidad sobre una amplia gama de hospederos de los órdenes Coleoptera, Diptera, Hymenoptera y Lepidoptera (Garczynski y Siegel, 2007). Las bacterias entomopatógenas más importantes en el control biológico incluyen a *Bacillus sphaericus* Neide, *Paenibacillus* (anteriormente *Bacillus*) *popilliae* (Dutky), *B. thuringiensis*, *Clostridium* spp (*C. brevifasciens* (Bucher) y *C. malacosomae* (Bucher)), *Serratia marcescens* Bizio y *S. entomophila* Grimmont *et al.* (Ibarra, 2007). A excepción del género *Serratia*, las especies citadas anteriormente son formadoras de esporas y se considera que tienen potencial como insecticidas microbiales (Angus, 1965; Nicholls, 2008). En el caso de *Bt*, los cristales paraesporales paralizan el intestino de varias especies de lepidópteros, permitiendo la fácil penetración de las células vegetativas (Poinar y Thomas, 1984). Los pasos que involucra el modo de acción de las proteínas de *Bt* después de su ingestión son: 1) solubilización de los cristales por el alto pH alcalino del intestino medio, 2) activación de las proteínas por las proteasas, 3) unión de las toxinas a receptores específicos localizados en las microvellosidades de la membrana de las células epiteliales columnares del intestino medio, y 4) inserción de la toxina en la membrana, formando un poro que induce la ruptura celular (Hernández-Velázquez *et al.*, 2012). Son pocos los estudios que se han realizado con esta bacteria en especies de *Diatraea* en el continente americano según lo señala Hernández-Velázquez *et al.* (2012), incluso el mismo autor señala que no hay reportes de aislamientos de *Bt* de cadáveres de larvas de *Diatraea*; sin

embargo, algunas cepas de *Bt* y toxinas puras han sido evaluadas en barrenadores. Algunos estudios recientes con *Bt* solo o en combinación con otros entomopatógenos se han realizado con *D. magnifactella* encontrando resultados prometedores tanto en el laboratorio como en campo (Buenosaires-Alvarez *et al.*, 2014; Flores-Ricardez *et al.*, 2014). Rosas-García *et al.* (2004) evaluaron 12 cepas de *Bt* (complejo proteína cry -espora) a concentraciones de 50 y 500 µg/ml de dieta en larvas de 2 días de edad de *D. saccharalis* (F.). Las cepas utilizadas fueron HD1, HD2, HD9, HD29, HD37, HD59, HD133, HD137, HD559, GM7, GM10 y GM34 (las últimas tres nativas). Las cepas HD133, HD559, GM7, GM10, GM34 mostraron toxicidad, siendo ésta última la más tóxica. Con base en los resultados concluyeron que *Bt* puede ser usada como una alternativa para el control de *D. saccharalis*.

## **Virus**

Los virus que atacan a los insectos pertenecen a las familias: *Baculoviridae*, *Reoviridae*, *Poxviridae*, *Iridoviridae* y *Polydnaviridae*. De ellas, las más utilizadas son *Baculoviridae*, *Reoviridae* y *Poxviridae* que presentan envolturas proteicas de protección (Faulkner y Boucias, 1985; Cory y Evans, 2007). Los baculovirus son los más utilizados con fines de control biológico, debido a que tienen una gama de hospedantes limitados a algunas especies de lepidópteros, himenópteros, dípteros, coleópteros y tricópteros. Hasta el momento se han encontrado alrededor de 450 especies de virus patógenos de insectos y ácaros (Cory y Evans, 2007). Hernández (1994) indica que el virus de la granulosis (VG) y el virus de la poliedrosis nuclear (VPN) afectan larvas del barrenador en Colima, México, mientras que Mendoza (1996) menciona a ambos entomopatógenos ejerciendo un control efectivo del barrenador en Brasil. En un estudio reciente, Vejar-Cota y García-Gutiérrez (2013) realizaron muestreos de larvas de barrenadores en Sinaloa y encontraron la presencia de individuos infectados por virus debido a sus síntomas, incrementando su presencia entre los meses de octubre y diciembre. Hernández-Velázquez *et al.* (2012) realizaron una revisión extensiva de los virus evaluados en barrenadores en

el continente americano, encontrando cuatro virus estudiados en *D. grandiosella* y *D. saccharalis*. Debido al origen de algunas especies de *Diatraea* en el territorio mexicano, se presume que existe la presencia de una gran diversidad de virus en las poblaciones de *Diatraea* que atacan el cultivo de caña (Hernández-Velázquez *et al.*, 2012), como lo observaron Vejar-Cota y García-Gutiérrez (2013).

## Hongos

Dentro de los entomopatógenos, los hongos son considerados como los agentes de mayor efectividad en el control de plagas agrícolas debido a que regulan eficientemente las poblaciones de insectos (Tanada y Kaya, 1993; Alatorre-Rosas y Guzmán-Franco, 2000), incluyendo a los órdenes Hemiptera, Lepidoptera, Orthoptera y Diptera (Hajek *et al.*, 2012). Debido a ello, existe un gran interés en el uso de hongos como agentes de control biológico (Wraight *et al.*, 2007). Estudios taxonómicos recientes utilizando técnicas moleculares han proporcionado información importante sobre la filogenia de los hongos, de esta manera muchos géneros de hongos entomopatógenos previamente manejados bajo la clase Hyphomycetes, han sido reclasificados en el orden Hypocreales del filo Ascomycota (Inglis *et al.*, 2012). Se conocen alrededor de 700 especies de hongos entomopatógenos en 85 géneros, sin embargo, pocos han sido investigados como potenciales micoinsecticidas. Los géneros de hongos patógenos de insectos de mayor distribución e importancia que se encuentran en el orden Hypocreales (Ascomycota) son *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium*, *Nomuraea*, *Isaria* (antes *Paecilomyces*) y *Aschersonia* (Charnley y Collins, 2007).

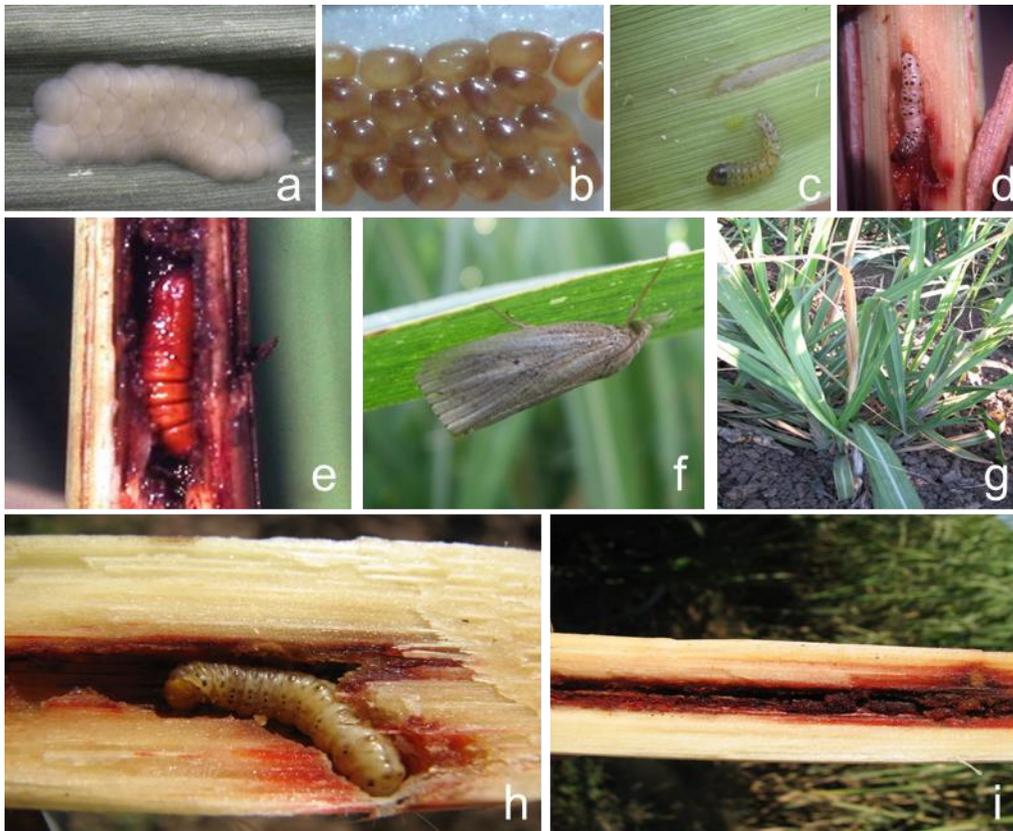
La mayoría de los hongos entomopatógenos invaden a su hospedero por la cutícula externa, aunque algunos son capaces de abrirse camino a través del canal alimentario. Las esporas (unidades infectivas) se adhieren a la cutícula, germinan y penetran al hospedero y posteriormente proliferan en el hemoceloma como blastosporas o células ameboideas. La muerte del hospedero resulta de una combinación de acciones, que incluyen el agotamiento de los nutrientes,

destrucción física o invasión de órganos y toxemia. Después de la muerte, y bajo condiciones favorables, las hifas emergen del cadáver, produciendo esporas que posteriormente son liberadas por el viento o la lluvia (Wraight *et al.*, 2007; Inglis *et al.*, 2012). Como en otros entomopatógenos, los hongos se ven afectados en la habilidad de sobrevivir, propagarse y matar a sus hospederos por diferentes condiciones bióticas y abióticas. El entendimiento de estas condiciones es fundamental para utilizar a los hongos entomopatógenos bajo situaciones que les den las mejores probabilidades de éxito. Entre los factores ambientales que limitan la actividad de los hongos incluye a la radiación solar, temperatura, humedad y la lluvia (Wraight *et al.*, 2007).

Hernández-Velázquez *et al.* (2012) realizaron una revisión de hongos que han sido aislados de barrenadores del genero *Diatraea* desde Argentina hasta EEUU, citando a las especies *B. bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, *B. brongniartii* (Sacc.) Petch., *M. anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, *P. fumosoroseus* (Wize), *Hirsutella* sp., *Cylindrocarpon* sp. y *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. El empleo de los hongos entomopatógenos para el manejo de barrenadores del tallo en caña de azúcar se enfoca principalmente a las especies *M. anisopliae* y *B. bassiana* (Hernández, 1994). Mendoza (1996) menciona que en Brasil y Cuba se ha encontrado a *M. anisopliae* y *B. bassiana* afectando a larvas del barrenador en forma natural; mientras que en México se han encontrado en Colima (Lezama, 1994). Vejar-Cota (2004) cita las especies *B. bassiana* y *Hirsutella* sp. afectando larvas en forma natural de las especies de barrenadores distribuidas en Sinaloa. Es importante considerar, que la efectividad en campo de los hongos entomopatógenos, depende del contacto de las esporas con el hospedero, la formulación y la virulencia del patógeno (Hernández-Velázquez *et al.*, 2012).



**Fig 1.** Especies de barrenadores presentes en el cultivo de caña de azúcar en Sinaloa. (a) *Diatraea considerata* Heinrich, (b) *D. grandiosella* Dyar y (c) *Eoreuma loftini* (Dyar).



**Fig. 2.** Estados de desarrollo del barrenador y tipos de daños en caña de azúcar. (a) huevos de *Diatraea* spp, (b) huevos de *E. loftini*, (c) larva pequeña de *Diatraea* en la hoja, (d) larva madura de *Diatraea* en el tallo, (e) pupa de *Diatraea* en el tallo, (f) adulto de *Diatraea* ), (g) daño al meristemo apical (cogollo muerto), (h) daño físico al tallo, (i) daño por enfermedades (muermo rojo).

## Literatura citada

- Alatorre-Rosas, R. y A. Guzmán-Franco. 2000. Uso de entomopatógenos para el control de insectos, caso *Brevicoryne brassicae*. pp. 83-90. In N. Bautista-Martínez, A. D. Suárez-Vargas, y O. Morales-Galván [eds.], Temas selectos en fitosanidad y producción de hortalizas. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. de México, México.
- Angus, T.A. 1965. Bacterial pathogens of insects as microbial insecticides. Symposium on microbial insecticides. American Society for Microbiology, Bacteriol. Rev. 29: 364-372.
- Buenosaires-Alvarez, A.I., G. Peña-Chora, L.A. Rodríguez del Bosque y V.M. Hernández-Velázquez. 2014. Aplicación de *Bacillus thuringiensis* y *Metarhizium anisopliae* en Xochitepec, Morelos, pp. 311-315. In M.G. Lozano-Contreras, M.J. Burgos-Tan, y J.I. López-Arroyo [eds.]. Memoria: XXXVII Congreso Nacional de Control Biológico, Mérida, Yucatán, México.
- Bustillo, P. A. E. 1976. Patogenicidad del nematodo *Neoplectana carpocapsae* en larvas, prepupas y pupas de *Oxydia trychiata*. Revista Colombiana de Entomología 2: 139 -144.
- CAÑAMIP, 2000. Manejo integrado de barrenadores en caña de azúcar. CENGICAÑA, Guatemala, 26 p.
- Castro-Ortega, I.R., V.M. Hernández-Velázquez, L. Lina-García, G. Peña-Chora y J.M. Caspeta-Mandujano. 2014. Aislamiento de nematodos entomopatógenos en suelos de caña de azúcar del estado de Morelos y determinación de virulencia sobre *Diatraea magnifactella*, pp. 536-539. In M.G. Lozano-Contreras, M.J. Burgos-Tan, y J.I. López-Arroyo [eds.]. Memoria: XXXVII Congreso Nacional de Control Biológico, Mérida, Yucatán, México.

- Charnley A.K. y S.A. Collins. 2007. Entomopathogenic fungi and their role in pest control, pp. 159-187. *In* C.P. Kubicek y I. S. Druzhinina [eds.], Environmental
- Cory, J.S. y H. F. Evans. 2007. Viruses, pp. 149-174. *In* L.A. Lacey, y H. K. Kaya [eds.]. Field manual of techniques in invertebrate pathology, Springer.
- Driesche, R.G. van; M.S. Hoddle y T.D. Center. 2007. Control de plagas y malezas por enemigos naturales. Departamento de Agricultura de Estados Unidos. 751 p.
- Faulkner, P. y Boucias, D.G. 1985. Genetic improvement of insect pathogens: emphasis on the use of baculoviruses, pp. 263-280. *In* M.A. Hoy, y D.C. Herzog, [eds.]. Biological control in agricultural IPM systems. Orlando, Fla. Academic,
- Fisher, T.W. y S.F. Garczynski. 2012. Isolation, culture, preservation, and identification of entomopathogenic bacteria of the Bacilli, pp. 75 - 99. *In* L.A. Lacey y H. K. Kaya [eds.]. Manual of techniques in invertebrate pathology, Elsevier Ltd.
- Flores-Ricardez, A., G. Peña-Chora, M.C. Torres-Quintero. 2014. Nueva cepa de Bt, AF001 aislada de *Aeneolamia postica* (Homoptera: Cercopidae) patogénica a *Diatraea magnifactella* (Lepidoptera: Crambidae) y *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), pp. 453-456. *In* M.G. Lozano-Contreras, M.J. Burgos-Tan, y J.I. López-Arroyo [eds.]. Memoria: XXXVII Congreso Nacional de Control Biológico, Mérida, Yucatán, México.
- Flores, S. 2007. Las plagas de la caña de azúcar en México. Segunda edición. Colegio de Posgraduados, México. 350 p.
- Flores, S. y M. Abarca. 1961. Principales plagas de la caña de azúcar en México, pp. 47-59. Boletín de Divulgación No. 4, Instituto para el Mejoramiento de la Producción de Azúcar, México.

- Garczynski, S.F. y J.P. Siegel. 2007. Bacteria, pp. 175-197. *In* L.A. Lacey y H. K. Kaya [eds.]. Field manual of techniques in invertebrate pathology, Springer.
- Grifaldo, A.P. 2010. Incidencia de nematodos entomopatógenos en áreas cañeras de Veracruz y su interacción con el barrenador de la caña de azúcar *Diatraea saccharalis*. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. 101 p.
- Hajek A.E., Papierok B., Eilenberg J., 2012. Methods for study of the entomophthorales, pp. 285-316. *In* L.A. Lacey [ed], Manual of techniques in invertebrate pathology. Academic Press, London.
- Hall, D. G. y F. D. Bennett. 1994. Biological control and IPM of sugarcane pests in Florida, pp. 297- 325. *In* D. Rosen; F.D. Bennett y J. L. Capinera [eds]. Pest management in the subtropics: Biological control - A Florida perspective. Lavoisier Group. Paris, France.
- Hernández, V.M. 1994. Exploración de entomopatógenos de barrenadores en caña de azúcar, pp. 10-15. *In* Memoria: Curso sobre Control Biológico de Barrenadores en Caña de Azúcar. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Tecomán, Colima, México.
- Hernández, V.M. y R. Lezama. 2004. Uso de entomopatógenos para el control biológico de barrenadores del tallo, pp. 37-45. *In* L.A. Rodríguez-del-Bosque, G. Vejar & E. Cortéz [eds.], Taller Internacional sobre Barrenadores del Tallo de Caña de Azúcar, Sociedad Mexicana de Control Biológico. Los Mochis, Sinaloa, México.
- Hernández-Velázquez, V. M., L. P. Lina-García, V. Obregón-Barbosa, A. G. Trejo-Loyo, y G. Peña-Chora. 2012. Pathogens associated with sugarcane borers, *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Crambidae): A review. International Journal of Zoology. 12 p.

- Humbert, R. P. 1974. El cultivo de la caña de azúcar. Editorial CECSA, México, D.F. 719 p.
- Ibarra, J. E. 2007. Uso de bacterias en el control biológico, pp. 144-159. *In* L. A. Rodríguez-del-Bosque y H. C. Arredondo-Bernal [eds.], Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. 303 p.
- Inglis, G.D., J. Enkerly, y M.S. Goettel. 2012. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales, pp. 189-253. *In* L.A. Lacey [ed.], Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Academic Press, London.
- Jepson, W.F. 1954. A critical review of the world literature on the Lepidopterous stalk borers of graminaceous crops. Commonwealth Inst. Entomol, London. 127 p.
- Kaya, H.K y L.A. Lacey. 2007. Introduction to microbial control, pp. 3-7. *In* L.A. Lacey y H.K. Kaya [eds.]. Field manual of techniques in invertebrate pathology. Springer.
- Koppenhofer, A.M. 2007. Nematodes, pp. 249-264. *In* L.A. Lacey y H.K. Kaya [eds.]. Field manual of techniques in invertebrate pathology. Springer.
- Legaspi, J.C., T.J. Poprawski, y B.C. Legaspi Jr. 2000. Laboratory and field evaluation of *Beauveria bassiana* against sugarcane stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae) in the Lower Rio Grande Valley of Texas. J. Econ. Entomol. 93: 54–59.
- Leerdam, M. B., J. R. Johnson, y J. W. Smith, Jr. 1986. Ovipositional sites of *Eoreuma loftini* (Lepidoptera: Pyralidae) in sugarcane. Environ. Entomol. 15: 75-78.
- Leslie, G. 2004. Pest of sugarcane, pp. 78-100. *In* G. James [ed.], Sugarcane. Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing Company. 216 p.

- Lezama, R. 1994. Perspectivas de control microbiano de barrenadores con hongos entomopatógenos, pp. 38-43. *In* Memoria: Curso sobre Control Biológico de Barrenadores en Caña de Azúcar, Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Tecomán, Colima, México.
- Lugo C. P. 2008. El gusano barrenador de la caña de azúcar (Lepidoptera: Crambidae) y sus parasitoides naturales en el norte de Sinaloa. Tesis de Licenciatura en Biología. Instituto Tecnológico de Los Mochis. 61 p.
- Meagher, R. L. 1997. MIP en caña de azúcar. El texto mundial de MIP. University of Minnesota. Radcliffe's. USDA-EUA. 11 p.
- Meagher, R. L. y Gallo, M. 2008. Sugarcane pests and their management, pp. 3613-3630. *In* J.L. Capinera [ed.]. The Encyclopedia of Entomology. Dordrecht: Springer.
- Meagher, Jr., R. L., J. E. Irvine, R. G. Breene, R. S. Pfannenstiel y M. Gallo-Meagher. 1996. Resistance mechanisms of sugarcane to mexican rice borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 89: 536-543.
- Mendoza, A.F. 1996. Pragas da caña da acucar. Insectos. Cía. Macero - Al, Brasil. 239 pp.
- Nicholls, E.C.I. 2008. Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Medellín, Colombia. Editorial Universidad de Antioquia, 282 p.
- Osorio O.R. y Cibrián T.J., 2000. Comportamiento reproductivo del barrenador de la caña de azúcar *Diatraea considerata* Heinrich (Lepidoptera: Pyralidae). *Agrociencia* 34: 595-602.
- Pérez, F. A.; A. Caro G. y C. Hernández V. 1993. Introducción del parasitoide *Cotesia flavipes* (Cam.) en el control integrado del gusano barrenador del tallo de la caña de azúcar en el ingenio de Los Mochis, Sin., pp. 515-524. *In*

Simposio Nacional: La Capacitación y Desarrollo Tecnológico en el Campo Cañero Mexicano. Tomo 1. Xalapa, Veracruz, México.

Pérez, F. A. y C. Hernández G. 1994. Implementación del control biológico de barrenadores en el Ingenio de Los Mochis, Sinaloa, pp. 49-50. *In* Curso sobre Control Biológico de Barrenadores en Caña de Azúcar, Colima, México.

Poinar, G.O. Jr. y G.M. Thomas. 1984. Laboratory guide to insect pathogens and parasites. Plenum Press, New York, pp. 79-103.

Rodríguez del Bosque. L. A. 2004. Importancia de los barrenadores del tallo, con énfasis en México, pp. 2-6. *In* L.A. Rodríguez-del-Bosque, G. Vejar y E. Cortéz [eds.], Taller internacional sobre barrenadores del tallo de caña de azúcar. Sociedad Mexicana de Control Biológico, Los Mochis, Sinaloa, México. 104 p.

Rodríguez-Del-Bosque, L. A., y G. Vejar-Cota. 2008. Barrenadores del tallo (Lepidoptera: Crambidae) del maíz y caña de azúcar, pp. 9-22. *In* H. C. Arredondo-Bernal y L. A. Rodríguez del Bosque [eds.], Casos de Control Biológico en México. Ed. Mundi-Prensa, México-España.

Rodríguez del Bosque, L. A., G. Vejar-Cota, I. Vázquez-López, J. A. Villanueva-Jiménez, J. López-Collado, R. Alatorre-Rosas, y F. Hernández-Rosas. 2014. Plagas, pp. 147-186. *In* H. Mata-Vázquez; L. A. Rodríguez del Boque, V. H. Rodríguez-Morelos, y E. Vázquez-García [eds.], Manejo Integral de Caña de Azúcar. SAGARPA-INIFAP-UANL.

Rojo, S.J.E. 2015. Formulación y desarrollo de una dieta merídica a base de bagazo de caña de azúcar para la cría del gusano barrenador del tallo, *Diatraea considerata* (Heinrich). Tesis de Maestría, CIIDIR-Sinaloa, Guasave, 65 p.

Rosas-García, N.M., B. Pereyra-Alfárez, K. A. Niño, L.J. Galán-Wong, y L. H. Morales-Ramos. 2004. Novel toxicity of native and HD *Bacillus thuringiensis*

- strains against to the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. *BioControl*, 49: 455–465.
- Smith, Jr., J.W., R.N. Widenmann, y W.A. Overholt. 1993. Parasites of lepidopteran stemborers of tropical gramineous plants. ICIPE Science Press, Nairobi, Kenya. 89 p.
- Smith, Jr. J.W. 2004. Biological control of stemborers with natural enemies, pp. 25-32. *In* L.A. Rodríguez-del-Bosque, G. Vejar y E. Cortéz [eds.], Taller internacional sobre barrenadores del tallo de caña de azúcar. Sociedad Mexicana de Control Biológico, Los Mochis, Sinaloa, México. 104 p.
- Solis, M. A. 2004. Systematics of mexican stalkboring crambine Pyraloidea, pp. 6-22. *In* L.A. Rodríguez-del-Bosque, G. Vejar y E. Cortéz [eds.], Taller internacional sobre barrenadores del tallo de caña de azúcar. Sociedad Mexicana de Control Biológico, Los Mochis, Sinaloa, México. 104 p.
- Spaull, V.W. 1990. Field tests to control the pyralid, *Eldana saccharina*, with an entomogenous nematode, *Heterorhabditis* sp. *Proceedings of the South African Sugar Technologists Association*, 64: 103–106.
- Tanada, Y. y H. K. Kaya. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press. 666 pp.
- Terán, P.F.O. 2009. Manejo ecológico de la caña de azúcar. Santa Cruz, Bolivia. Primera edición. 176 pp.
- Toledo, M. J. A. 1993. Plagas, enfermedades y malezas de la caña de azúcar. Serie Protección Vegetal No. 1. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México. 22 pp.
- Vejar-Cota G. 2004. Control biológico del gusano barrenador del tallo (Lepidoptera: Crambidae) de la caña de azúcar en Sinaloa, pp. 70-84. *In* L.A. Rodríguez-del-Bosque, G. Vejar y E. Cortéz [eds.], Taller internacional sobre

- barrenadores del tallo de caña de azúcar. Sociedad Mexicana de Control Biológico, Los Mochis, Sinaloa, México. 104 p.
- Vejar-Cota, G. 2010. Las plagas de la caña de azúcar y su importancia en el valle del Fuerte, Sinaloa. Panorama agropecuario. Los Mochis, Sin., pp. 16-19.
- Vejar-Cota, G. 2016. Control biológico del barrenador del tallo de la caña de azúcar en Sinaloa, México, Segundo seminario internacional de manejo sustentable de la caña de azúcar. Culiacán, Sinaloa (en prensa).
- Vejar-Cota, G. y C. García-Gutiérrez. 2013. Prevalencia de entomopatógenos del gusano barrenador del tallo de la caña de azúcar (Lepidoptera: Crambidae) en el norte de Sinaloa, pp. 504-507. *In* E. Sansinenea R, J.L. Zumaquero R., y M.C. Del Rincón C [eds.]. Memoria: XXXV Congreso Nacional de Control Biológico, Puebla, México.
- Vejar-Cota, G., L. A. Rodríguez-del-Bosque, y D. Sahagún. 2008. Economic and ecological impacts of hand removing dead hearts caused by *Diatraea considerata* (Lepidoptera: Crambidae) on sugarcane in Mexico. *Southwest. Entomol.* 33: 157-159.
- Vejar-Cota, G., L.A. Rodríguez del Bosque y A. Caro. 2009. Impact of sugarcane burning on the stalkborer *Diatraea considerata* (Lepidoptera: Crambidae) and its parasitoid *Macrocentrus prolificus* (Hymenoptera: Braconidae) in western Mexico. *Southwest. Entomol.* 34: 213-217.
- Vejar-Cota, G., C. García-Gutiérrez, N. M. Rosas-García, L. A. Rodríguez-Del-Bosque y C. I. Saldamando-Benjumea. 2016. Identificación morfológica y molecular de barrenadores del tallo de la caña de azúcar distribuidos en Sinaloa. *Southwest. Entomol.* 40: 153-162.
- Wiedenmann, R.N. 2004. Ecology of lepidopteran stemborers, pp. 23-28. *In* L.A. Rodríguez-del-Bosque, G. Vejar y E. Cortéz [eds.], Taller internacional sobre

barrenadores del tallo de caña de azúcar. Sociedad Mexicana de Control Biológico, Los Mochis, Sinaloa, México. 104 p.

Wraight, S.P., G.D. Inglis y M.S. Goettel 2007. Fungi, pp. 223-248. *In* L.A. Lacey y H.K. Kaya [eds.]. Field manual of techniques in invertebrate pathology. Springer.

# Capítulo II

---

Artículo publicado en el Número 1, Volumen 41 de la Revista **Southwestern Entomologist**.

# IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE BARRENADORES DEL TALLO DE LA CAÑA DE AZÚCAR DISTRIBUIDOS EN SINALOA

## Resumen

Se identificaron mediante estudio de los genitales de machos a tres especies de barrenadores de la caña de azúcar distribuidos en 28 sitios de muestreo de las zonas cañeras norte y centro de Sinaloa. La identificación molecular de éstas se hizo secuenciando el gen de la subunidad I de la enzima citocromo c oxidasa (COI) del ADN mitocondrial. Se identificó a *Diatraea considerata* Heinrich, *D. grandiosella* Dyar, y *Eoreuma loftini* (Dyar) distribuidas en la zona cañera norte (Los Mochis) y centro (El Dorado). Las secuencias de nucleótidos de estas especies comparadas en el GenBank tuvieron similitud con *D. considerada* 99% (673 pb) (acc. no. KP259614), para *D. grandiosella* del 97% (647 pb) (acc. no. KP259615), y para *E. loftini* del 99% (645 pb) (acc. no. KP259616). Se hizo también un análisis de Máxima Verosimilitud (ML) para determinar la proximidad entre estas especies, encontrando que las secuencias corresponden a estas mismas especies reportadas en el GenBank, con el 96% para *D. considerada*, 88% para *E. loftini*, y el 100% para *D. grandiosella*, dando con esto mayor precisión sobre la identidad de las especies distribuidas en esa área. Esta información es básica para la implementación de futuras estrategias de control biológico de estas plagas en Sinaloa.

## Abstract

Three species of sugarcane borers were identified based on study of the male genitalia; these were distributed at 28 sampling sites of northern and central sugarcane areas in Sinaloa, Mexico. The molecular identification of the three species was done by sequencing the enzyme gene of the subunit I of cytochrome c oxidase (COI) of the DNA mitochondrial. *Diatraea considerada* Heinrich, *D. grandiosella*

Dyar, and *Eoreuma loftini* (Dyar) were identified with their distribution in north zone (Los Mochis) and central zone (El Dorado) of sugarcane area. The nucleotide sequences of these species were compared in GenBank, had a similarity to *D. considerata* 99% (673 bp) (acc. No. KP259614), *D. grandiosella* 97% (647 bp) (acc. no. KP259615), and *E. loftini* 99% (645 bp) (acc. no. KP259616). An Analysis of Maximum Likelihood (ML) was done to determine the proximity between these species, founding that the sequences correspond to these same species reported in GenBank, with a confidence of 96% to *D. considerata*, 88% to *E. loftini*, and 100% to *D. grandiosella*, giving certainty to the identification of these species distributed in this area. This information is basic for the implementation of future strategies for biological control of these pests in Sinaloa.

## Introducción

La producción de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en México asciende a 54 millones de ton de caña y 6 millones de ton de azúcar en 790,000 ha de caña cultivada anualmente (CONADESUCA 2014). Uno de los factores limitantes para el cultivo de la caña de azúcar en el país son los barrenadores del tallo, los cuales se encuentran distribuidos en todas las zonas cañeras de México (Rodríguez del Bosque *et al.* 2014). Los géneros de importancia económica son *Diatraea* y *Eoreuma*, estas ocasionan pérdidas en producción de 2 a 10 ton de caña por ha (Rodríguez del Bosque y Vejar-Cota 2008, Rodríguez del Bosque *et al.* 2014).

En Sinaloa, esta plaga causa pérdidas económicas de 100 millones de pesos en 25 mil ha de cultivo cada año (Rodríguez del Bosque y Vejar-Cota, 2008). Un problema para los productores cañeros en el Estado es la movilización de nuevas especies de barrenadores (Rodríguez del Bosque y Pantaleón-Paulino, 2012; Rodríguez del Bosque *et al.*, 2014). Aunque la biología y ecología de los barrenadores es similar, algunos hábitos como sitios de oviposición y de alimentación son diferentes entre las especies de los géneros *Diatraea* y *Eoreuma* (Leerdam *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1993, Rodríguez del Bosque *et al.*, 2014), lo que

limita la implementación de estrategias de manejo de esta plaga, principalmente en la selección y establecimiento de parasitoides (Wiedenmann *et al.*, 2003, Rodríguez del Bosque *et al.*, 2014).

Rodríguez del Bosque *et al.* (2014) generaron información sobre las especies de barrenadores de importancia económica en México, así como su distribución y estrategias de manejo; sin embargo, las técnicas para la separación de especies son escasas, debido a que comparten características similares, principalmente en los estados de huevo, larva y pupa (Agnew *et al.*, 1988; Riley y Solis, 2005; Passoa, 2014). Bleszynski (1969) provee información detallada para identificar adultos de barrenadores mediante el análisis de los genitales, lo que le da mayor precisión a la identificación de la especie para la selección de agentes de control biológico apropiados y el uso de estrategias de manejo específicas. Agnew *et al.* (1988) compararon especies de barrenadores que han sido confundidas, y señalan que el uso de los genitales del macho proporcionó suficiente evidencia para la separación de especies. Vargas *et al.* (2013) describieron a tres especies de barrenadores del Valle del Río Cauca en Colombia, mencionando que la separación de especies en estado de pupa y los genitales del macho proporcionó evidencia suficiente para su identificación.

Hebert *et al.* (2003) lograron la identificación exitosa de 200 especies de Lepidoptera, con lo cual propusieron un sistema de identificación de especies mediante la secuenciación del gen de la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa (COI) del ADN mitocondrial (ADNmt) que definieron como “Código de barras”. Actualmente existen numerosos trabajos de secuenciación del gen COI del ADNmt de insectos (Hajibabaei *et al.*, 2006). Lanteri (2007) y Jinbo *et al.*, (2011) mencionan que la secuenciación de una fracción del COI no sustituye la taxonomía alfa o la filogenia, pero ayuda a agilizar las tareas de identificación en cualquier estado de desarrollo del insecto. Por lo anterior, el presente trabajo tuvo por objetivo: identificar morfológica y molecularmente a las especies de barrenadores de la caña de azúcar distribuidas en las regiones cañeras del norte y centro de Sinaloa.

## **Materiales y métodos**

### **Obtención de los insectos**

De agosto de 2013 a marzo de 2014, se realizaron colectas del barrenador del tallo en dos zonas cañeras del estado de Sinaloa, 23 sitios de muestreo en el norte (Los Mochis, 25° 42' - 25° 53' N, 108° 53' - 109° 14' O; 5-20 msnm) y 5 en el centro (El Dorado, 24° 21' - 24° 36' N; 107° 14' - 107° 27' O; 9-32 msnm) (Fig. 1). En una parcela de cada sitio se tomaron 100 tallos con síntomas de daño por barrenadores, los cuales se cortaron longitudinalmente.

Después las larvas y/o pupas fueron extraídas y colocadas individualmente en cajas de plástico de 6 cm de diámetro para transportarlas al laboratorio. Se colectaron 1,325 larvas y 211 pupas del barrenador en ambas zonas cañeras del estado, a una altitud de 5 a 32 msnm. Algunas larvas se conservaron en alcohol etílico absoluto para utilizarlas en la caracterización molecular, y otras se alimentaron con dieta artificial modificada para obtener adultos (Badilla et al. 1994) (313 adultos, 180 machos y 133 hembras), los cuales fueron conservados en alcohol al 70% para el análisis de los genitales. Los especímenes identificados se encuentran depositados en la colección de referencia del CIIDIR Sinaloa.

### **Extracción y montaje de genitales**

Los adultos se separaron por localidad, especie y sexo. A los machos se les cortó la parte distal del abdomen y esta se colocó en un tubo de 2.0 mm con KOH al 10% para ponerlo en baño maría a 80°C por 20 min, se dio un lavado con agua destilada y se deshidrató en alcohol absoluto. A los genitales se le eliminó el excedente de tejido circundante y se separaron las estructuras bajo el microscopio estereoscópico a 40X, después se montaron en bálsamo de Canadá. Se utilizaron las estructuras genitales del macho por ser las que permiten la diferenciación entre las especies de barrenadores (Agnew *et al.*, 1988; Vargas *et al.*, 2013). Para la separación de

especies se utilizó la clave de Bleszynski (1969). Las fotografías de los genitales se tomaron con un microscopio Carl Zeiss Primo Star® a 4X, con una cámara digital AxioCamERc5s® integrada y un estereoscopio Carl Zeiss Discovery V8® a 10, 20, y 40X.

Para determinar la distribución de los barrenadores se tomó el número promedio de cada especie por cada parcela muestreada en cada zona cañera. Después se hizo una separación de medias del número de larvas colectadas mediante la prueba de  $t$  ( $P < 0.05$ ) (SAS Institute, 2009).

### **Caracterización molecular**

A cada larva de barrenador se le cortó un segmento de 2 mm de la región cefálica y se colocó en un tubo de 1.5 ml a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 30 min. Para la extracción del ADN se utilizó el kit comercial Promega (Wizard® Genomic DNA Purification Kit A1120, Madison, WI). La amplificación de la región COI del ADNmt se hizo en un termociclador (Veriti® 384-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems®, Hercules, CA). Se utilizaron los primers LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') propuestos por Folmer *et al.*, (1994) y Hebert *et al.* (2003). La reacción de PCR consistió en 5  $\mu\text{l}$  de Buffer GoTaq® 1X, 0.5  $\mu\text{l}$  de la mezcla de dNTP's 0.2 mM, 1.0  $\mu\text{l}$  de cada primer 0.2 mM, 0.25  $\mu\text{l}$  de ADN polimerasa GoTaq® 1.25 U, 16.25  $\mu\text{l}$  de agua ultra pura y 1  $\mu\text{l}$  del ADN molde para obtener un volumen total de 25  $\mu\text{l}$ . La amplificación se realizó en dos fases, la primera consistió en un ciclo de desnaturalización inicial (1 min a  $94^{\circ}\text{C}$ ), cinco ciclos (1 min a  $94^{\circ}\text{C}$ ), alineación (1.5 min a  $45^{\circ}\text{C}$ ), y extensión (1.5 min a  $72^{\circ}\text{C}$ ). La segunda fase fue de 35 ciclos (1 min a  $94^{\circ}\text{C}$ ), alineación (1.5 min a  $50^{\circ}\text{C}$ ), y extensión (1 min a  $72^{\circ}\text{C}$ ), y una extensión final (5 min a  $72^{\circ}\text{C}$ ) (Hebert *et al.*, 2003). Se incluyó una muestra positiva (ADN de *D. considerata* del Centro de Biotecnología Genómica) y una negativa (mezcla de los reactivos sin ADN). Cada producto de la PCR fue limpiado con Exo-SAP IT® (Santa Clara, CA) por incubación a 37 y  $80^{\circ}\text{C}$  por 15 min en cada temperatura. Para la reacción de secuenciación se

utilizó un kit comercial (Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing, NimaGen, The Netherlands) y se purificó con un kit comercial (Big Dye® X-Terminator Purification). La secuenciación se realizó en un equipo automatizado ABI 3130 (Applied Biosystems®).

## **Análisis de datos**

Las secuencias obtenidas fueron ensambladas en el programa Lasergene SeqMan Pro® (Dnastar®, Boston, MA) y alineadas en el programa Clustal W 2.1, y luego se compararon con las secuencias del National Center for Biotechnology Information con el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). La información de las secuencias del COI del ADNmt se subieron a la base de datos del GenBank con los números de acceso KP259614 (*D. considerata*), KP259615 (*D. grandiosella*), y KP259616 (*E. loftini*).

Además se compararon 30 secuencias de barrenadores del GenBank con una longitud de 614 pb con las secuencias de las especies de barrenadores de este trabajo, obteniendo así un árbol de genes mediante el algoritmo de Máxima Verosimilitud (ML) (Guindon y Gascuel, 2003) con el programa Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013). Este árbol se utilizó para visualizar las secuencias obtenidas en este trabajo junto con las secuencias obtenidas del GenBank de estas especies, y confirmar con esto la identidad y variabilidad genética del material colectado.

## **Resultados y discusión**

### **Identificación de especies de barrenadores**

Las especies identificadas fueron *Diatraea considerata* Heinrich, *D. grandiosella* Dyar, y *Eoreuma loftini* (Dyar) (Fig. 2). Lo anterior confirma la presencia de estas especies con reportes previos para el estado (Vejar-Cota *et al.*, 2005, Rodríguez del

Bosque y Vejar-Cota, 2008). Con base en los estudios de Bleszynski (1969) y Agnew *et al.*, (1988), y considerando el estudio de las características morfológicas de los genitales del macho se elaboró la siguiente clave pictórica para la separación de especies de barrenadores de Sinaloa.

**CLAVE BASADA EN LOS GENITALES DEL MACHO PARA SEPARAR  
ESPECIES DE BARRENADORES DE LA CAÑA DE AZUCAR EN SINALOA,  
MEXICO.**

- 1. Lóbulo lateral del tegumen presente (Fig. 2-A3)..... *D. considerata*
- Lóbulo lateral del tegumen ausente (Fig. 2-B3, 2-C3)..... 2
- 2. Valva simétrica con una espina subapical en los brazos laterales de la juxta (Fig. 2-B2) ..... *D. grandiosella*
- Valva asimétrica con el proceso costal derecho truncado y ensanchado distalmente, el proceso costal izquierdo ligeramente reducido en el centro y curvado hacia el interior (Fig. 2-C2)..... *E. loftini*

*Diatraea considerata* se encontró en todas las parcelas muestreadas durante los muestreos (n = 1,097 larvas), obteniéndose un promedio de  $43.2 \pm 12.2$  larvas en la zona cañera norte y de  $20.6 \pm 8.2$  larvas en la zona cañera centro. Los genitales del macho de *D. considerada* se caracterizan por presentar los lóbulos del tegumen redondeados en forma de dedo (Bleszynski, 1969), característica que puede utilizarse para separarla de *D. grandiosella* y *E. loftini* en el estado adulto (Fig. 2A-3).

Por otro lado, *D. grandiosella* (n = 113 larvas) se encontró en todas las parcelas muestreadas de la zona cañera centro ( $18.8 \pm 6.4$  larvas), mientras que en la zona cañera norte solo se encontró en 6 de las 23 parcelas ( $0.8 \pm 2.2$  larvas). La característica principal para distinguir esta especie es la ausencia del lóbulo

teguminal y la presencia de una espina subapical en los brazos de la juxta de los genitales (Fig. 2B-2).

*Eoreuma loftini* se encontró en 27 de las 28 parcelas muestreadas en ambas zonas cañeras (n = 115 larvas). Esta especie se distingue de *Diatraea* debido a la forma asimétrica de las valvas de los genitales del macho, así como en la forma de los procesos costales (Fig. 2C-2).

### **Caracterización molecular**

Se obtuvo el producto de la PCR del gen COI del ADN de *D. considerata*, *D. grandiosella*, y *E. loftini*. Las secuencias de nucleótidos obtenidos de cada especie se observan en la Fig. 3. Estas secuencias concuerdan con las registradas en el GenBank, obteniéndose una similitud del 99% para *D. considerata* (673 pb) y *E. loftini* (645 pb), respectivamente, y del 97% para *D. grandiosella* (647 pb).

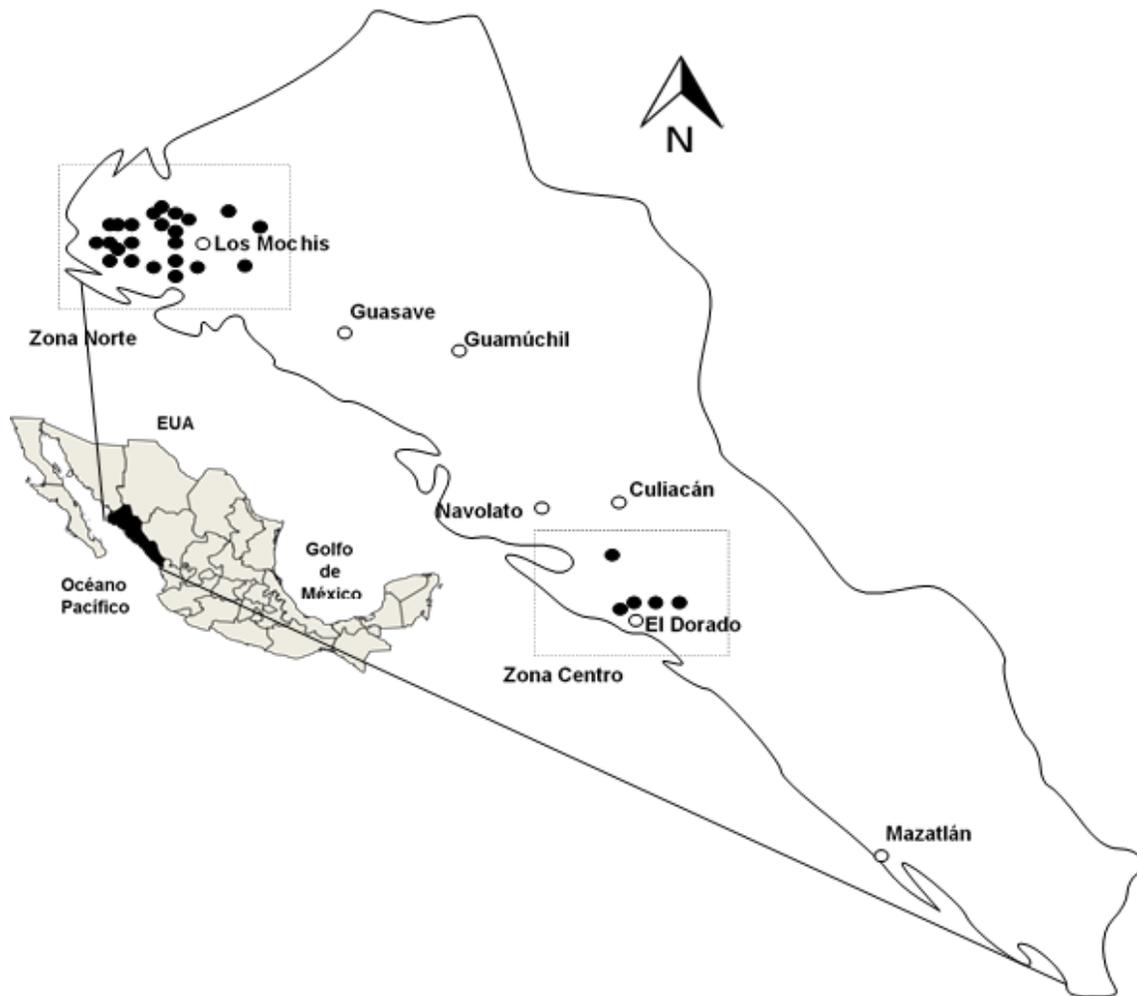
El árbol de Máxima Verosimilitud (ML) (Fig. 4) agrupó la secuencia Seq1 de la especie *D. considerata* con 96% de confianza, la secuencia Seq3 de la especie *E. loftini* con un 88% y *D. grandiosella* con 100%. Estas con sus respectivos grupos de secuencias provenientes del GenBank.

Estos resultados corroboraron la identificación precisa de estas tres especies de barrenadores distribuidas en las zonas cañeras norte y centro de Sinaloa. Este método para la identificación de barrenadores es básico para la implementación de futuras estrategias de control biológico de estas plagas en Sinaloa.

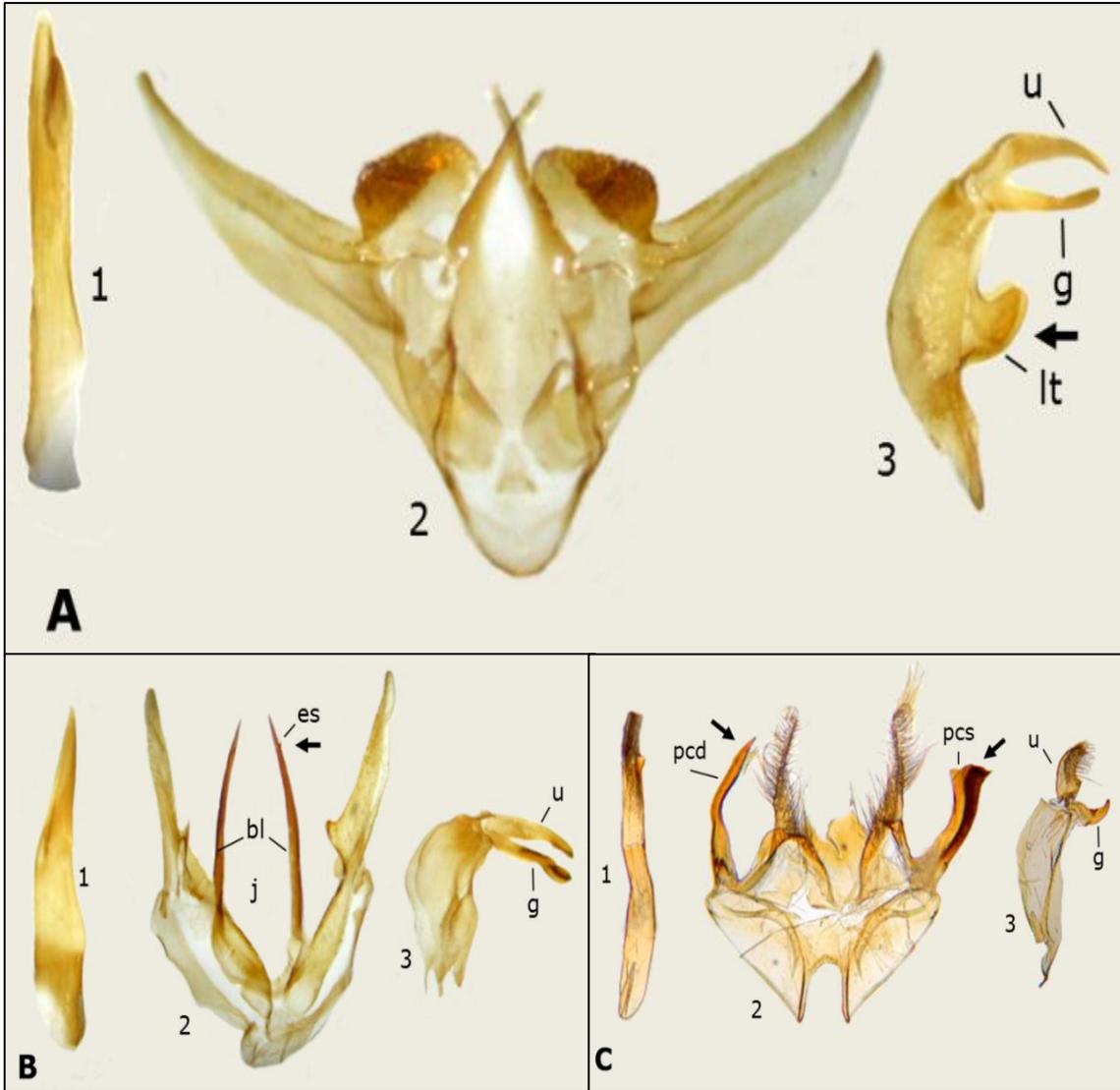
### **Agradecimiento**

Se agradece a CONACyT México por la beca (357687), Química Internacional Aplicada S.A. de C.V. y al equipo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología

Ambiental del Centro de Biotecnología Genómica, Reynosa y al Campo Experimental Río Bravo del INIFAP por el apoyo durante la estancia en Tamaulipas. Este estudio fue financiado a través del proyecto multidisciplinario IPN-SIP 20140409.

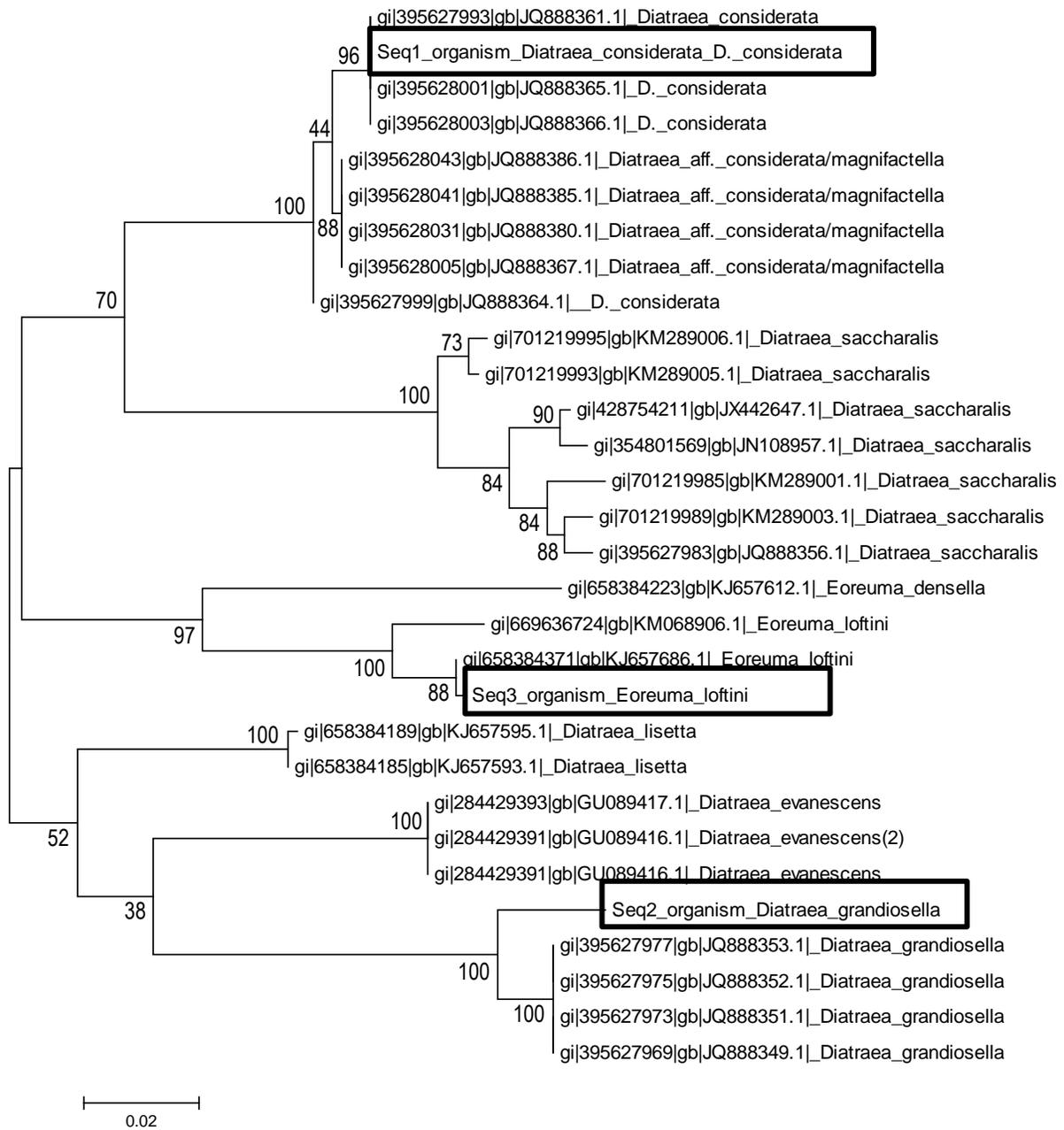


**Fig. 1.** Sitios de muestreo de barrenadores de la caña de azúcar en Sinaloa, México.



**Fig. 2.** Genitales ♂, A. *Diatraea considerata*, B. *D. grandiosella* y C. *Eoreuma loftini*. Estructuras clave: 1) Aedeagus; 2) Valvas, juxta (j), brazos laterales (bl), espina subapical (es), proceso costal dextral (pcd), proceso costal sinistral (pcs); 3) Tegumen, uncus (u), gnathos (g), lóbulo lateral tegumenal (lt).





**Fig. 4.** Árbol de Máxima Verosimilitud de las secuencias obtenidas de *Diatraea considerata* (Seq1), *Diatraea grandiosella* (Seq2), y *Eoreuma loftini* (Seq3), y secuencias reportadas en el GenBank.

## Literatura citada

- 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.
- Badilla, F., A. I. Solís, y D. Alfaro. 1994. Manual de producción del parasitoide *Cotesia flavipes* para el control biológico de los taladradores de la caña de azúcar *Diatraea* spp. en Costa Rica. Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA), Costa Rica.
- Bleszynski, S. 1969. The taxonomy of the Crambine moth borers of sugar cane, pp. 11-59. *In* J. R. Williams, J. R. Metcalfe, R. W. Montgomery, and R. Mathes [eds.], *Pests of Sugar Cane*. Elsevier Pub. Co., New York.
- CONADESUCA. 2014. Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar, campo y fábrica Zafra 13-14, Sistema INFOCaña. Consultado el 10 de Septiembre de 2014. [www.conadesuca.org.mx](http://www.conadesuca.org.mx).
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3: 294-299.
- Guindon, S., and O. Gascuel. 2003. A simple fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Syst. Biol.* 52: 696-704.
- Hajibabaei, M., D. H. Janzen, J. M. Burns, W. Hallwachs, and P. D. N Hebert. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 13: 968-971.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, and J. R. de Waard. 2003. Biological identification through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. B.* 270: 313-321.

- Jinbo, U., T. Kato, and M. Ito. 2011. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomol. Sci.* 14: 107-124.
- Lanteri, A. A. 2007. Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la entomología. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 66: 15-25.
- Leerdam, M. B., J. R. Johnson, y J. W. Smith, Jr. 1986. Ovipositional sites of *Eoreuma loftini* (Lepidoptera: Pyralidae) in sugarcane. *Environ. Entomol.* 15: 75-78.
- 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.lepintercept.org](http://www.lepintercept.org)].
- Riley, D. R., and A. Solis. 2005. Keys to immatures of the sugarcane borer and neotropical cornstalk borer from Tamaulipas, Mexico, intercepted on corn in southeastern Texas. *Southwest. Entomol.* 30: 35-39.
- Rodríguez del Bosque, L. A., and G. Pantaleón-Paulino. 2012. *Eoreuma loftini* (Lepidoptera: Crambidae) expanded its geographical range into Southern Veracruz and Northern Oaxaca, Mexico. *Southwest. Entomol.* 37: 525-527.
- Rodríguez del Bosque, L. A., y G. Vejar-Cota. 2008. Barrenadores del tallo (Lepidoptera: Crambidae) del maíz y caña de azúcar, pp. 9-22. *In* H. C. Arredondo Bernal y L. A. Rodríguez del Bosque [eds.], *Casos de Control Biológico en México*. Ed. Mundi-Prensa, México-España.
- Rodríguez del Bosque, L. A., G. Vejar-Cota, I. Vásquez-López, J. A. Villanueva-Jiménez, J. López-Collado, R. Alatorre-Rosas, y F. Hernández-Rosas. 2014. Plagas, pp. 147-186. *In* H. Mata-Vázquez; L. A. Rodríguez del Boque, V. H.

Rodríguez-Morelos, y E. Vázquez-García [eds.], Manejo Integral de Caña de Azúcar. SAGARPA-INIFAP-UANL.

SAS Institute. 2009. STAT/SAS User's Guide, release 9.0. ed. SAS Institute, Cary, NC.

Smith, Jr., J. W., R. N. Wiedenmann, and W. A. Overholt. 1993. Parasites of lepidopteran stemborers of tropical gramineous plants. ICIPE Science Press, Nairobi, Kenya.

Tamura, K, G. Stecher, D. Paterson, A. Filipski, y K. Kummar. 2013. Mega 6. Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30: 2725-2779.

Vargas, G., L. A. Lastra, and M. A. Solis. 2013. First record of *Diatraea tabernella* (Lepidoptera: Crambidae) in the Cauca River Valley of Colombia. Fla. Entomol. 96: 1198-1201.

Vejar-Cota, G., N. E. Echeverria, and L.A. Rodríguez-del-Bosque. 2005. Parasitism and development of *Conura acuta* (Hymenoptera: Chalcididae) on sugarcane stalkborers (Lepidoptera: Crambidae) in Mexico. Env. Entomol. 34: 1122-1128.

Wiedenmann, R. N., J. W. Smith, Jr., and L.A. Rodríguez del Bosque. 2003. Host suitability of the new world stalkborer *Diatraea considerata* for three Old World *Cotesia* parasitoids. BioControl 48: 659-669.



12Ene16

Estimado Dr. García: me es grato comunicarle que su manuscrito 'Identificación Morfológica y Molecular de Barrenadores del Tallo de la Caña de Azúcar (Lepidóptera: Crambidae) Distribuidos en Sinaloa' de los autores Guadalupe Vejar-Cota, Cipriano García-Gutiérrez, Ninfa M. Rosas-García, Luis A. Rodríguez-Del-Bosque y Clara Inés Saldamando-Benjumea, ha sido aceptado para publicarse en la revista *Southwestern Entomologist*. Los últimos comentarios y cambios hechos al manuscrito demuestran que ya está listo para ser publicado en el número de marzo de este 2016.

Sin más por el momento reciba un afectuosos saludo y le agradecemos su interés de publicar su interesante trabajo en nuestra revista.

Atentamente,

*Carlos A. Blanco*

Carlos A. Blanco, Editor asociado

[Carlos.a.blanco@aphis.usda.gov](mailto:Carlos.a.blanco@aphis.usda.gov) / [carlos.blanco1206@gmail.com](mailto:carlos.blanco1206@gmail.com)

Cc. Dr. Bonnie Pendleton, Editor-in-Chief

# Capítulo III

---

Artículo sometido a la revista **Southwestern Entomologist**

# MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI WITH POTENTIAL TO CONTROL SUGARCANE BORERS (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) IN SINALOA

## Abstract

Eight new strains of entomopathogenic fungi from two Mexican collections were identified using morphological and molecular traits to be used as possible biological control agents against sugarcane borers in Sinaloa. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Metarhizum anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, and *Isaria javanica* (Friederichs & Bally) Samson & Hywel-Jones were identified. For morphological study, conidia, conidiogenous cell and the colonial growth rate were measured, whereas for molecular characterization, the internal transcribed spacers of ribosomal DNA (ITS) of each one were used. The strains of *B. bassiana* showed conidia smaller than 3.5  $\mu\text{m}$  and were similar among them, both in color and appearance of the colony. Conidia, conidiogenous cells and colonial growth of *M. anisopliae* and *I. javanica* strains were typical of each species, both in shape and color. The growth rate of each strain was 2.05 to 3.03 mm/day. The nucleotide sequence of each strain was compared with the GenBank database confirming that corresponded to *B. bassiana*, *M. anisopliae* and *I. javanica* species, respectively, with similarities ranging from 96 to 99%. This study allowed obtaining a precise identification for *B. bassiana*, *M. anisopliae* and *I. javanica* species in order to be used in future studies as biocontrol agents for the sugarcane borers.

## Resumen

Ocho cepas nuevas de hongos entomopatógenos de dos colecciones mexicanas fueron identificadas con los rasgos morfológicos y moleculares para el uso de estos como posibles agentes de control biológico contra el barrenador de caña de azúcar

en Sinaloa. Se identificaron *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, e *Isaria javanica* (Friederichs y Bally) Samson y de Hywel-Jones. Para el estudio morfológico, se midieron las conidias, las células conidiógenas y la tasa de crecimiento colonial, mientras que para la caracterización molecular, se usaron los espaciadores transcritos internos del ADN ribosomal (ITS) de cada uno de ellos. Las cepas de *B. bassiana* mostraron conidias menores de 3.5 micras y fueron similares entre ellas, tanto en el color como en la apariencia de la colonia. Las cepas de *M. anisopliae* e *I. javanica* mostraron conidias, células conidiógenas y crecimiento colonial típicos de cada especie, tanto en forma como en color. La tasa de crecimiento de cada cepa fue de 2.5 hasta 3.3 mm / día. La secuencia de nucleótidos de cada cepa se comparó con la base de datos GenBank confirmando que corresponden a las especies *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *I. javanica*, con similitudes que van desde 96 hasta 99%. Este trabajo permitió obtener la identificación precisa de las especies *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. javanica* con el fin de ser utilizado en futuros estudios como agentes de biocontrol para los barrenadores de la caña de azúcar.

## Introduction

The borers complex *Diatraea-Eoreuma* (Lepidoptera: Crambidae) includes the most important pests to corn and sugarcane crops (Rodríguez-Del-Bosque and Vejar-Cota 2008) and its species are widely distributed in Mexico (Rodríguez del Bosque *et al* 2014). *Diatraea considerata* Heinrich, *D. grandiosella* Dyar and *Eoreuma loftini* (Dyar) are distributed also in Sinaloa (Vejar-Cota *et al.* 2016). These pests are attributed production losses between 2 to 10 tons of sugarcane per hectare, with estimated costs over 10 million dollars in 25000 hectares annually (Rodríguez-Del-Bosque and Vejar-Cota 2008). An important strategy of biological control is the use of entomopathogenic fungi (EF) (Hypocreales: Clavicipitaceae), these are compatible with other control strategies and are also environmentally friendly agents (Hernández and Lezama 2004; Shahid *et al.* 2012). Several steps are needed to find

potential EF to be used in a successful biological control program. Their morphological and physiological characteristics must be considered to choose them as potential insecticides (Jackson *et al.* 1985, Padmavathi *et al.* 2003).

The traditional identification of most EF species require microscopic observations of the morphological structures (Humber 2012). Tangthirasunun *et al.* (2010) suggest that morphological and molecular features must be studied together to confirm the identification of these fungi and their biological properties. For fungal molecular identification, Scoch *et al.* (2012) analyzed four molecular markers with potential for discriminating among species. This group found that internal transcribed spacers (ITS) of the nuclear ribosomes (rDNA) provided a reliable separation of species identification. The use of two or more markers depends on the type of study to be conducted. This study was conducted with the aim of identifying morphologically and molecularly pure new strains in our Fungi collection of *Beauveria*, *Metarhizium*, and *Isaria* from two Mexican collections as part of a pool of strains with potential to control the sugarcane borers in Sinaloa.

## **Materials and methods**

### **Source and growth conditions**

Eight new strains of entomopathogenic fungi from two Mexican collections were ingress to our Fungi Collection (Table 1). Each strain was initially grown in a solid PDA, 1% yeast extract and 500 mg/l chloramphenicol (21 days) (Inglis *et al.* 2012). The material obtained was kept refrigerated at 4 °C.

### **Morphological identification**

A PDA block (1 cm<sup>2</sup>) was placed inside a Petri dish and inoculated according to Inglis *et al.* (2012). Three replicates were made and incubated at room temperature

(26 - 27 °C) for 7 days. Once observed the fungal structures, the coverslips were removed and placed on a drop of blue cotton with lactic acid (Jensen 1962). Slides were observed on a Leica DM6000 CS® (IL, USA) microscope (100x). Images were taken with a Leica DFC450 C® digital camera and a micrometer integrated (LAS AF 2.5 Lite program) were used. At least, 30 independent measurements of conidia (n = 30) and conidiogenous cells (n = 30) were made for each strain. For morphological identification of fungi, the taxonomic key by Sampson (1974) and Humber (2012) were used.

For fungal colony growth, a circle of sterile filter paper (6 mm) was placed in the center of a Petri dish with PDA acidified (lactic acid 10%) and then 2 µl of a conidial suspension ( $2.1 \times 10^6$  spores / ml) were added (Brunner-Mendoza *et al.* 2013). Five replicates were performed for each strain and incubated at  $27 \pm 1.0$  °C for 20 days. Growth was measured every third day considering the average of two perpendicular diameters of the colony. At the end of the incubation period, the growth rate in mm/day was calculated. In addition, morphological characteristics of the colony such as color, appearance, and surface were observed. Colony images were taken with a digital camera Canon PowerShot S2 IS® (NY, USA).

### **Molecular characterization**

Spores of each strain were cultivated in 50 ml of liquid medium (potato dextrose broth + 10% yeast extract) in a 250 ml Erlenmeyer flask, placed in a shaker (200 rpm) (Lab-Line Model 3527 Environ Shaker, ON, Canada) at 28 °C for 3 days. One ml of biomass was placed in a 1.5 ml tube, washed (sterile water) and frozen (-70 °C, 60 min). The mycelium was macerated with a sterile pestle, and 500 µl of extraction buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA and 0.5% SDS) were added. To remove proteins, several washes with octanol-chloroform (24:1) were done. The DNA was precipitated with isopropanol (500 µl), washed and resuspended in 1X TE (Raeder and Broda 1985).

The amplification of the ITS1/5.8S/ITS2 rDNA was conducted in a thermocycler (Veriti® 384-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems, Hercules, CA). Universal primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') were used (White *et al.* 1990). PCR reaction were performed in 25 µl using 5 µl of 1X Buffer GoTaq®, 0.5 µl of 0.2 mM dNTP's mix, 1.0 µl of 0.2 mM each primer, 0.25 µl of 1.25 U GoTaq® DNA polymerase, 16.25 µl of ultrapure water and 1 µl of template DNA. PCR conditions were one cycle of initial denaturation (5 min at 94 °C), 35 cycles (30 s at 94 °C), alignment (30 s at 58 °C), and extension (1 min at 72 °C ) and a final extension (7 min at 72 °C). A positive control (DNA from strain, ARSEF 6342) and a negative control (ultrapure water) were included. Each PCR product was cleaned with Exo-SAP IT® (Santa Clara, CA) and incubated for extension at 37 and 80 °C for 15 min at each temperature. For sequencing, a commercial kit (Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing and X-Terminator Big Dye® Purification, NimaGen, The Netherlands) were used. Sequencing was performed in an automated ABI 3130 (Applied Biosystems®).

### **Data analysis**

An analysis of variance (ANOVA) ( $\alpha = 0.05$ ) was used to compare data of conidia size (length/width), conidiogenous cells size, and growth rate among fungal strains. Tukey's multiple comparison test was conducted to identify significant differences ( $P \leq 0.05$ ) using SAS v.9 software (SAS Institute 2009).

The sequences were assembled in the Lasergene SeqMan Pro® software (Dnastar®, Boston, MA) and aligned using Clustal W 2.1 program. Sequences were compared with the National Center for Biotechnology Information BLAST program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). ITS rDNA sequences of each strain were deposited in GenBank (Table 1).

## Results and discussion

### Morphological identification

Macro and microscopic characteristics of all strains are illustrated in Fig. 1. Conidial measurements and growth rate of each strain are summarized in Table 2. Significant differences in conidia and conidiogenous cells length were observed between strains of *B. bassiana* (Table 2). In our study, the dimensions of the conidia, as well as colonial appearance were similar to those described by De Hogg (1972) and Humber (2012). On the other hand, eight isolates of *B. bassiana* described by Kulu *et al.* (2015) against *Plutella xylostella* L., were also similar, both in size and shape. The growth rate for these species ranged from 2.05 to 2.62 mm/day, showing significant differences in the strain ABNB8 (Table 2). Vélez-Arango *et al.* (2001) determined that the daily growth rate average of 17 isolates of *B. bassiana* was 2.20 mm (1.40 - 3.70 mm/day) at 25 °C, being similar to the results obtained in our study (2.29 mm/day in average).

In *M. anisopliae* the color of the colony varied from white with yellow hues to green during sporulation (Fig. 1). Conidia and conidiogenous cells from *M. anisopliae* in our work were similar to Humber's (2012) description. Significant differences in conidia and conidiogenous cells length were observed among strains (Table 2). Tangthirasunun *et al.* (2010) established varieties of *M. anisopliae* using, among others morphological characteristics, the length/width conidia ratio, which suggests correlation in the selectivity of some varieties toward the insect host. The growth rate for *M. anisopliae* was similar among strains varying between 2.70 and 3.03 mm/day (Table 2). Torres de la C. *et al.* (2013) found a growth rate of 1.11 to 1.64 mm/day at 25 °C for 17 isolates of *M. anisopliae*, still lower than the results found for this species in our work.

Conidia and conidiogenous cells were typical to *Isaria javanica* (Fig 1). Gallou *et al.* (2016) clarified several *Isaria* isolates from Centro Nacional de Referencia de Control Biológico of Mexico, our data were similar (conidia size and colony color). The growth rate for this species was 2.07 mm/day (Table 1). Shimazu and

Takatsuka (2010) mentioned a daily growth rate of 2.14 to 2.50 mm/day for *I. javanica* depending on the culture medium at 25 °C, which was close to that obtained in the present study (2.07 mm/day).

Morphological features in our study confirmed the species *B. bassiana*, *M. anisopliae* and *I. javanica*, however there are small differences among them as the form and size of the conidia, geographic origin, and insect host that could be used to correlate with virulence in new studies. In the same way, the growth rate could be an important physiologic feature in selecting a strain for fungal production.

### **Molecular characterization**

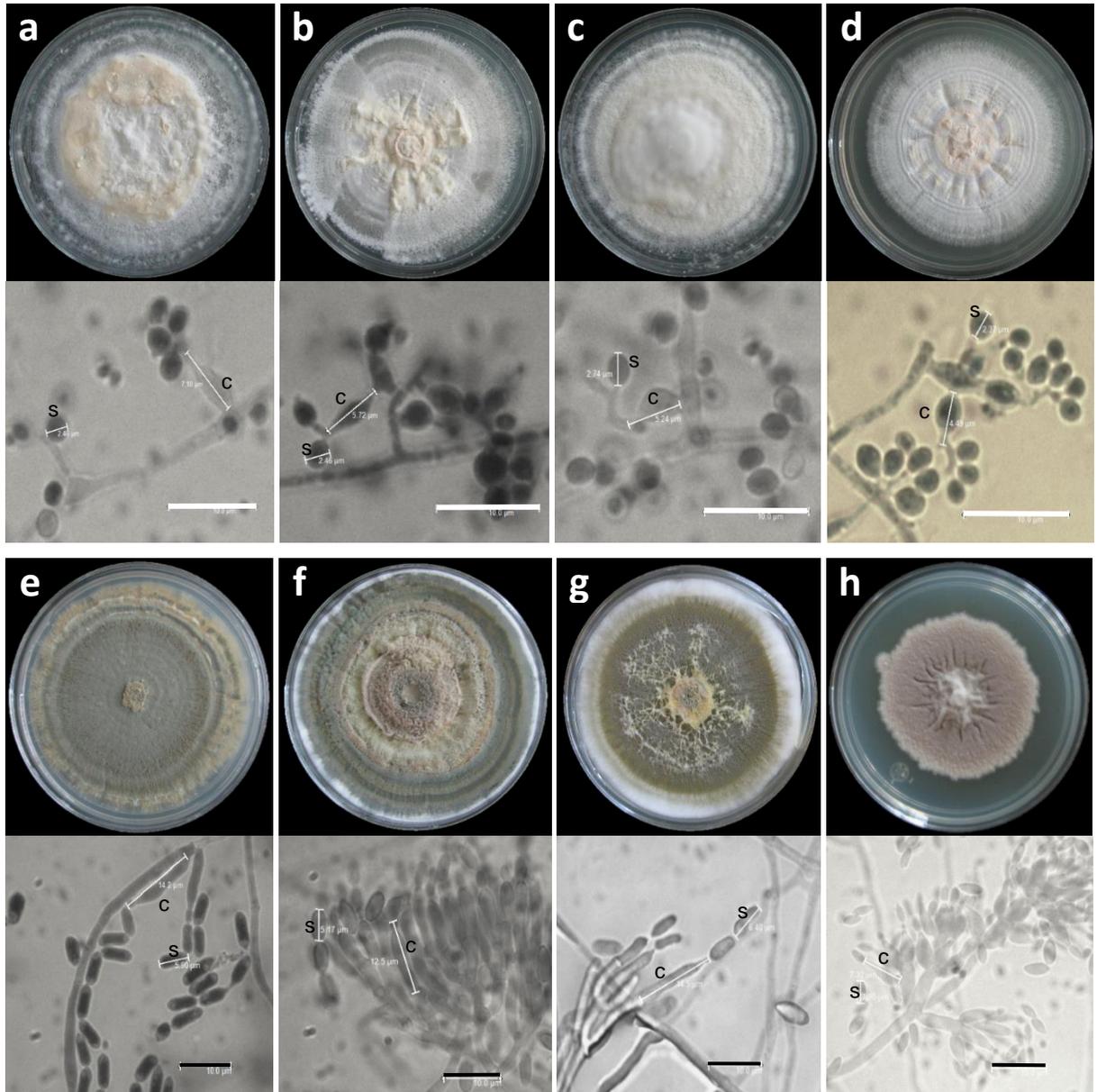
The nucleotide sequence of the ITS rDNA of eight strains were compared using GenBank database. Blast confirmed that species correspond to *B. bassiana*, *M. anisopliae* and *I. javanica*, with similarities ranging from 96 to 99% (Table 1). In our study, obtaining ITS sequences of rDNA and comparison with the GenBank database were sufficient to clarify the species identified morphologically.

### **Conclusion**

Morphological and molecular characteristics obtained in this study were needed to obtain a precise identification for *B. bassiana*, *M. anisopliae* and *I. javanica* species in order to be used in future studies as biocontrol agents for the sugarcane borers distributed in Sinaloa.

## **Acknowledgment**

We thank CONACyT-Mexico for the scholarship (357687), and Dr. Victor M. Hernández-Vazquez and Agrobiológicos del Noroeste S.A. de C.V. for providing strains. We are thankful to PhD. Clara I. Saldamando-Benjumea and Laboratorio de Biotecnología Ambiental team CBG-IPN for support in genetics analysis. The microscopy study was done in the microscopy laboratory of CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa. This research was funded through the multidisciplinary project IPN-SIP 20150084.



**Fig. 1.** PDA colonial growth and morphological structures of conidial strains of *Beauveria bassiana* (a - d), *Metarhizium anisopliae* (e – g), and *Isaria javanica* (h). (s) Spores, (c) Conidiogenous cell, scale bars correspond to 10 μm.

**Table 1.** List of strains, insect host, geographic origin and GenBank datas used to morphologic and molecular characterization of entomopathogenic fungi from two Mexican collections.

Species/ strain <sup>a</sup>	Insect host	Geographic origin	GenBank <sup>b</sup>			
			Bp	Acc. num.	Blast	Similarity (%)
UAMHPI-139	<i>Diatraea magnifactella</i> Dyar	Morelos	516	KX196309	KF359944	99
ABNB6	<i>Hipotenemus hamphei</i> (Ferrari)	ITAO, Oaxaca	519	KX196303	KR998515	99
ABNB8	<i>Geraeus seniles</i> (Gyllenhal)	Quesería, Colima	297	KX196304	JQ320361	98
ABNB12	<i>Phyllophaga</i> sp	Chapala, Jalisco	358	KX196305	KU158456	99
<i>Metarrhizium anisopliae</i>						
ABNM1	<i>Aeneolamia postica</i> (Walker)	San Rafael, Q. Roo	548	KX196306	KF766520	99
ABNM6	<i>Diatraea grandiosella</i> Dyar	Quesería, Colima	371	KX196307	KU170595	96
ABNM7	<i>Diatraea magnifactella</i> Dyar	Quesería, Colima	482	KX196308	JN256675	99
<i>Isaria javanica</i>						
UAMHPI-210	<i>Diatraea magnifactella</i> Dyar	Morelos	509	KX196310	EF990131	98

<sup>a</sup> Strain codes, UAMHPI = strains from Universidad Autónoma del Estado de Morelos, ABN = strains from Agrobiológicos del Noroeste S.A. de C.V.

<sup>b</sup> Nucleotide sequences datas of internal transcribed spacer of rDNA.

**Table 2.** Morphological and molecular analysis of entomopathogenic strains from two Mexican collections<sup>a</sup>.

Species/ strain	Conidia ( $\mu\text{m}$ ) <sup>b</sup>		Conidiogenous cells ( $\mu\text{m}$ ) <sup>b</sup>		Growth rate (mm/day) <sup>b</sup>
	Length	Width	Length	Width	
<b><i>Beauveria bassiana</i></b>					
UAMHPI-139	2.74 ± 0.31 <sup>a</sup>	2.23 ± 0.23 <sup>a</sup>	6.30 ± 1.47 <sup>a</sup>	2.18 ± 0.34 <sup>a</sup>	2.25 ± 0.21 <sup>b</sup>
ABNB6	2.31 ± 0.22 <sup>b</sup>	1.92 ± 0.22 <sup>c</sup>	4.44 ± 0.80 <sup>b</sup>	2.34 ± 0.39 <sup>a</sup>	2.05 ± 0.30 <sup>b</sup>
ABNB8	2.63 ± 0.29 <sup>a</sup>	2.12 ± 0.22 <sup>ab</sup>	5.71 ± 0.66 <sup>a</sup>	2.16 ± 0.34 <sup>a</sup>	2.62 ± 0.13 <sup>a</sup>
ABNB12	2.60 ± 0.29 <sup>a</sup>	2.00 ± 0.27 <sup>bc</sup>	5.74 ± 1.35 <sup>a</sup>	2.26 ± 0.29 <sup>a</sup>	2.27 ± 0.20 <sup>b</sup>
<b><i>Metarrhizium anisopliae</i></b>					
ABNM1	6.24 ± 0.67 <sup>a</sup>	2.49 ± 0.14 <sup>b</sup>	9.99 ± 1.66 <sup>a</sup>	2.29 ± 0.33 <sup>a</sup>	2.70 ± 0.40 <sup>a</sup>
ABNM6	5.80 ± 0.61 <sup>b</sup>	2.40 ± 0.18 <sup>b</sup>	8.63 ± 1.25 <sup>b</sup>	2.24 ± 0.20 <sup>a</sup>	2.93 ± 0.23 <sup>a</sup>
ABNM7	6.25 ± 0.80 <sup>a</sup>	2.64 ± 0.27 <sup>a</sup>	10.22 ± 2.35 <sup>a</sup>	1.93 ± 0.28 <sup>b</sup>	3.03 ± 0.17 <sup>a</sup>
<b><i>Isaria javanica</i></b>					
UAMHPI-210	4.20 ± 0.59	1.73 ± 0.27	7.32 ± 1.38	1.98 ± 0.40	2.07 ± 0.33

<sup>a</sup> Cultivated on PDA solid medium. Fungi were mounted in lactic acid cotton blue and measured from images taken at 100x in a digital camera.

<sup>b</sup> Mean values (n = 30 independent measurements of conidia and conidiogenous cell for each strain, and 5 replicates were made for growth rate). Values of each morphological measurement and growth rate in a column followed by the same letter are not significantly different at  $P < 0.05$  (ANOVA and Tukey's multiple comparison test).

## References cited

- Brunner-Mendoza, C., H. Navarro-Barranco, M.A. Ayala-Zermeño, M.A. Mellín-Rosas, and C. Toriello. 2013. Obtención y caracterización de cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) para genotipificación, pp. 52-55. *In* XXXVI Congreso Nacional de Control Biológico, Oaxaca, México.
- De Hoog, G.S. 1972. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. *Studies in Mycology* 1: 1-41.
- Gallou, A., M.G. Serna-Domínguez, A.M. Berlanga-Padilla, M.A. Ayala-Zermeño, M.A. Mellín-Rosas, R. Montesinos-Matias, and H.C. Arredondo-Bernal. 2016. Species clarification of *Isaria* isolates used as biocontrol agents against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in Mexico. *Fungal Biol.* 120: 414-423.
- Hernández, V.M., and R. Lezama. 2004. Uso de entomopatógenos para el control biológico de barrenadores del tallo, pp. 37-45. *In* L.A. Rodríguez-del-Bosque, G. Vejar-Cota and E. Cortéz-Mondaca, (eds.), Taller internacional sobre barrenadores del tallo de caña de azúcar, Sociedad Mexicana de Control Biológico. Los Mochis, Sinaloa, México.
- Humber, R.A. 2012. Identification of entomopathogenic fungi, pp. 152-187. *In* L.A. Lacey [ed.], *Manual of techniques in invertebrate pathology*. Academic Press, London.
- Inglis, G.D., J. Enkerly, and M.S. Goettel. 2012. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales, pp. 189-253. *In* L.A. Lacey [ed.], *Manual of techniques in invertebrate pathology*. Academic Press, London.
- Jackson, C.W., J.B. Heale, and R.A. Hall. 1985. Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. *Ann. Appl. Biol.* 106: 39–48.

- Jensen, W.A. 1962. Botanical histochemistry (principles and practice), pp. 72-74. San Francisco and London, W.H. Freeman and Company.
- Kulu, I.P., A.L. Abadi, A. Afandhi, and Nooraidawati. 2015. Morphological and molecular identification of *Beauveria bassiana* as entomopathogen agent from Central Kalimantan Peatland, Indonesia. Int. J. Chem.Tech. Res. 8: 2079-2084.
- Padmavathi, J., K.U. Devi, and U.M. Rao. 2003. The optimum and tolerance pH range is correlated to colonial morphology in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* – a potential biopesticide. World J. Microb. Biot. 19: 469-477.
- Raeder, U., and P. Broda. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Lett. Appl. Microbiol. 1: 17-20.
- Rodríguez-Del-Bosque, L.A., and G. Vejar-Cota. 2008. Barrenadores del tallo (Lepidoptera: Crambidae) del maíz y caña de azúcar, pp. 9-22. In H.C. Arredondo-Bernal and L.A. Rodríguez del Bosque [eds.], Casos de control biológico en México. Editorial Mundi-Prensa, México-España.
- Rodríguez del Bosque, L.A., G. Vejar-Cota, I. Vásquez-López, J.A. Villanueva-Jiménez, J. López-Collado, R. Alatorre-Rosas, and F. Hernández-Rosas. 2014. Plagas, pp. 147-186. In H. Mata-Vázquez, L.A. Rodríguez del Boque, V.H. Rodríguez-Morelos and E. Vázquez-García, [eds.]. Manejo integral de caña de azúcar, SAGARPA-INIFAP-UANL.
- Samson, R.A. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. Studies in Mycology 6: 1-119.
- SAS Institute. 2009. STAT/SAS User's Guide, release 9.0. ed. SAS Institute, Cary, NC.

- Schoch, C.L., K.A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J.L. Spouge, C.A. Levesque, W. Chen, and Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109: 6242-6246.
- Shahid, A.A., A.Q. Rao, A. Bakhsh, and T. Husnain. 2012. Entomopathogenic fungi as biological controllers: New insights into their virulence and pathogenicity. *Arch. Biol. Sci. Belgrade* 64: 21-42.
- Shimazu, M. and J. Takatsuka. 2010. *Isaria javanica* (anamorphic Cordycipitaceae) isolated from gypsy moth larvae, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae), in Japan. *Appl. Entomol. Zool.* 45: 497-504.
- Tangthirasunun, N. S. Poeaim, K. Soyong, P. Sommartya, and S. Popoonsak. 2010. Variation in morphology and ribosomal DNA among isolates of *Metarhizium anisopliae* from Thailand. *J. Agric. Techol.* 6: 317-329.
- Torres de la C. M., M.H. Cortez, G.C.F. Ortiz, G.S. Cappello, P.A. De la Cruz. 2013. Caracterización de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad hacia *Aeneolamia postica* en Tabasco, México. *Rev. Colom. Entomol.* 39: 40-46.
- Vejar-Cota, G., C. García-Gutiérrez, N.M. Rosas-García, L.A. Rodríguez-Del-Bosque, and C.I. Saldamando-Benjumea. 2016. Identificación morfológica y molecular de barrenadores del tallo de la caña de azúcar distribuidos en Sinaloa. *Southwest. Entomol.* 40: 153-162.
- Vélez-Arango, P.E., M.N. Estrada-Valencia, M.T. González-García, A.M. Valderrama-Fonseca, and A.E. Bustillo-Pardey. 2001. Caracterización de aislamientos de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 62: 38-53.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J.W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. *In* M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White [eds.], PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, New York.



31Oct16

Estimado Dr. García-Gutiérrez: su manuscrito titulado 'Morphological and Molecular Characterization of Entomopathogenic Fungi with Potential to Control Sugarcane Borers (Lepidoptera: Crambidae) in Sinaloa' de los autores Guadalupe Vejar-Cota, Cipriano García-Gutiérrez, Ninfa M. Rosas-García, Cesar M. Escobedo-Bonilla, and Héctor A. González-Ocampo, ha sido recibido para revisión de pares en la revista *Southwestern Entomologist*. Dentro de pocas semanas le informarán sobre los comentarios que revisores anónimos le harán a su trabajo.

Sin más por el momento reciba un afectuoso saludo y le agradecemos su interés de publicar su interesante trabajo en nuestra revista.

Atentamente,

*Carlos A. Blanco*

Carlos A. Blanco, Editor asociado

[Carlos.a.blanco@aphis.usda.gov](mailto:Carlos.a.blanco@aphis.usda.gov) / [carlos.blanco1206@gmail.com](mailto:carlos.blanco1206@gmail.com) /

[cblancom@unm.edu](mailto:cblancom@unm.edu)

Cc. Dr. Bonnie Pendleton, Editor-in-Chief

# Capítulo IV

---

Manuscrito del tercer artículo

## EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS CONTRA EL BARRENADOR DEL TALLO DE CAÑA DE AZÚCAR *Diatraea considerata* HEINRICH EN CAMPO.

### Resumen

Se evaluaron diecinueve cepas de hongos entomopatógenos (HE) (Hypocreales: Clavicipitaceae) de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Metarhizum anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin e *Isaria javanica* (Friederichs & Bally) Samson & Hywel-Jones en laboratorio y campo contra el barrenador de la caña de azúcar *D. considerata* Heinrich (Lepidoptera: Crambidae) en larvas de primero, segundo y tercer instar. Las diecinueve cepas fueron patogénicas con mortalidades de larvas de 58.2 a 98.8%. Las mejores cepas nativas fueron la CIDSB09 de *B. bassiana* y la CIDSM01 de *M. anisopliae*, y la mejor cepa exótica fue UAMHPI-031 de *M. anisopliae*. En los bioensayos de virulencia se determinó una CL<sub>50</sub> de  $1.43 \times 10^7$  y  $3.6 \times 10^7$  conidias/ml en las cepas CIDSB09 y CIDSM01, mientras que la cepa UAMHPI-031 presentó una CL<sub>50</sub> de  $9.28 \times 10^6$  conidias/ml. Los tiempos letales, de micosis y de esporulación de las cepas CIDSB09, CIDSM01 y UAMHPI-031 fueron similares entre éstas. Estas cepas fueron evaluadas en un campo experimental de caña de azúcar (940.50 m<sup>2</sup>), ciclo soca. Los tratamientos aplicados fueron CIDSB09, CIDSM01, UAMHPI-031 y sin aplicación (testigo). Se usó un diseño en bloques completos al azar con 4 réplicas a una dosis  $>2.02 \times 10^7$  conidias/ml. A los 15 días postratamiento se observaron larvas micosadas (>2%), y no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de daño de plantas y canutos. El menor daño se observó con CIDSM01, sin embargo, es necesario mejorar la aplicación de los hongos entomopatógenos en caña para lograr el control biológico de barrenadores en campo.

## Introducción

El barrenador del tallo *D. considerata* Heinrich (Lepidoptera: Crambidae) es una de las plagas más importante del cultivo de caña de azúcar en México, y su distribución incluye a los estados de Colima, Jalisco, Nayarit, Michoacán y Sinaloa; otras especies de menor importancia en Sinaloa son *D. grandiosella* Dyar y *E. loftini* (Dyar), pero que en conjunto pueden alcanzar daños de consideración (Rodríguez del Bosque *et al.*, 2014, Vejar-Cota *et al.*, 2016). Las pérdidas en producción ocasionadas por el barrenador varían de 2 a 10 ton de caña por ha durante una zafra, lo que produce pérdidas económicas de 100 millones de pesos en 25 mil ha de cultivo cada año (Rodríguez-Del-Bosque y Vejar-Cota, 2008). Para el control del barrenador se han evaluado diversas estrategias que incluyen el uso de variedades tolerantes (Rodríguez del bosque *et al.* 2014), remoción manual del meristemo apical dañado durante el crecimiento inicial de la planta (Vejar-Cota *et al.*, 2008), liberación y establecimiento de parasitoides (Vejar-Cota *et al.*, 2005a, b) y la aplicación de insecticidas; sin embargo los resultados observados para mitigar su efecto han sido insuficientes (Rodríguez-Del-Bosque y Vejar-Cota, 2008). En los últimos 20 años, el uso de parasitoides ha sido la principal herramienta para el control de barrenadores (Rodríguez-Del-Bosque y Vejar-Cota, 2008); sin embargo sus resultados han sido poco alentadores, lo que ha obligado continuar la búsqueda de alternativas de control. Uno de los agentes de control biológico poco explorados son los entomopatógenos (Hypocreales: Clavicipitaceae), principalmente los hongos de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria* por lo que el interés en su utilización se ha intensificado durante los últimos 25 años (Hernández y Lezama, 2004). Estos hongos se han usado ampliamente como agentes de control biológico para ciertos insectos plaga (Lacey *et al.*, 2001; Charnley y Collins, 2007). En una revisión de los patógenos asociados a los barrenadores del género *Diatraea* en América, incluyendo a los hongos, se señala que debido a que éstos tienen una amplia variación genética entre los diferentes aislados, es necesario evaluar la mayor cantidad de aislados geográficos como sean posible y de diferentes áreas para seleccionar al más adecuado basado en su virulencia y crecimiento a altas temperaturas (Hernández-Velásquez *et al.*, 2012).

Algunos estudios de laboratorio con barrenadores de la caña de azúcar señalan la susceptibilidad a diferentes cepas de hongos. Svedese *et al.* (2013) evaluaron la patogenicidad de diez aislados de *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin en larvas de *D. saccharalis* (F.), encontrando una mortalidad que varió de 36 a 88% con una suspensión de  $1 \times 10^8$  conidias/ml. Por otro lado, Legaspi *et al.* (2000) evaluó la virulencia de la cepa GHA de *B. bassiana* usando cinco dosis ( $\approx 3$  a 872 esporas/mm<sup>2</sup>) en larvas del primero, segundo y tercer instar de *E. loftini* y *D. saccharalis*, encontrando una relación inversa entre el instar larval y la susceptibilidad en cada especie, excepto el segundo instar de *E. loftini*. Castro-Ortega *et al.* (2013) evaluaron cepas de *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin en larvas de *D. magnifactella* Dyar, sobresaliendo la cepa Ma156 con el 93.3% de mortalidad usando  $1 \times 10^8$  conidias/ml. La selección de la cepa bajo condiciones de laboratorio con la mayor patogenicidad y buena producción conidial son características fundamentales para ser usadas para el control biológico de plagas (Svedese *et al.*, 2013).

Los estudios de campo para evaluar entomopatógenos en barrenadores de la caña de azúcar son escasos. Lezama-Gutiérrez *et al.* (2012) encontraron una reducción significativa de plantas dañadas al evaluar nueve cepas de *M. anisopliae* en plantas infestadas con *D. magnifactella* en campo. Estos autores señalan una disminución del 90.2% de plantas dañadas con la cepa Ma 181 a una dosis de  $1 \times 10^8$  conidias/ml con 6 aplicaciones durante la primera etapa de crecimiento de la caña. Por otro lado, Legaspi *et al.* (2000) no encontraron resultados significativos que disminuyeran los daños ocasionados por *E. loftini*, al evaluar *B. bassiana* (GHA) a una dosis de  $5 \times 10^{13}$  esporas/ha, sugiriendo la necesidad de mejorar la tecnología para la liberación de hongos entomopatógenos en campo.

A pesar de lo anterior, existen pocos estudios de patogenicidad y virulencia en barrenadores de la caña de azúcar, así como su evaluación en campo, por lo que el objetivo de este trabajo fue: realizar pruebas de laboratorio y campo con hongos entomopatógenos nativos y exóticos contra el barrenador del tallo *D.*

*considerata*, como parte de la búsqueda de nuevas opciones para el control biológico de barrenadores en Sinaloa.

## **Materiales y métodos**

### **Colecta y cría del barrenador**

La cría del barrenador se estableció con 248 larvas de *D. considerata* colectadas en campos de caña de azúcar de la zona norte del Estado, durante los meses de agosto a octubre de 2014. Las larvas se alimentaron con dieta artificial modificada hasta obtener los adultos (Badilla *et al.*, 1994). Previo a la eclosión, los huevos fueron transferidos a charolas de plástico con capas de hojas de maíz intercaladas con papel secante hasta la obtención de larvas. Las larvas neonatas fueron mantenidas hasta la realización de los bioensayos. Las larvas que no se utilizaron para los pruebas se transfirieron a cajas Petri de plástico (6.0 cm de diámetro) con 1 cm<sup>3</sup> de dieta artificial para el mantenimiento de la colonia.

### **Obtención y reactivación de cepas**

Se usaron 19 cepas de hongos entomopatógenos (HE) de tres colecciones de México, 10 nativas de Sinaloa y 9 de otros estados del país (exóticas) donadas a la colección de hongos del Laboratorio de Bioinsecticidas del CIIDIR Sinaloa (Tabla 1). Para la reactivación de las cepas, estas fueron crecidas en medio de cultivo sólido PDA, extracto de levadura al 1%, y 5 mg/l de cloranfenicol y mantenidas por 21 días a temperatura ambiente (Inglis *et al.*, 2012). Las conidias fueron cosechada en 10 ml de Tween 80 al 0.25% y utilizadas para la inoculación de larvas del cuarto o quinto instar del barrenador de la caña de azúcar *D. considerata* de acuerdo a la metodología de Lezama (1994). Para la reactivación de las cepas, las larvas se sumergieron por un min a una suspensión de  $1 \times 10^8$  esporas/ml, y posteriormente se colocaron en cajas Petri de 9 cm de diámetro acondicionadas con papel filtro

húmedo. Las larvas muertas por el hongo (4 – 5 días), se desinfectaron (hipoclorito de sodio al 0.5% 1 min, agua destilada estéril 1 min), se colocaron en cámaras húmedas nuevas y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la esporulación. A partir de las larvas esporuladas se tomaron conidias con un asa bacteriológica y se sembraron en nuevas cajas Petri con medio de cultivo sólido PDA + extracto de levadura al 1% + ácido láctico (10%) por 15 días. Las cepas reactivadas se mantuvieron en refrigeración a 5 °C hasta su uso.

## **Bioensayos**

Para las pruebas de patogenicidad se usaron larvas de primero, segundo y tercer instar de *D. considerata*. Las suspensiones se prepararon cosechando la placa completa de cada cepa en 10 ml de Tween 80 al 0.25% y vortex por 1 min, obteniendo de  $1.0 \times 10^8$  a  $4.0 \times 10^9$  conidias/ml. Se usó una hoja tierna de maíz de 4 x 3 cm, la cual se sumergió en la suspensión fúngica por un min y posteriormente se dejó secar en papel absorbente (Castro-Ortega *et al.*, 2013). Cada trozo de hoja se colocó en una caja Petri (9.0 cm de diámetro) preparada con papel filtro humedecido con 0.6 ml de agua destilada. A cada caja se le depositaron 5 larvas de acuerdo al instar en evaluación. Se realizaron cuatro réplicas de 20 individuos por cada instar (80 larvas por tratamiento). Después de 48 h, cada larva fue transferida a cajas Petri de 6.0 cm de diámetro con 1 cm<sup>2</sup> de dieta artificial y selladas con plástico adherente. La mortalidad y el tiempo letal promedio se registraron a los 2, 4, 7 y 9 días post-tratamiento. Todos los individuos muertos se separaron y se conservaron en condiciones húmedas para verificar la micosis.

Para las pruebas de virulencia, se seleccionaron las cepas nativas y exóticas que mostraron mayor porcentaje de mortalidad y el menor tiempo letal promedio. Se prepararon diluciones seriadas de  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^8$  + Tween 80 al 0.25%. Para la exposición de larvas a cada suspensión se usó la misma metodología descrita anteriormente. Se usaron larvas de 1 a 3 días de edad en tres réplicas de 20 individuos (60 larvas por dilución). Las observaciones se hicieron diariamente por

10 días, registrando los días acumulados a la muerte, micosis y esporulación, con lo cual se determinó la concentración letal (CL<sub>50</sub>), tiempo letal (TL<sub>50</sub>), tiempo micosis (TM<sub>50</sub>), y tiempo esporulación (TE<sub>50</sub>).

Para cada ensayo se registró el número de conidias/ml y el porcentaje de viabilidad. El control fue agua destilada con Tween 0.25% y se utilizó para corregir la mortalidad natural (Abbott, 1925). Cada réplica de los ensayos descritos anteriormente se realizó en días diferentes usando preparaciones frescas de las cepas. Las cajas Petri con las larvas en estudio se mantuvieron a temperatura ambiente (26 - 27 °C).

### **Producción de esporas**

El producto de hongos entomopatógenos para las aplicaciones de campo se elaboró siguiendo el procedimiento estandarizado del laboratorio de Bioinsecticidas del CIIDIR Sinaloa mediante fermentación bifásica (García-Gutiérrez *et al.*, 2006, Jaronski y Jackson, 2012). El inóculo para la fermentación sólida de los HE (arroz) se elaboró en fermentación líquida mediante el siguiente procedimiento: en matraces de 500 ml se agregó medio de cultivo a base de melaza de caña de azúcar como fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales minerales (melaza 4.35 ml, [NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 1.8 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.05 g, MgSO<sub>4</sub> 0.15 g, NaCl 0.03 g, CaCl<sub>2</sub> 0.03 g, agua destilada 300 ml), se agregó 10% de inóculo (se cortaron con un sacabocados, cinco círculos de esporas de 1 cm de una placa de hongo esporulada) y se mantuvo en agitación constante a 180 rpm, 28 °C por 2-3 días hasta alcanzar una producción de 1x10<sup>7</sup> blastosporas/ml. Para la fermentación sólida, se usaron 20 ml del producto de la fermentación líquida en 300 g de arroz lavado y esterilizado en bolsas de plástico de alta densidad. Después de 10 días de incubación en un gabinete de crecimiento a temperatura ambiente (26 – 28 °C), el arroz con las esporas se puso a secar por 5 días en un cuarto de secado bajo condiciones de laboratorio. Se calculó la cantidad de esporas por gramo (esporas + arroz) mediante diluciones

seriadas de una muestra de 1 g. El producto se mantuvo en refrigeración a 5 °C por un mes y previo a su uso en las aplicaciones de campo se determinó la viabilidad.

## **Pruebas de campo**

El estudio se llevó a cabo de mayo a septiembre de 2016 en un campo de caña de azúcar de la variedad “CP 72-2086” en ciclo soca establecida en el campo experimental del CIIDIR Unidad Sinaloa (25°32'46.25"N, 108°28'54.96"O). Para el manejo agronómico del cultivo se usaron las prácticas locales recomendadas (Sánchez, 1990). El experimento en campo consistió en 19 surcos de 1.5 m de ancho por 33 m de largo (940.50 m<sup>2</sup>). El campo fue dividido en 16 unidades experimentales (3 tratamientos y 1 testigo con 4 réplicas). Cada unidad experimental consistió en 4 surcos por 6 m de largo (36 m<sup>2</sup>). Las áreas de separación entre unidades experimentales consistieron de 3 m sin caña. Para la aplicación de los tratamientos se usó una aspersora manual modelo 501350 (Swissmex®). Se usó una boquilla cónica para la aplicación con una presión constante de 87 psi en cada fecha de aplicación. Los tratamientos consistieron en las cepas más patogénicas nativas (*B. bassiana* y *M. anisopliae*), una cepa exótica (de referencia) y un control sin aplicación. Todos los tratamientos fueron disueltos en agua con el surfactante SuperDasp® (Agrícola Innovación S.A. de C.V., México, D.F.). Para asegurar la presencia de *D. considerata* en el área experimental (60 km del área cañera), se realizaron infestaciones artificiales de larvas de 1 a 3 días de desarrollo, previo a la aplicación de los tratamientos. Se depositaron 50 larvas vivas en la parcela útil (2 surcos centrales) de cada unidad experimental ( $n = 200$  larvas por tratamiento/fecha). La infestación se hizo por la mañana mientras que la aplicación se llevó a cabo por la tarde. Las infestaciones y aplicaciones se realizaron el 17 junio, 8 julio y 10 agosto de 2016.

El muestreo de daño por el barrenador se realizó en dos etapas. La primera durante los primeros 4 meses de edad (tres muestreos) y la segunda a partir del inicio de formación de tallos (tres muestreos). En la primera etapa se determinó la

cantidad de plantas dañadas (meristemo apical seco) en los 2 surcos centrales de cada unidad experimental. Para la segunda etapa, se tomaron 10 tallos al azar por unidad experimental, se cortaron longitudinalmente por la mitad y se contó el número de canutos dañados. Se registró en forma conjunta el daño ocasionado por la larva del barrenador como el originado por enfermedades (muermo rojo). En todos los casos, se diferenciaron los daños por especie de barrenador (Rodríguez del bosque *et al.*, 2014) y las larvas muertas encontradas durante los muestreos fueron confinadas en cámaras húmedas para revisar la micosis.

### **Porcentaje de viabilidad y concentración de esporas**

Para determinar el porcentaje de viabilidad de las cepas usadas en todas las pruebas se tomó una asada del cultivo y se resuspendió en 0.3 ml de Tween 80 al 0.25%. Para determinar el porcentaje de viabilidad, la suspensión de esporas se dispersó en una caja Petri (9.0 cm de diámetro) con una capa de PDA (12 ml) y se incubó a 26 °C por 24 h. Posteriormente se cortó con un bisturí un centímetro cuadrado del medio y se colocó sobre un portaobjetos. Se revisaron tres campos con un microscopio Carl Zeiss Primo Star® (400X) y se contabilizó la germinación en 100 esporas en total. Se consideró espora germinada a aquella que presentó el tubo germinativo de igual o mayor tamaño que la longitud de la conidia. Para determinar la concentración de las esporas, en la suspensión madre de cada cepa, se hicieron diluciones seriadas de  $1 \times 10^8$  hasta  $1 \times 10^6$ , posteriormente se tomaron 15  $\mu$ l y se colocaron en una cámara de Neubauer (Inglis *et al.*, 2012).

### **Análisis de datos**

Para las pruebas de patogenicidad y virulencia en laboratorio se usó un diseño completamente al azar con cuatro y tres replicas respectivamente. Se usó un análisis de varianza (ANOVA,  $\alpha = 0.05$ ) para comparar los datos del porcentaje de mortalidad y el tiempo letal promedio de cada instar. Para analizar la interacción

entre cepas e instares se usó un análisis factorial (instares y cepas). Previo al análisis de varianza, los datos de mortalidad y tiempo letal promedio se transformaron al arco seno de la raíz cuadrada para normalizarlos. Se usó el análisis Probit para estimar la concentración letal ( $CL_{50}$ ), tiempo letal ( $TL_{50}$ ), tiempo de micosis ( $TM_{50}$ ) y tiempo de esporulación ( $TE_{50}$ ) para cada una de las cepas mediante el programa PoloPlus V.1 (LeOra Software, 2002). La virulencia relativa de las cepas nativas fue calculada mediante la división de la  $CL_{50}$  de la cepa exótica (referencia) entre la  $CL_{50}$  de la cepa nativa (Robertson *et al.*, 2007).

Para las pruebas de campo se usó un diseño en bloques completamente al azar con cuatro réplicas. Los datos de campo (porcentaje de plantas dañadas y porcentaje de canutos dañados) fueron transformados al arco seno de la raíz cuadrada para normalizarlos y se usó un análisis de varianza (ANOVA,  $\alpha = 0.05$ ). Para determinar diferencias significativas entre las medias se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) mediante el programa SAS v.9 (SAS Institute 2009).

## Resultados y discusión

### Bioensayos de patogenicidad

Todas las cepas usadas en este estudio fueron patogénicas para las larvas de *D. considerata* (Fig. 1). Los resultados de mortalidad de cada cepa en cada instar se muestran en la Tabla 2. No se encontraron diferencias significativas en la interacción instar/cepa ( $F = 1.33$ ,  $gl = 36$ ,  $p = 0.1187$ ); no obstante, se presentó efecto significativo entre las cepas ( $F = 8.25$ ,  $gl = 18$ ,  $p < 0.0001$ ) y los instares ( $F = 13.96$ ,  $gl = 2$ ,  $p < 0.0001$ ), lo que significa que al menos una de las cepas es diferente a las demás, al igual que en los instares. La mortalidad varió dependiendo de la cepa y el instar de 58.2 a 98.8% (Tabla 2). Las cepas nativas con mayor mortalidad fueron la CIDSB09 de *B. bassiana* (90.7%) y la CIDSM01 de *M. anisopliae* (97.0%), mientras que la cepa exótica con mayor mortalidad fue UAMHPI-031 de *M.*

*anisopliae* (98.2%) ( $\alpha = 0.05$ ). El tercer instar fue más susceptible a la infección de las diferentes cepas ( $\alpha = 0.05$ ) con respecto a los instares anteriores. Estudios realizados con diferentes especies de barrenadores mostraron que son susceptibles a la infección por *B. bassiana* (Legaspi *et al.*, 2000; Svedese *et al.*, 2013) y *M. anisopliae* (Castro-Ortega *et al.*, 2013) como se encontró en este estudio. Contrario a lo observado por Legaspi *et al.* (2000), las larvas del tercer instar fueron más susceptibles a la infección por los hongos entomopatógenos estudiados (Tabla 2), esto debido a su movimiento que propicia un mayor contacto con las unidades infectivas, ya que se observó un consumo rápido de las hojas de maíz tratadas con los hongos.

Con respecto al tiempo letal promedio, no se encontraron diferencias significativas en la interacción instar/cepa ( $F = 1.31$ ,  $gl = 36$ ,  $p = 0.1325$ ) al igual que entre instares ( $F = 0.33$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0.7220$ ); sin embargo, se presentó efecto significativo entre las cepas ( $F = 5.04$ ,  $gl = 18$ ,  $p < 0.0001$ ), lo que significa que al menos una cepa tuvo el tiempo letal diferente, pero no entre los instares. El tiempo letal promedio varió de 3.30 a 5.81 días, dependiendo de la cepa o el instar evaluado (Tabla 3). Las cepas nativas con el mejor tiempo letal promedio fue CIDSB09 de *B. bassiana* (4.26 días) y la CIDSM01 de *M. anisopliae* (3.73 días), mientras que la cepa exótica con el mejor tiempo letal promedio fue la UAMHPI-031 de *M. anisopliae* (3.51 días), coincidiendo con la mejor mortalidad (Tabla 2). Tiempos similares con *B. bassiana* fueron encontrados por Arcas *et al.* (1999) en *D. saccharalis* (4.3 días), mientras que Legaspi *et al.* (2000) determinaron 3.8 a 4.3 días para *E. loftini* y 4.6 a 6.4 días para *D. saccharalis*.

Considerando los resultados de los porcentajes de mortalidad y el tiempo letal promedio (Tablas 2 y 3), se seleccionó como mejor cepa nativa de *B. bassiana* a la CIDSB09 y la mejor cepa nativa de *M. anisopliae* a la CIDSM01. La mejor cepa exótica fue la UAMHPI-031 de *M. anisopliae*, por esta razón se usó como referencia para comparar las cepas nativas.

## Bioensayos de virulencia

Los resultados de virulencia, incluyendo la  $CL_{50}$ ,  $TL_{50}$ ,  $TM_{50}$  y  $TE_{50}$  mediante el análisis Probit de los datos acumulados se muestran en la Tabla 4. La cepa UAMHPI-031 de *M. anisopliae* fue la más virulenta en larvas de 1 a 3 días de edad de *D. considerata* con  $9.28 \times 10^6$  conidias/ml, seguida de la cepa CIDSB09 y CIDSM01 con  $1.43 \times 10^7$  y  $3.6 \times 10^7$  conidias/ml, respectivamente. De acuerdo con Robertson *et al.* (2007), la cepa CIDSB09 fue 1.54 veces menos virulenta, mientras que la cepa CIDSM01 fue 3.88 veces menos virulenta, ambas con respecto a la cepa UAMHPI-031, lo que permite la selección de cepas para su uso en programas de control biológico (Charnley y Collins, 2007; Hernández-Velásquez *et al.*, 2012). Castro-Ortega *et al.* (2013) determinaron una  $CL_{50}$  de  $4.3 \times 10^4$  conidias/ml de *M. anisopliae* (cepa Ma 156) en larvas neonatas de *D. magnifactella*, siendo muy inferior a la mejor cepa encontrada en este trabajo (218 veces). En términos generales, los tiempos letales, de micosis y de esporulación fueron similares entre las cepas, considerando los límites de confianza 95% (Butt y Goettel, 2000) (Tabla 4).

## Producción de esporas

Se obtuvo una producción de  $>2.20 \times 10^9$  conidias/g de arroz en ambas cepas de *M. anisopliae*, y  $3.95 \times 10^8$  conidias/g en *B. bassiana*, con viabilidades  $>90\%$  (Tabla 5, Fig. 1e). No obstante, la menor cantidad de conidias obtenidas en la cepa de *B. bassiana* con respecto a las cepas de *M. anisopliae* sugiere que existen diferentes necesidades nutrimentales y condiciones de crecimiento dependiendo de la especie, por lo que para incrementar la cantidad de conidias es necesario mejorar la tecnología de producción como lo sugieren Jaronski y Jackson (2012). Al respecto, Castrejón-Antonio *et al.* (2013) evaluaron cuatro diferentes medios de cultivo en fermentación líquida para mejorar la producción en arroz; mientras que Ramos-Oseguera *et al.* (2013) usaron diferentes sustratos para la fermentación sólida, encontrando como alternativa al arroz, el uso de maíz molido. La

combinación de resultados de estudios de fermentación bifásica pueden emplearse para buscar mejores condiciones de crecimiento para la producción HE a nivel de laboratorio.

## Pruebas de campo

Previo al estudio en el área experimental, las plantas dañadas encontradas se cortaron y examinaron en laboratorio, observando la presencia natural del barrenador *E. loftini* y posteriormente durante todo el estudio (Fig. 2c). *D. considerata* solo se encontró después de su infestación artificial (Fig. 2d, 3b, 5b); aunque se cita la presencia de tres especies de barrenadores *D. considerata*, *D. grandiosella* y *E. loftini* en las zonas cañeras del Estado (Vejar-Cota *et al.*, 2016). La ausencia de las especies de *Diatraea* en el área experimental se debe a la ausencia de hospederos silvestres, además de la lejanía con la zona cañera (60 km), contrario a *E. loftini*, que tiene mayor cantidad de hospederos silvestres, lo que le permite una mayor distribución (Rodríguez-del-Bosque *et al.*, 1996; Rodríguez-del-Bosque y Pantaleón-Paulino, 2012).

El porcentaje de plantas dañadas (Fig. 2b) durante la primera etapa de la caña (Fig. 2a, e) para cada tratamiento, fecha de muestreo, y especie de barrenador se observan en la Fig. 3. El total de plantas dañadas por barrenador en los tres muestreos de campo fue 404, de las cuales 303 fueron por *E. loftini* (75%) y 101 por *D. considerata* (25%). Los muestreos se realizaron los días 16 junio, 5 julio y 9 agosto de 2016. Durante el primer muestreo, el 100% de las plantas dañadas fue por *E. loftini*, mientras que en el segundo muestreo, ambas especies mostraron porcentajes similares (*D. considerata* = 48%, *E. loftini* = 52%), disminuyendo *D. considerata* en el tercer muestreo (26%) (Fig. 3b), probablemente por un incremento en la población de plantas, en relación a los primeros muestreos. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de plantas dañadas en cada tratamiento en las tres fechas de evaluación (primer muestreo:  $F = 0.07$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.9731$ , segundo muestreo:  $F = 0.85$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.5017$ , tercer muestreo:  $F = 0.16$ ,  $gl = 3$ ,  $p$

= 9123) (Fig. 3a), lo que significa que la aplicación de los tratamientos no se reflejó en una disminución de plantas dañadas por barrenadores. Al separar el porcentaje de plantas dañadas por especie de barrenador, tampoco se encontraron diferencias significativas para *E. loftini* (primer muestreo:  $F = 0.07$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.9731$ , segundo muestreo:  $F = 0.60$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.6313$ , tercer muestreo  $F = 0.22$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.8722$ ) (Fig. 4a), y *D. considerata* (segundo muestreo:  $F = 0.61$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.6273$ , tercer muestreo:  $F = 0.84$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.5063$ ) (Fig. 4b), lo que significa que los tratamientos no disminuyeron los daños por especie de barrenador. A pesar de las tres aplicaciones de hongos entomopatógenos, solo 2 larvas de *D. considerata* (< 2%) se encontraron muertas (Fig. 7d) y con síntomas de micosis (*M. anisopliae*). Existe la posibilidad que la micosis este subestimada debido a que muchas larvas infectadas (especialmente las pequeñas) escapan a la colecta (Legaspi *et al.*, 2000); sin embargo, la mortalidad de las larvas no se reflejó en una disminución de daños en las plantas.

El porcentaje de canutos dañados durante la etapa de formación y desarrollo de los tallos de la caña (Fig. 2f) para cada tratamiento, fecha de muestreo, y especie de barrenador se observan en la Fig. 5. Los muestreos se realizaron los días 12 agosto, 10 septiembre y 12 octubre de 2016. El total de canutos dañados por barrenador en los tres muestreos de campo fue 427, de las cuales 351 fueron por *E. loftini* (82%) (Fig. 7e) y 76 por *D. considerata* (18%) (Fig. 7f). De manera similar que con las plantas dañadas, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de canutos dañados en cada tratamiento en las tres fechas de evaluación (primer muestreo:  $F = 0.78$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.5364$ , segundo muestreo:  $F = 1.54$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.2699$ , tercer muestreo:  $F = 2.85$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.0977$ ) (Fig. 5a), lo que significa que las aplicaciones durante la etapa de crecimiento no disminuyeron los daños en los tallos. Al separar el porcentaje de canutos dañados por especie de barrenador, tampoco se encontraron diferencias significativas para *E. loftini* (primer muestreo:  $F = 0.78$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.5364$ , segundo muestreo:  $F = 1.07$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.4083$ , tercer muestreo:  $F = 2.62$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.1145$ ) (Fig. 6a), y *D. considerata* (segundo muestreo:  $F = 2.94$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.0915$ , tercer muestreo:  $F = 2.03$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.1807$ ) (Fig. 6b), lo que significa que el daño por cada especie de barrenador fue similar

con respecto al control. La cepa CIDS01 presentó el menor daño acumulado en los canutos (7.92%) con respecto al control (14.0%) (Tabla 7). Resultados similares fueron encontrados por Legaspi *et al.* (2000) al evaluar *B. bassiana* contra *E. loftini* y *D. saccharalis* y no encontrar diferencias significativas entre los tratamientos y el control. Los autores señalan que muchas fallas en la efectividad de los micoinsecticidas en campo se deben a condiciones desfavorables de humedad relativa y temperatura, las cuales son diferentes a las proporcionadas en el laboratorio, sugiriendo que es necesario mejorar la tecnología para la aplicación de hongos entomopatógenos en campo. Otros factores a considerar son la susceptibilidad innata de la plaga, grado de exposición al micoinsecticida, condiciones medioambientales prevalecientes, interacción fisiológica entre el hospedero y el patógeno, producción, formulación y método de aplicación usado (Tanada y Kaya, 1993; Butt y Goettel, 2000).

## **Conclusión**

Los bioensayos de laboratorio demostraron que el barrenador *D. considerata* es susceptible a *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. javanica*, y esto es importante para la selección de cepas con potencial de uso en campo.

En los estudios de campo no se observaron resultados satisfactorios de control con las cepas seleccionadas, ya que las tres aplicaciones en la etapa inicial de crecimiento e inicio de formación de tallos no mostraron una disminución del daño en las plantas y en los canutos. No obstante se observó menor daño en los canutos con el tratamiento CIDS01 con respecto al testigo.

El daño total causados por *E. loftini* y *D. considerata* a los canutos fue 11.3%. Este nivel de daño se considera moderado ya que en las regiones cañeras de Sinaloa el mayor daño (15 a 28%) es causado por *D. considerata* (Rodríguez del Bosque y Vejar-Cota, 2008).

Es necesario mejorar el método de aplicación y cobertura de los hongos entomopatógenos para que sea más evidente su efecto de control biológico de barrenadores en Sinaloa.

### **Agradecimiento**

Se agradece a CONACyT México por la beca (357687), también al equipo del Dr. Héctor M. Cárdenas Cota (Centro de Ciencias de Sinaloa - Universidad Tecnológica de Culiacán) y al equipo de Laboratorio de Bioinsecticidas por el apoyo técnico durante el desarrollo del trabajo. Especial agradecimiento al Dr. Eusebio Nava Pérez, Lic. Nadia Vázquez Montoya, Ing. Enrique Garza G., Ing. Jaziel A. Díaz Chon, Biol. Marina I. García Guajardo e Ing. Irieth A. Alvarado Hernández por el apoyo en los trabajos de laboratorio y campo. Esta investigación fue financiada a través de los proyectos multidisciplinarios IPN-SIP 20140409 y 20150084.

**Tabla 1.** Lista de especies y cepas por origen, insecto hospedero, origen geográfico y número de acceso del GenBank usados para evaluar la patogenicidad y virulencia en larvas de 1 - 3 instar de *D. considerata* en Sinaloa.

Especies/ cepas	Insecto hospedero	Origen geográfico	GenBank <sup>1</sup> Num. acc.	Propietario
<b>Cepas nativas</b>				
<b><i>Beauveria bassiana</i></b>				
CIDSB01	Suelo	Choix, Sin.	KR998503	CIIDIR-SIN
CIDSB02	Suelo	Choix, Sin.	KR998504	CIIDIR-SIN
CIDSB03	Suelo	Choix, Sin.	KR998505	CIIDIR-SIN
CIDSB04	Suelo	Choix, Sin.	KR998506	CIIDIR-SIN
CIDSB06	Suelo	Choix, Sin.	KR998508	CIIDIR-SIN
CIDSB09	Suelo	Choix, Sin.	KR998511	CIIDIR-SIN
CIDSB14	Suelo	Choix, Sin.	KR998516	CIIDIR-SIN
<b><i>Metarhizum anisopliae</i></b>				
CIDSM01	Suelo	Sinaloa de Leyva, Sin.	KR998522	CIIDIR-SIN
CIDSM02	Suelo	Sinaloa de Leyva, Sin.	KR998523	CIIDIR-SIN
CIDSM03	Suelo	Guasave, Sin.	KR998524	CIIDIR-SIN
<b>Cepas exóticas</b>				
<b><i>Beauveria bassiana</i></b>				
UAMHPI-139	<i>Diatraea magnifactella</i>	Morelos	KX196309	UAEM
ABNB6	<i>Hipotenemus hampei</i>	ITAO, Oaxaca	KX196303	Agrobiológicos
ABNB8	<i>Geraeus seniles</i>	Quesería, Colima	KX196304	Agrobiológicos
ABNB12	<i>Phyllophaga sp</i>	Chapala, Jalisco	KX196305	Agrobiológicos
<b><i>Metarhizum anisopliae</i></b>				
UAMHPI-031	<i>Diatraea magnifactella</i>	Morelos	ND	UAEM
ABNM1	<i>Aenolamia postica</i>	San Rafael, Q. Roo	KX196306	Agrobiológicos
ABNM6	<i>Diatraea grandiosella</i>	Quesería, Colima	KX196307	Agrobiológicos
ABNM7	<i>Diatraea magnifactella</i>	Quesería, Colima	KX196308	Agrobiológicos
<b><i>Isaria javanica</i></b>				
UAMHPI-210	<i>Diatraea magnifactella</i>	Morelos	KX196310	UAEM

<sup>1</sup> Secuencia de nucleótidos de los espaciadores internos transcritos del ADN ribosomal.

ND = no disponible.

**Tabla 2.** Porcentaje de mortalidad (Media  $\pm$  EE) de larvas del barrenador de la caña de azúcar *D. considerata* causados por 19 cepas de hongos entomopatógenos en Sinaloa.

Cepa <sup>1</sup>	Porcentaje de mortalidad (Media $\pm$ EE) <sup>2, 3</sup>							
	1 <sup>er</sup> Instar		2 <sup>do</sup> Instar		3 <sup>r</sup> Instar		Entre instares	
UAMHPI-031	98.6 $\pm$ 2.8	a	97.5 $\pm$ 2.9	ab	98.6 $\pm$ 2.8	a	98.2 $\pm$ 0.6	a
CIDSM01	93.8 $\pm$ 4.8	ab	98.7 $\pm$ 2.6	a	98.7 $\pm$ 2.6	a	97.0 $\pm$ 2.8	ab
CIDSM02	86.7 $\pm$ 7.3	ab	98.8 $\pm$ 2.5	a	97.2 $\pm$ 3.3	ab	94.2 $\pm$ 6.6	abc
CIDSB09	84.5 $\pm$ 10.7	ab	90.0 $\pm$ 10.8	abc	97.5 $\pm$ 5.0	a	90.7 $\pm$ 6.5	abcd
CIDSB01	66.2 $\pm$ 39.0	ab	89.6 $\pm$ 9.5	abc	98.7 $\pm$ 2.6	a	84.8 $\pm$ 16.7	abcde
ABNM7	93.2 $\pm$ 5.2	ab	75.7 $\pm$ 13.8	abc	93.3 $\pm$ 8.2	ab	87.4 $\pm$ 10.1	abcde
CIDSB03	84.2 $\pm$ 0.0	ab	91.6 $\pm$ 7.1	abc	91.7 $\pm$ 5.6	abc	89.2 $\pm$ 4.3	abcde
CIDSM03	86.6 $\pm$ 7.5	ab	86.3 $\pm$ 7.5	abc	92.4 $\pm$ 6.5	abc	88.4 $\pm$ 3.4	abcde
ABNM1	93.5 $\pm$ 2.7	ab	89.5 $\pm$ 4.3	abc	85.6 $\pm$ 4.4	abc	89.5 $\pm$ 3.9	abcde
ABNM6	87.4 $\pm$ 9.4	ab	81.8 $\pm$ 7.6	abc	92.1 $\pm$ 5.3	abc	87.1 $\pm$ 5.2	abcdef
CIDSB02	61.7 $\pm$ 18.4	ab	80.2 $\pm$ 20.0	abc	98.8 $\pm$ 2.5	a	80.2 $\pm$ 18.5	abcdef
CIDSB04	77.9 $\pm$ 8.9	ab	83.6 $\pm$ 11.0	abc	89.1 $\pm$ 13.5	abc	83.5 $\pm$ 5.6	bcdef
ABNB12	67.1 $\pm$ 5.1	ab	90.5 $\pm$ 5.2	abc	87.7 $\pm$ 9.3	abc	81.8 $\pm$ 12.8	cdefg
CIDSB06	60.8 $\pm$ 36.5	ab	65.0 $\pm$ 14.7	c	86.7 $\pm$ 11.3	abc	70.8 $\pm$ 13.9	defg
UAMHPI-210	80.8 $\pm$ 13.3	ab	71.5 $\pm$ 17.1	bc	67.6 $\pm$ 9.0	bc	73.3 $\pm$ 6.8	defg
ABNB8	56.7 $\pm$ 6.4	b	66.4 $\pm$ 12.8	c	89.3 $\pm$ 4.6	abc	70.8 $\pm$ 16.7	efg
ABNB6	64.9 $\pm$ 29.4	ab	67.1 $\pm$ 28.3	c	76.2 $\pm$ 24.9	abc	69.4 $\pm$ 6.0	efg
CIDSB14	61.6 $\pm$ 27.4	ab	68.2 $\pm$ 11.4	c	66.7 $\pm$ 26.2	bc	65.5 $\pm$ 3.4	fg
UAMHPI-139	59.9 $\pm$ 23.9	ab	61.9 $\pm$ 13.6	c	58.2 $\pm$ 26.5	c	60.0 $\pm$ 1.9	g
<b>Entre cepas</b>	<b>77.2 <math>\pm</math> 13.9</b>	<b>b</b>	<b>81.8 <math>\pm</math> 12.2</b>	<b>b</b>	<b>87.7 <math>\pm</math> 12.1</b>	<b>a</b>		

<sup>1</sup>Todas las cepas evaluadas mostraron >90% de viabilidad previo al ensayo.

<sup>2</sup> Medias con la misma letra en la misma columna no mostraron diferencias significativas (Tukey = 0.05).

<sup>3</sup> Previo al análisis estadístico, los datos fueron transformados al arco seno de la raíz cuadrada.

**Tabla 3.** Tiempo letal promedio (Media  $\pm$  EE) de larvas del barrenador de la caña de azúcar *D. considerata* causados por 19 cepas de hongos entomopatógenos en Sinaloa.

Cepa	Tiempo letal promedio (Media $\pm$ EE) <sup>1, 2</sup>			
	1 <sup>er</sup> Instar	2 <sup>do</sup> Instar	3 <sup>r</sup> Instar	Entre instares
UAMHPI-031	3.30 $\pm$ 0.96 a	3.74 $\pm$ 0.40 ab	3.49 $\pm$ 0.25 a	3.51 $\pm$ 0.22 a
CIDSM01	3.96 $\pm$ 0.59 ab	3.35 $\pm$ 0.50 a	3.87 $\pm$ 0.61 ab	3.73 $\pm$ 0.33 b
CIDSM03	4.41 $\pm$ 0.47 ab	3.66 $\pm$ 1.76 a	4.13 $\pm$ 1.82 ab	4.06 $\pm$ 0.38 abc
CIDSB09	3.91 $\pm$ 0.91 ab	4.48 $\pm$ 0.49 ab	4.40 $\pm$ 0.17 ab	4.26 $\pm$ 0.31 abcd
CIDSM03	4.40 $\pm$ 0.22 ab	3.92 $\pm$ 0.77 ab	4.56 $\pm$ 0.51 ab	4.29 $\pm$ 0.34 abcd
CIDSB01	4.64 $\pm$ 0.61 ab	4.83 $\pm$ 0.57 ab	4.05 $\pm$ 1.06 ab	4.50 $\pm$ 0.41 abcd
UAMHPI-210	3.99 $\pm$ 0.54 ab	4.43 $\pm$ 0.61 ab	5.16 $\pm$ 0.24 ab	4.53 $\pm$ 0.59 abcd
CIDSB03	5.17 $\pm$ 0.24 ab	3.87 $\pm$ 0.40 ab	4.69 $\pm$ 0.52 ab	4.58 $\pm$ 0.66 abcd
ABNM7	4.65 $\pm$ 0.61 ab	5.01 $\pm$ 0.88 ab	4.19 $\pm$ 0.55 ab	4.62 $\pm$ 0.41 abcd
ABNB6	4.08 $\pm$ 1.33 ab	4.96 $\pm$ 1.33 ab	5.00 $\pm$ 0.37 ab	4.68 $\pm$ 0.52 bcd
CIDSB06	4.28 $\pm$ 0.72 ab	5.16 $\pm$ 0.84 ab	4.79 $\pm$ 0.25 ab	4.74 $\pm$ 0.44 bcd
CIDSB02	4.81 $\pm$ 0.99 ab	5.04 $\pm$ 0.17 ab	4.86 $\pm$ 0.55 ab	4.90 $\pm$ 0.12 cd
ABNB8	5.54 $\pm$ 0.27 b	5.08 $\pm$ 0.87 ab	4.36 $\pm$ 0.52 ab	5.00 $\pm$ 0.59 cd
ABNM1	4.36 $\pm$ 0.90 ab	4.95 $\pm$ 1.19 ab	5.79 $\pm$ 1.13 b	5.03 $\pm$ 0.72 cd
ABNM6	4.77 $\pm$ 1.44 ab	5.64 $\pm$ 0.50 b	4.73 $\pm$ 0.19 ab	5.05 $\pm$ 0.51 cd
ABNB12	5.32 $\pm$ 0.24 b	5.26 $\pm$ 0.21 ab	4.73 $\pm$ 1.44 ab	5.11 $\pm$ 0.33 cd
CIDSB14	5.23 $\pm$ 0.36 ab	5.18 $\pm$ 0.85 ab	4.93 $\pm$ 0.37 ab	5.11 $\pm$ 0.16 d
CIDSB04	5.17 $\pm$ 0.97 ab	5.81 $\pm$ 0.63 b	4.61 $\pm$ 1.07 ab	5.20 $\pm$ 0.60 d
UAMHPI-139	5.46 $\pm$ 0.79 b	5.15 $\pm$ 0.42 ab	5.62 $\pm$ 0.87 b	5.41 $\pm$ 0.24 d
<b>Entre cepas</b>	<b>4.60 <math>\pm</math> 0.61 a</b>	<b>4.71 <math>\pm</math> 0.70 a</b>	<b>4.63 <math>\pm</math> 0.56 a</b>	

<sup>1</sup> Medias con la misma letra en la misma columna no mostraron diferencias significativas (Tukey = 0.05).

<sup>2</sup> Previo al análisis estadístico, los datos fueron transformados al arco seno de la raíz cuadrada.

**Tabla 4.** Concentración letal (CL<sub>50</sub>), Tiempo letal (TL<sub>50</sub>), Tiempo micosis (TM<sub>50</sub>) y Tiempo esporulación (TE<sub>50</sub>) de *B. bassiana* y *M. anisopliae* contra larvas del barrenador del tallo de la caña de azúcar, *D. considerata* en Sinaloa<sup>1,2</sup>.

Origen de la Cepa	Cepa	CL <sub>50</sub> (LC 95%) <sup>3</sup>	TL <sub>50</sub> (LC 95%) <sup>4</sup>	TM <sub>50</sub> (LC 95%) <sup>4</sup>	TE <sub>50</sub> (LC 95%) <sup>4</sup>	Virulencia relativa <sup>5</sup>
Nativa	CIDSB09	1.43 x 10 <sup>7</sup> (0.42 - 7.45)	3.63 (2.89 - 4.58)	4.85 (4.61 - 5.1)	6.36 (6.05 - 6.65)	1.54
Nativa	CIDSM01	3.6 x 10 <sup>7</sup> (1.3 - 15.6)	3.46 (3.06 - 3.86)	4.80 (4.51 - 5.06)	6.38 (5.77 - 6.78)	3.88
Exótica	UAMHPI-031	9.28 x 10 <sup>6</sup> (2.95 - 28.1)	3.29 (2.84 - 3.71)	5.28 (4.84 - 5.62)	7.19 (6.65 - 7.63)	1.00

<sup>1</sup> Resultados del análisis Probit de los datos acumulados.

<sup>2</sup> Diseño completamente al azar con tres replicas.

<sup>3</sup> Expresado en conidias/ml.

<sup>4</sup> Expresado en días.

<sup>5</sup> Valor calculado por la división de la CL<sub>50</sub> de la cepa nativa entre la CL<sub>50</sub> de la cepa exótica (referencia).

**Tabla 5.** Producción de esporas mediante fermentación bifásica de tres cepas de hongos entomopatógenos bajo condiciones de laboratorio.

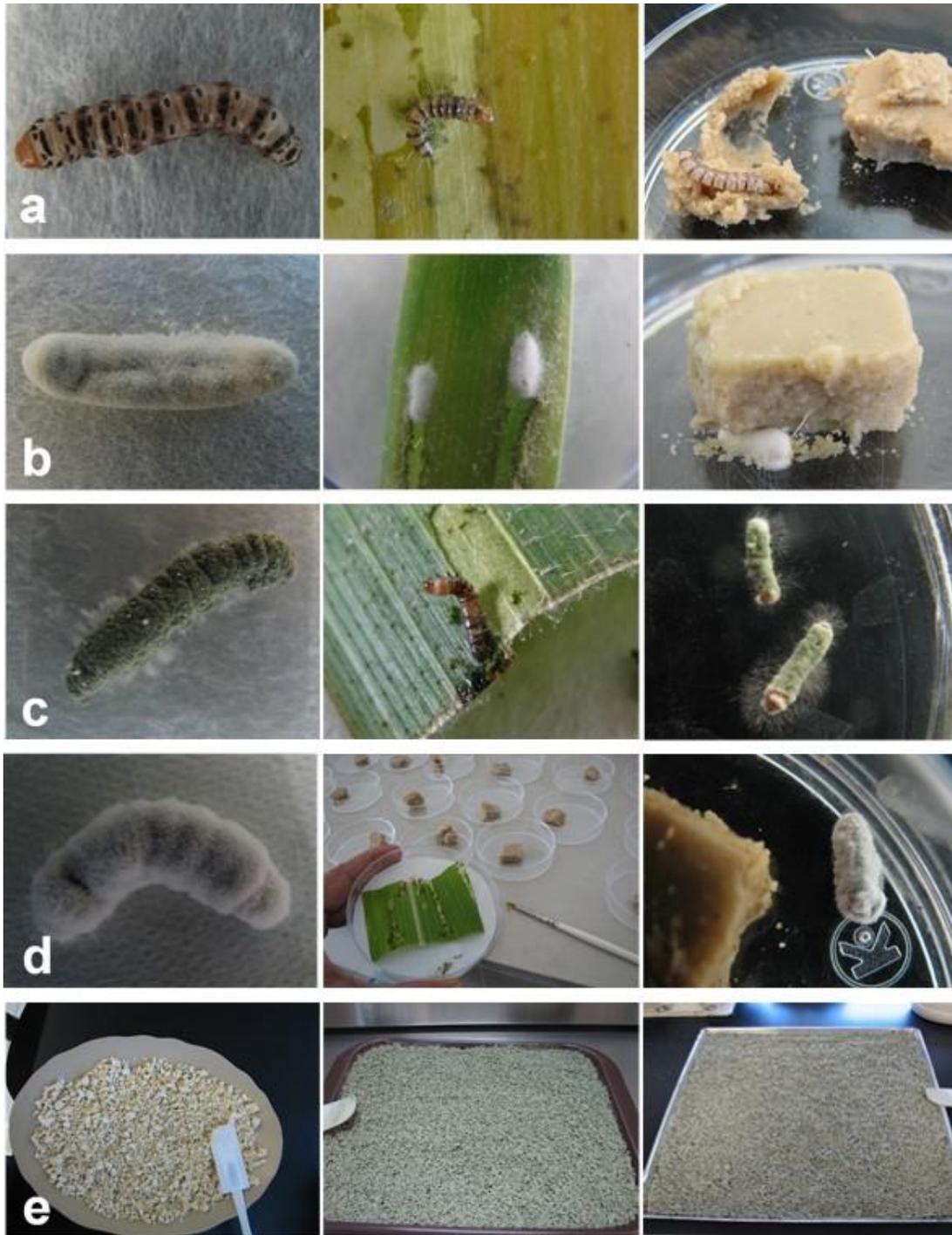
Cepa	Cantidad (gramos)	Conidias/gramo	Porcentaje de viabilidad
CIDSB09	4,265	3.95 x 10 <sup>8</sup>	93
CIDSM01	3,252	2.20 x 10 <sup>9</sup>	98
UAMHPI-031	3,045	2.85 x 10 <sup>9</sup>	97

**Tabla 6.** Cantidades de conidias por tratamiento y fecha de aplicación de tres hongos entomopatógenos usados contra larvas de 1 - 3 días de edad de *D. considerata* en Sinaloa.

<b>Cepa</b>	<b>Número de aplicación</b>	<b>Producto /gramos</b>	<b>Volumen de agua/ litros</b>	<b>Conidias/ gramo</b>	<b>Conidias/ ml</b>
CIDSB09	1	1000	10		$3.95 \times 10^7$
	2	1439	15	$3.95 \times 10^8$	$3.80 \times 10^7$
	3	1534	30		$2.02 \times 10^7$
CIDSM01	1	800	10		$1.76 \times 10^8$
	2	1135	15	$2.20 \times 10^9$	$1.66 \times 10^8$
	3	1123	30		$8.23 \times 10^7$
UAMHPI-031	1	800	10		$2.28 \times 10^8$
	2	1220	15	$2.85 \times 10^9$	$2.32 \times 10^8$
	3	1248	30		$1.20 \times 10^8$

**Tabla 7.** Resultados de daños por barrenadores de la caña de azúcar en unidades experimentales tratadas con hongos entomopatógenos.

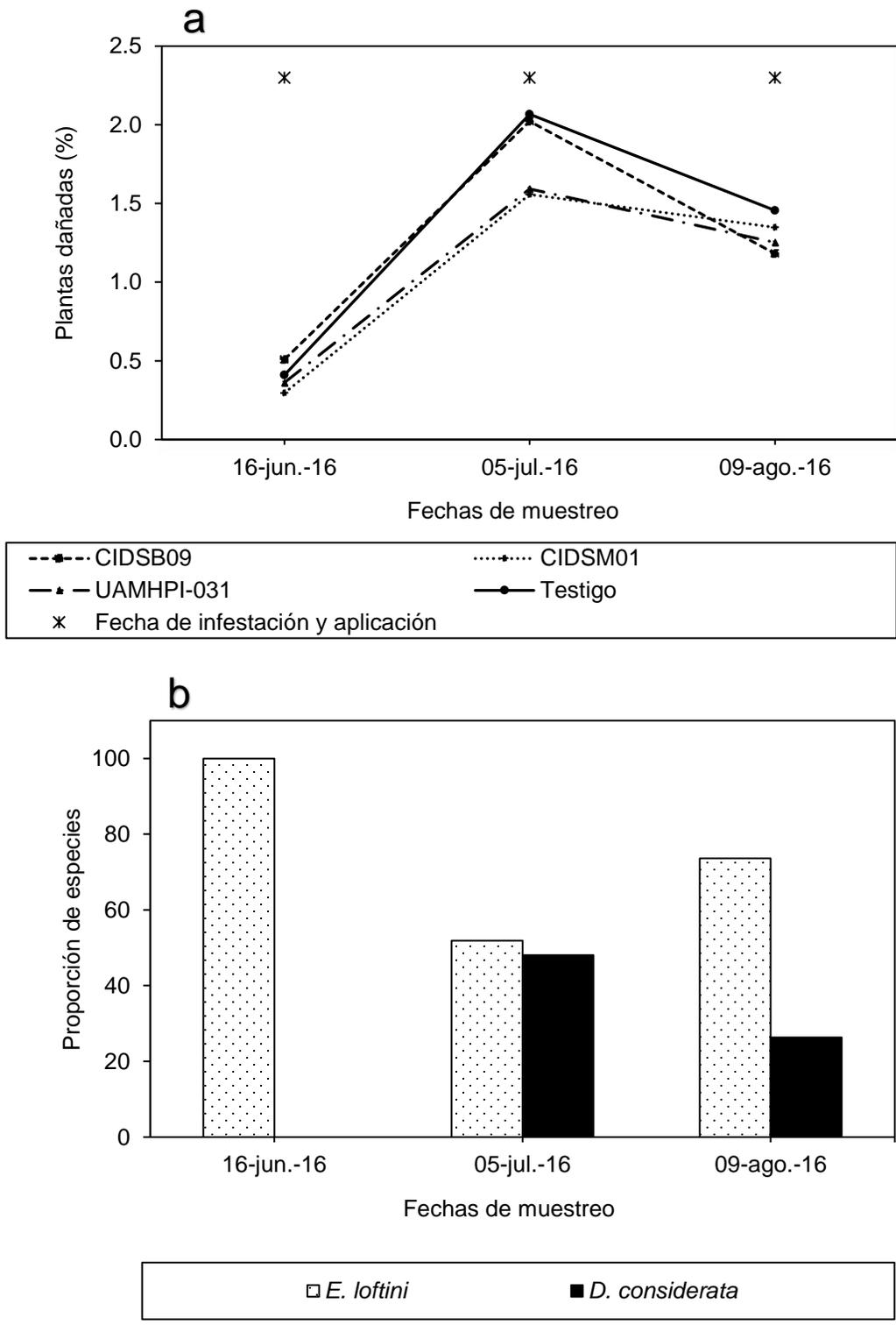
<b>Tratamiento</b>	<b>Canutos totales</b>	<b>Canutos dañados</b>	<b>Porcentaje de daño</b>
CIDSB09	980	118	12.00
CIDSM01	922	73	7.92
UAMHPI-031	963	108	11.20
Control	912	128	14.00



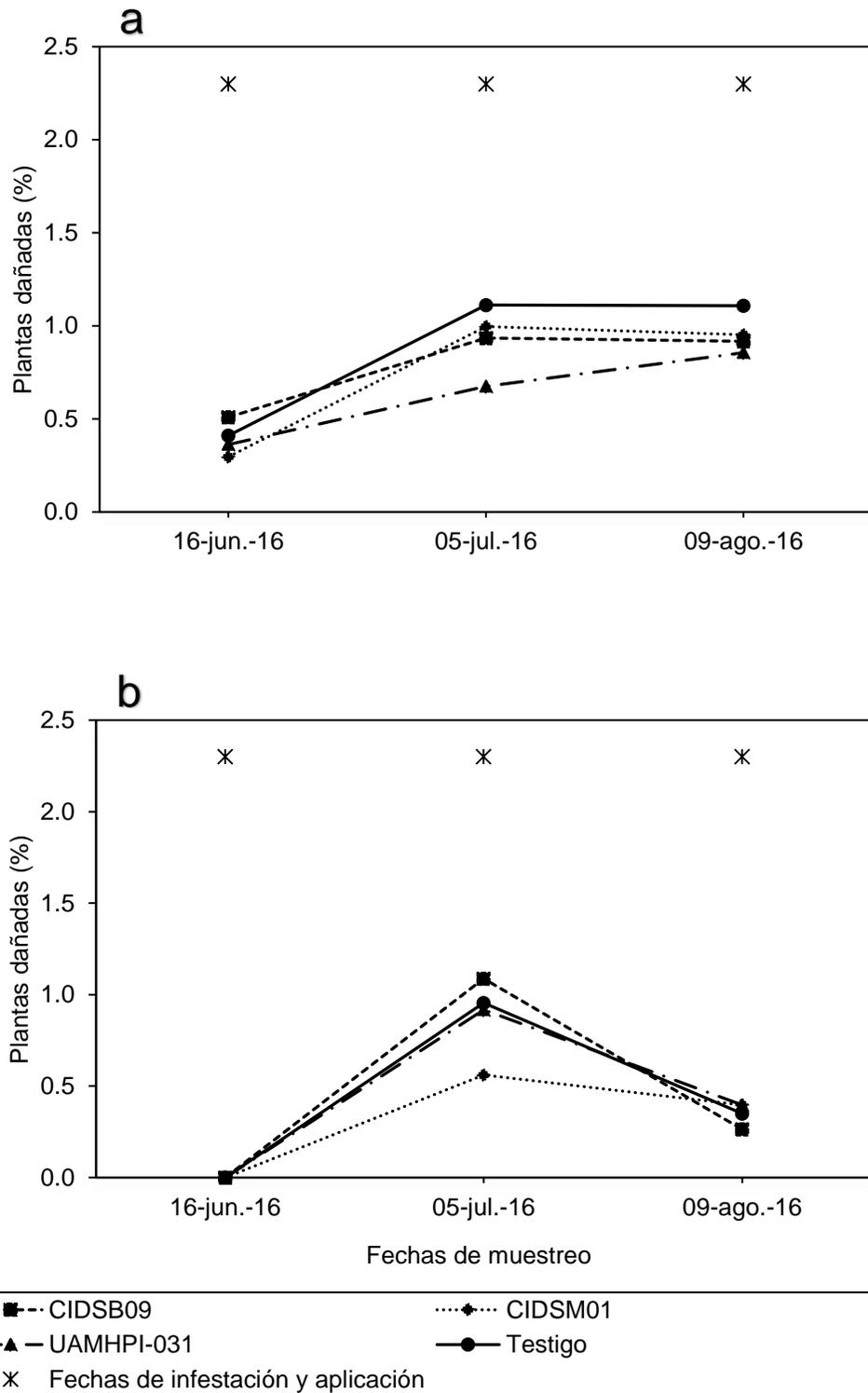
**Fig. 1.** Larvas sanas y micosadas de *D. considerata* en diferentes etapas durante los bioensayos de laboratorio con tres especies de hongos entomopatógenos y producción de conidias. Larvas sanas (a), *B. bassiana* (b), *M. anisopliae* (c), *I. javanica* (d), conidias en arroz de las cepas CIDSB09, CIDSM01 y UAMHPI-031, respectivamente (e).



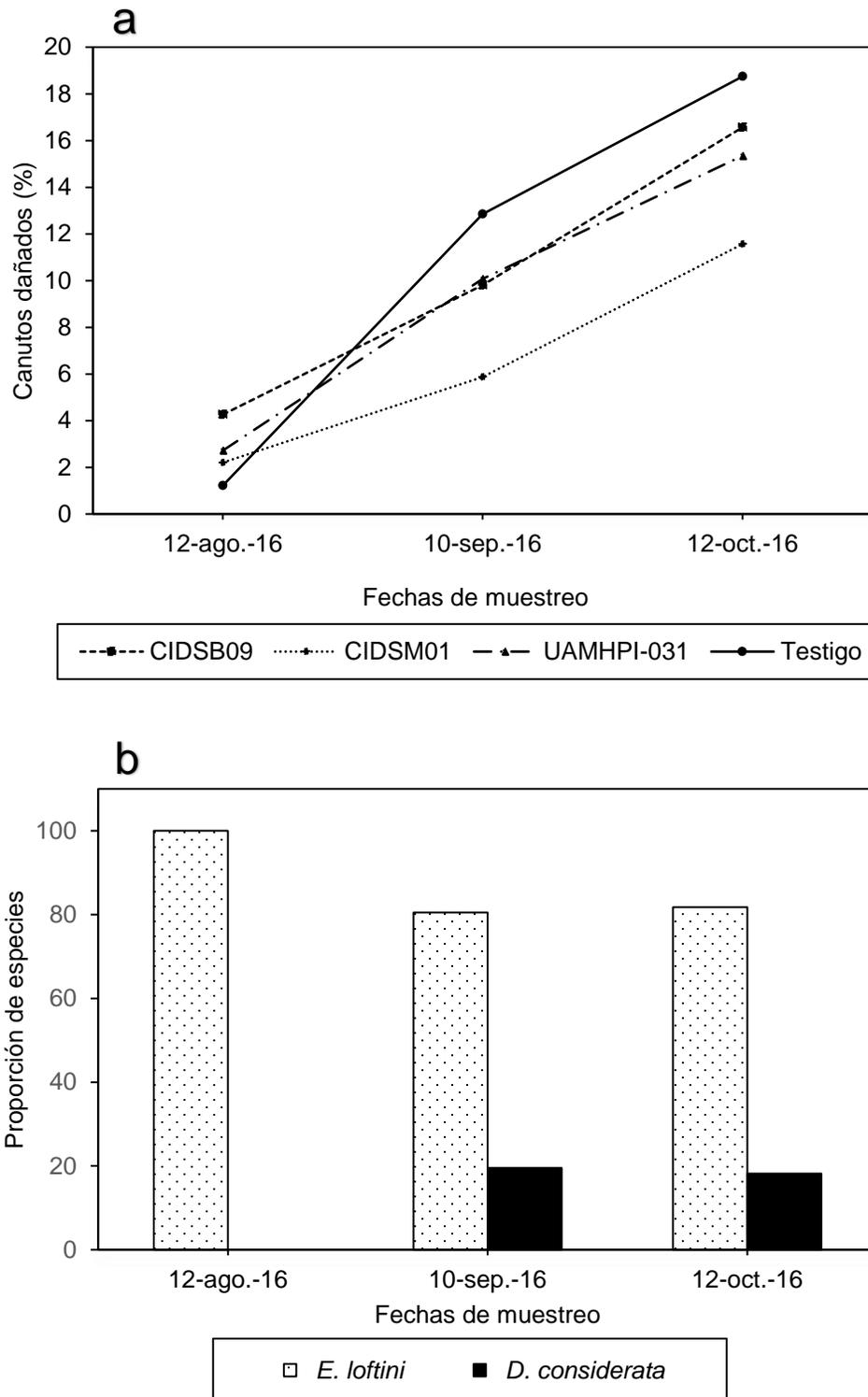
**Fig. 2.** Conteo de plantas (a), plantas dañadas (b), larva de *E. loftini* (c), larva de *D. considerata* (d), planta con meristemo apical muerto (e), y muestreo de tallos (f).



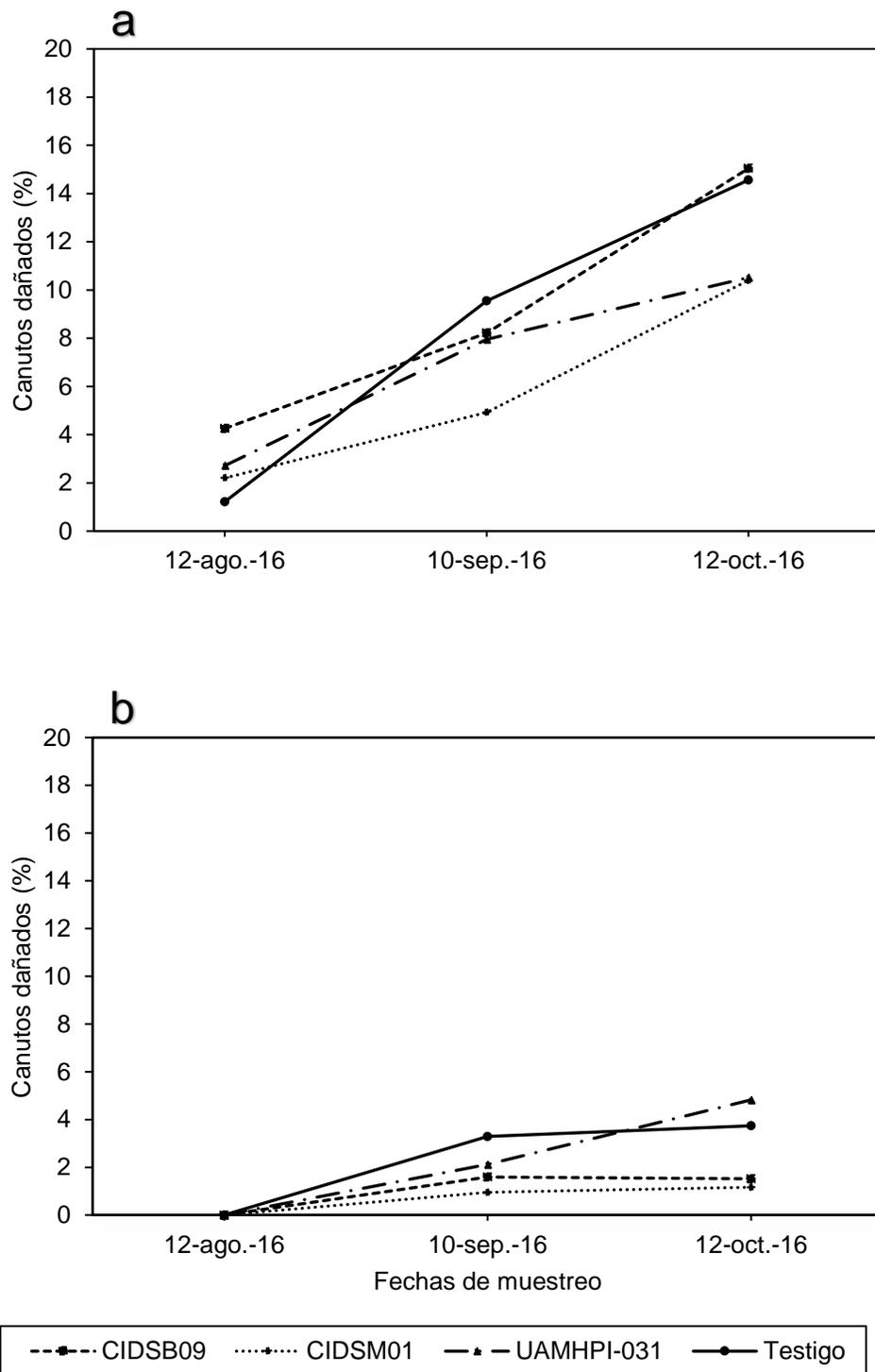
**Fig. 3.** Porcentaje de plantas dañadas por tratamiento (a), y población de especies de barrenadores por fecha de muestreo (b).



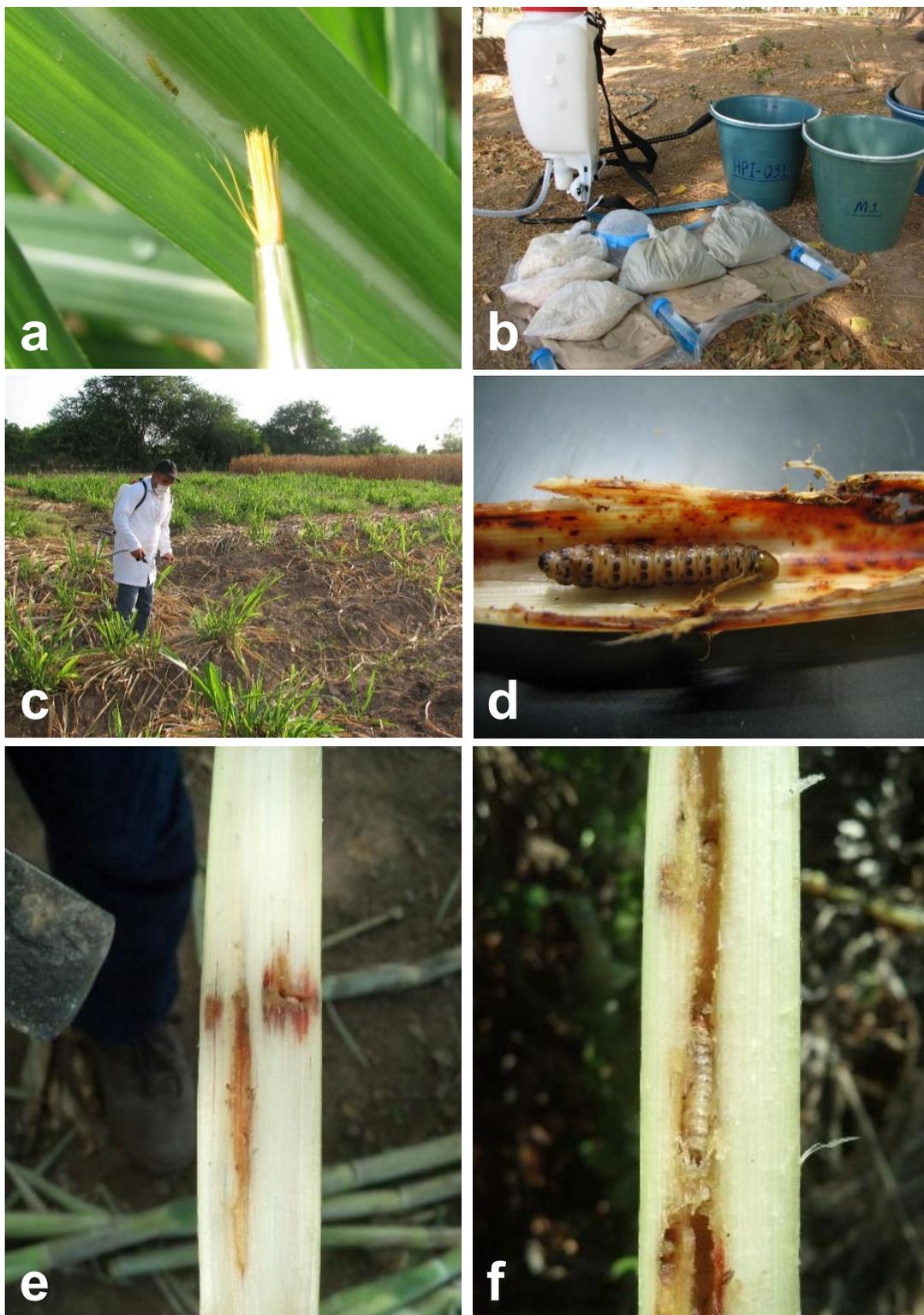
**Fig. 4.** Porcentaje de plantas dañadas por *E. loftini* (a), y *D. considerata* (b) por tratamiento y fecha de muestreo.



**Fig. 5.** Porcentaje de canutos dañados por tratamiento (a), y población de especies de barrenadores por fecha de muestreo (b).



**Fig. 6.** Porcentaje de canutos dañados por *E. loftini* (a), y *D. considerata* (b) por tratamiento y fecha de muestreo.



**Fig. 7.** Infestación de larvas (a), equipo y productos utilizados (b), aplicación (c), larva de *D. considerata* muerta (d), daño por *E. loftini* (e), daño por *D. considerata* (f).

## Literatura citada

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18:265 - 267.
- Arcas, J.A., B.M. Díaz, y R.E. Lecuona. 1999. Bioinsecticidal activity of conidia and dry mycelium preparations of two isolates of *Beauveria bassiana* against the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. *J. Biotech.* 69: 151-158.
- Badilla, F., A. I. Solís, y D. Alfaro. 1994. Manual de producción del parasitoide *Cotesia flavipes* para el control biológico de los taladradores de la caña de azúcar *Diatraea* spp. en Costa Rica. Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA), Costa Rica. 22 p.
- Butt T.M. y M.S. Goettel. 2000. Bioassays of entomogenous fungi, pp. 141-196. *In* A. Navon y K.R.S. Ascher [eds.], *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Castrejón-Antonio, J.E., P. Tamez-Guerra, F. Tamayo-Mejía, y J.A. Ocampo-Hernández. 2013. Evaluación de 4 medios de cultivo líquido para la producción de conidios de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin en fermentación sólida sobre arroz, pp. 103-107. *In* A. Vásquez-López, y R. Pérez-Pacheco [eds.], *Memoria: XXXVI Congreso Nacional de Control Biológico*, Oaxaca de Juárez, Oaxaca, México.
- Castro-Ortega, I. R., V. Obregón-Barbosa, A. Fonseca-González, L. P. Lina-García, V. M. Hernández-Velázquez, G. Peña-Chora, L. A. Rodríguez-del-Bosque, y R. Lezama-Gutiérrez. 2013. Patogenicidad y virulencia de seis cepas de hongos entomopatógenos sobre *Diatraea magnifactella* y *Spodoptera frugiperda*, pp. 45-48. *In* A. Vásquez-López, y R. Pérez-Pacheco [eds.], *Memoria: XXXVI Congreso Nacional de Control Biológico*, Oaxaca de Juárez, Oaxaca, México.

- García-Gutiérrez C., V.M. Hernández-Velázquez, y M. B. González-Maldonado. 2006. Procesos biotecnológicos de producción de bioplaguicidas: Hongos entomopatógenos, pp. 91-118. *In* C. García-Gutiérrez y H. Medrano-Roldán [eds.], *Biología aplicada a bioplaguicidas*. Instituto Politécnico Nacional. 308 p.
- Charnley A.K. y S.A. Collins. 2007. Entomopathogenic fungi and their role in pest control, pp. 159-187. *In* C.P. Kubicek y I. S. Druzhinina [eds.], *Environmental and Microbial Relationships*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Inglis, G.D., J. Enkerly, y M.S. Goettel. 2012. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales, pp. 189-253. *In* L.A. Lacey [ed.], *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Academic Press, London.
- Hernández, V.M. y R. Lezama. 2004. Uso de entomopatógenos para el control biológico de barrenadores del tallo, pp. 37-45. *In* L.A. Rodríguez-del-Bosque, G. Vejar & E. Cortéz [eds.], *Taller Internacional sobre Barrenadores del Tallo de Caña de Azúcar*, Sociedad Mexicana de Control Biológico. Los Mochis, Sinaloa, México.
- Hernández-Velázquez, V. M., L. P. Lina-García, V. Obregón-Barbosa, A. G. Trejo-Loyo, y G. Peña-Chora. 2012. Pathogens associated with sugarcane borers, *Diatraea* spp. (Lepidoptera: Crambidae): A review. *International Journal of Zoology*. 12 p.
- Jaronski S.T. y M.A. Jackson. 2012. Mass production of entomopathogenic Hypocreales, pp. 255-284. *In* L.A. Lacey [ed.], *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, Academic Press, London.
- Lacey, L.A., R. Frutos, H.K. Kaya, y P. Vail. 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future?, *Biol. Control* 21: 230 – 248.

- Legaspi, J.C., T.J. Poprawski, y B.C. Legaspi Jr. 2000. Laboratory and field evaluation of *Beauveria bassiana* against sugarcane stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae) in the Lower Rio Grande Valley of Texas. J. Econ. Entomol. 93: 54–59.
- LeOra Software, 2002. PoloPlus Probit and Logit Analysis, Version 1.0. LeOra Software, Berkeley, CA.
- Lezama, R. 1994. Perspectivas de control microbiano de barrenadores con hongos entomopatógenos, pp. 38-43. *In* Memoria: Curso sobre Control Biológico de Barrenadores en Caña de Azúcar, Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Tecomán, Colima, México.
- Lezama-Gutiérrez, R., C.A. Ángel-Sahagún, E. Galindo-Velasco, A.M. Solís-Cruz, I. Silva-Torres, G. Galván-Gutiérrez, y I.R. Núñez-Martínez. 2012. Efecto del hongo *Metarhizium anisopliae* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) en la reducción del daño por *Diatraea magnifactella* (Lepidoptera: Pyralidae) en caña de azúcar, bajo condiciones de campo, pp. 504-507. *In* E. Sansinenea R, J.L. Zumaquero R., y M.C. Del Rincón C [eds.]. Memoria: XXXV Congreso Nacional de Control Biológico, Puebla, México.
- Ramos-Oseguera, C.A., C. Ramírez-Salinas, y A.E. Castro-Ramírez. 2013. Evaluación de sustratos para la producción del hongo *Beauveria bassiana*, pp. 220-223. *In* A. Vásquez-López, y R. Pérez-Pacheco [eds.], Memoria: XXXVI Congreso Nacional de Control Biológico, Oaxaca de Juárez, Oaxaca, México.
- Robertson, J.L., R.M. Russell, H. Preisler, y N.E. Savin. 2007. Bioassays with Arthropods, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Rodríguez-del-Bosque, L. A., J. Palomo-Salas, y A. Méndez-Rodríguez. 1996. Susceptibility of bermudagrass cultivars to *Eoreuma loftini* (Lepidoptera: Pyralidae) in subtropical Mexico. Fla. Entomol. 79: 188-193.

- Rodríguez-Del-Bosque, L. A., y G. Vejar-Cota. 2008. Barrenadores del tallo (Lepidoptera: Crambidae) del maíz y caña de azúcar, pp. 9-22. *In* H. C. Arredondo-Bernal y L. A. Rodríguez del Bosque [eds.], Casos de Control Biológico en México. Ed. Mundi-Prensa, México-España.
- Rodríguez-del-Bosque, L. A., y G. Pantaleón-Paulino. 2012. *Eoreuma loftini* (Lepidoptera: Crambidae) expanded its geographic range into southern Veracruz and northern Oaxaca, México. *Southwest. Entomol.* 37: 525-527.
- Rodríguez del Bosque, L. A., G. Vejar-Cota, I. Vázquez-López, J. A. Villanueva-Jiménez, J. López-Collado, R. Alatorre-Rosas, y F. Hernández-Rosas. 2014. Plagas, pp. 147-186. *In* H. Mata-Vázquez; L. A. Rodríguez del Boque, V. H. Rodríguez-Morelos, y E. Vázquez-García [eds.], Manejo Integral de Caña de Azúcar. SAGARPA-INIFAP-UANL.
- Sánchez, J. A. 1990. El cultivo de la caña de azúcar en Sinaloa. Campo Experimental Sinaloa. Instituto para el Mejoramiento de la Producción de Azúcar (IMPA). Programa de Divulgación Técnica y Científica. Córdoba, Ver. México.
- SAS Institute. 2009. STAT/SAS User's Guide, release 9.0. ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Svedese, V.M., P.V. Tiago, J.D. Pereira B, L.M. Palva, E.A. Alves L., y A.L. Figueireiro P. 2013. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and production of cuticle-degrading enzymes in the presence of *Diatraea saccharalis* cuticle. *Afr. J. Biotechnol.* 12: 6491 - 6497.
- Tanada, Y. y H.K. Kaya. 1993. Insect pathology. New York: Academic Press, Inc. 666 p.
- Vejar-Cota, G.; A. Caro, L.A. Rodríguez-Del-Bosque, y D. Sahagún. 2005a. Inundative Releases of *Trichogramma atopovirilia* (Hymenoptera:

Trichogrammatidae) and *Macrocentrus prolificus* (Hymenoptera: Braconidae) against *Diatraea considerata* (Lepidoptera: Crambidae) on sugarcane in northern Mexico. J. Entomol. Sci. 40 (2): 231-233.

Vejar-Cota, G.; A. Caro, L.A. Rodríguez-Del-Bosque, J.W. Smith Jr., C. Hernández, D. Sahagún, y R.N. Wiedenmann. 2005b. Release and establishment of *Macrocentrus prolificus* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of sugarcane Stalkborers (Lepidoptera: Crambidae), in northern Mexico. Southwest. Entomol. 30: 175 - 180.

Vejar-Cota, G., L. A. Rodríguez-del-Bosque, y D. Sahagún. 2008. Economic and ecological impacts of hand removing dead hearts caused by *Diatraea considerata* (Lepidoptera: Crambidae) on sugarcane in Mexico. Southwest. Entomol. 33: 157 - 159.

Vejar-Cota, G., C. García-Gutiérrez, N.M. Rosas-García, L.A. Rodríguez-Del-Bosque, y C.I. Saldamando-Benjumea. 2016. Identificación morfológica y molecular de barrenadores del tallo de la caña de azúcar distribuidos en Sinaloa. Southwest. Entomol. 40: 153 - 162.

# Capítulo V

---

**Conclusiones generales y recomendaciones**

## CONCLUSIONES GENERALES

Se realizó la identificación morfológica y caracterización molecular de tres especies de barrenadores distribuidas en las zonas cañeras del norte y centro de Sinaloa, mediante el análisis de los genitales del macho y la secuenciación de la subunidad I de la enzima citocromo *c* oxidasa (COI) del ADN mitocondrial, respectivamente. Las especies encontradas fueron *D. considerata*, *D. grandiosella* y *E. loftini*. Este método de identificación puede aplicarse a otras regiones cañeras donde se requiere corroborar a las especies de barrenadores, dando mayor certidumbre a los productores para implantar estrategias de control biológico de estas plagas.

Se dio ingreso a 9 cepas de hongos entomopatógenos a la colección de hongos del Laboratorio de Bioinsecticias, las cuales están identificadas morfológicamente. El tamaño y forma del conidio y células conidiógenas, apariencia, color y crecimiento radial de ocho cepas coincidieron con los rasgos típicos de las especies *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. javanica*. Las características morfológicas y fisiológicas anteriores, aunado al origen geográfico del insecto huésped pueden ser usadas para correlacionarse con la virulencia, con el propósito de encontrar candidatos apropiados para el control biológico de barrenadores.

Estas mismas especies fueron caracterizadas molecularmente mediante la secuenciación de los ITS ribosomales, los cuales fueron comparados con la base de datos del GenBank, encontrando similitudes que variaron de 98 a 99%. Los números de acceso asignados a estas especies fueron subidos a la base de datos del GenBank. El uso de las técnicas moleculares para la corroboración de especies de hongos proporciona mayor claridad para la identificación, como se hizo en este trabajo.

Se evaluaron 10 cepas nativas de Sinaloa y 9 exóticas de otros Estados, de tres colecciones mexicanas de los hongos entomopatógenos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, e *I. javanica* contra el barrenador del tallo *D. considerata* en condiciones de laboratorio y campo. Todas las cepas fueron patogénicas encontrando

mortalidades que variaron del 58.2 a 98.8% dependiendo del instar del insecto y la cepa del hongo. Las mejores cepas nativas con mayor mortalidad de insectos y tiempo letal promedio fueron la CIDSB09 de *B. bassiana* y la CIDSM01 de *M. anisopliae*, mientras que la mejor cepa exótica fue la UAMHPI-031 de *M. anisopliae*. Por este resultado se consideraron como cepas candidatas para usarse en las pruebas de campo para el control del insecto.

La producción de hongos entomopatógenos mediante el procedimiento estandarizado del Laboratorio de Bioinsecticidas fue satisfactorio para obtener suficiente producto de calidad biológica, viabilidad y patogenicidad para realizar los ensayos de campo.

En los estudios de campo se encontraron larvas micosadas postratamiento (>2%), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de plantas dañadas ni en el porcentaje de canutos dañados en cada tratamiento en las fechas de evaluación. El tratamiento con el menor daño acumulado con respecto al testigo fue la CIDSM01, por lo que se considera la cepa candidata para su uso en campo. Los productores cañeros podrían reducir los costos para el control de barrenadores usando estos hongos y con ello reducir el impacto ambiental al disminuir el uso de insecticidas convencionales.

Es necesario mejorar la formulación y la técnica de aplicación de estos hongos para observar mejores resultados y sean una opción más para el control biológico de barrenadores en Sinaloa.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda aplicar el método para la identificación morfológica y molecular de los barrenadores en otras regiones cañeras donde se requiera comprobar la identificación de las especies de esta plaga. Esto es posible ya que existen laboratorios con infraestructura para la extracción del ADN de los barrenadores, lo que facilitaría la identificación rápida de las especies, mediante la comparación de la secuencia corta de nucleótidos de la COI mitocondrial.

Este método abre la posibilidad para proponer un proyecto multidisciplinario para la identificación de barrenadores de la caña de azúcar presentes en el territorio nacional.

De las especies de hongos entomopatógenos se recomienda aplicar nuestro método de caracterización para que las secuencias de nucleótidos a comparar estén en la base de datos genética. Esto ayuda a que cuando se tienen nuevas cepas de hongos es necesario combinar la identificación morfológica con la molecular para precisar la identificación de la especie.

Los hongos entomopatógenos más virulentos para barrenadores son *B. bassiana* y *M. anisopliae*, por lo que se recomienda usar solo estas especies. Para la selección de candidatos para estudios de campo deben ser considerados los que muestren la mayor mortalidad con el menor tiempo letal.

Para la producción de conidias en laboratorio se recomienda identificar los factores nutrimentales y ambientales para mejorar la producción de *B. bassiana*. Se sugiere considerar trabajar con diferentes cantidades de melaza, del vehículo sólido (arroz) y la velocidad y temperatura de agitación.

Para los estudios de campo se sugiere incrementar la cantidad de larvas a infestar para que reflejen los daños por barrenador, ya que los encontrados en este estudio estuvieron por debajo a los registrados en campo. Se recomienda, además,

incluir estudios de patogenicidad de hongos entomopatógenos para *E. loftini*, ya que es una plaga que ha sido subestimada.

La efectividad de los tratamientos usados en campo requirieron de mayor dosis, número de aplicaciones y mejor formulación y técnica de aplicación para mostrar mejores resultados, por lo que se recomienda realizar formulaciones de estos hongos en aceites, microencapsulados, polvos, etc. para propiciar y asegurar el contacto del hongo con su hospedero.