

**ESTADO DEL ARTE SOBRE TAXONOMÍA, FENOLOGÍA, Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE MOSCAS SIERRA DE CONÍFERAS (*Zadiprion* spp., *Neodiprion* spp. y *Monoctenus* spp.) QUE HABITAN LOS BOSQUES DE MÉXICO, ASÍ COMO LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE VIRUS DE POLIEDROSIS NUCLEAR CON POTENCIAL PARA EL CONTROL BIOLÓGICO ESPECÍFICO.**

**PROYECTO CONAFOR 2017-CO2 NUM: 291304  
Segundo Informe Técnico**



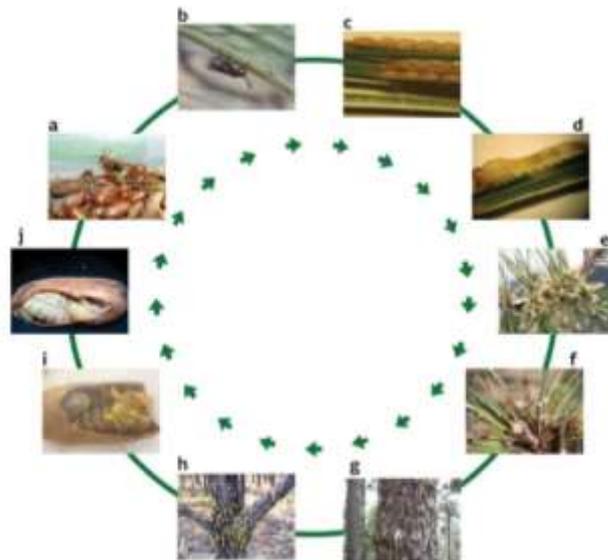
**Pabellón de Arteaga, Aguascalientes  
Octubre de 2019**

**ESTADO DEL ARTE SOBRE TAXONOMÍA, FENOLOGÍA, Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE MOSCAS SIERRA DE CONÍFERAS (*Zadiprion* spp., *Neodiprion* spp. y *Monoctenus* spp.) QUE HABITAN LOS BOSQUES DE MÉXICO, ASÍ COMO LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE VIRUS DE POLIEDROSIS NUCLEAR CON POTENCIAL PARA EL CONTROL BIOLÓGICO ESPECÍFICO**

**Segundo Informe Técnico**

**CONTENIDO DEL INFORME**

**Informe técnico “in extenso.....2**  
**Anexo B.- Reporte técnico actualizado.....52**



Representación del ciclo biológico de *Zadiprion falsus* a) emergencia de adultos, b y c) oviposición y acercamiento de huevecillos, d) acercamiento de una larva recién emergida, e y f) aspecto de larvas consumiendo follaje y forma defensiva de las larvas, g y h) lavas descendiendo a pupar, i y j) larva y pupa dentro de cocón. Fotos: Ernesto González Gaona INIFAP.

## ESTADO DEL ARTE SOBRE TAXONOMÍA, FENOLOGÍA, Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE MOSCAS SIERRA DE CONÍFERAS (*Zadiprion* spp., *Neodiprion* spp. y *Monoctenus* spp.) QUE HABITAN LOS BOSQUES DE MÉXICO, ASÍ COMO LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE VIRUS DE POLIEDROSIS NUCLEAR CON POTENCIAL PARA EL CONTROL BIOLÓGICO ESPECÍFICO

**Responsable técnico:** MC. Ernesto González Gaona (INIFAP-CIRNOC-CEPAB).

**Colaboradores:** Dr. Guillermo Sánchez Martínez, MC. Karla Vanessa De Lira Ramos y MC. Candelario Serrano Gómez (INIFAP-CIRNOC-CEPAB), Dr. Estefan Miranda Miranda y Dra. Raquel Cossio Bayugar (CENID-PAVET), Dr. Víctor Manuel Coria Ávalos e Ing. Jesús Muñoz Flores (INIFAP-C. E. Uruapan), Dr. Víctor López Martínez (UAEM), Dra. Martha Patricia España Luna, (UAZ), Dra. Alejandra Rosalía Gijón Hernández, Biol. José Francisco Reséndiz, Dr. Víctor Arriola Padilla (INIFAP-CENID-COMEF) Dr. Alejandro Pérez Panduro (COLPOS).

### Introducción

Las moscas sierra de la familia Diprionidae, ocasionan defoliaciones en los bosques de coníferas del hemisferio norte, incluyendo Norteamérica, México y parte de Centroamérica. Por lo general se encuentran a niveles endémicos ocasionando defoliaciones en *Pinus* spp. o *Juniperus* sp., tanto en renuevos como en arbolado adulto y plantaciones de reforestación; sin embargo, tienen la capacidad de ocasionar brotes epidémicos en cientos o miles de hectáreas. Esta última situación se ha presentado en múltiples ocasiones sobre todo en la última década; presentándose brotes epidémicos de *Zadiprion falsus* Smith en Durango (150 ha) y Jalisco (5,000 ha), *Zadiprion ojedae* Smith & Sánchez-Martínez y *Neodiprion autumnalis* (3,000 ha) en Chihuahua, y *Monoctenus sanchezi* en San Luis Potosí (800) y Guanajuato. Actualmente se reportan a la CONAFOR brotes epidémicos en Guerrero (2,500 ha de cedro blanco afectadas por *Monoctenus* sp.) y Oaxaca (4,500 ha de *Pinus* spp. afectadas por *Neodiprion bicolor*), 400 ha de *Pinus* spp. en La Norteña, ejido El Largo en Chihuahua. Aunado a lo anterior es necesario corroborar la identidad taxonómica de las especies en especial de *Monoctenus* sp. de Ixcateopan que difiere de *M. sanchezi* de San Luis Potosí y de las especies que están atacando a *Pinus cembroides*, *Pinus jeffreyi* y *Pinus chiapensis* (Baja California Sur, Coahuila, Tamaulipas y Veracruz) clasificadas como *Zadiprion rowheri* y que presentan diferencias muy notorias a nivel larvario. Así mismo la fenología de varias especies no se ha determinado. Respecto de las estrategias de combate se están aplicando biológicos vía aérea y aunque se han observado buenos resultados se están aplicando microorganismos no

específicos por tal motivo se buscan Virus de Poliedrosis Nuclear (VPN) que han demostrado su efectividad en la supresión de las poblaciones de moscas sierra en otras regiones.

### **Objetivo General**

Desarrollar una estrategia de control biológico basado en el uso de Virus de Poliedrosis Nuclear para las especies de moscas sierra de coníferas (Hymenoptera: Diprionidae) presentes en los bosques de clima templado de México.

### **Objetivos específicos**

- 1) Aislar e identificar los Virus de Poliedrosis Nuclear que se ha observado afectan a *Zadiprion falsus* en Durango, Chihuahua y Sonora, *Monoctenus sanchezi* en San Luis Potosí y Guanajuato; y de *Neodiprion* spp. y *Zadiprion* spp. en caso de ser detectados.
- 2) Desarrollar una metodología de cría de células de embriones de moscas sierra que replique los Virus de Poliedrosis Nuclear presentes en las moscas sierra que afectan coníferas en México.
- 3) Evaluar a nivel de campo la cepa de VPN incrementada en laboratorio, comparada con la cepa nativa de VPN incrementada directamente en larvas infectadas en campo, para al menos uno de los géneros contemplados en el proyecto.
- 4) Mapear la distribución geográfica de las especies de mosca sierra de coníferas presentes en los bosques de clima templado de México.
- 5) Actualizar el estado del arte sobre la identidad de las especies de mosca sierra de los géneros *Neodiprion*, *Monoctenus* y *Zadiprion* presentes en los bosques de clima templado de México.
- 6) Determinar la fenología de *Zadiprion* sp *circa falsus*. en Moris Chihuahua y Yekora Sonora; *Zadiprion* sp. en Tamaulipas y *Neodiprion* sp. *circa omosus* en Tecpán de Galeana, Guerrero, Xico, Veracruz y San José de Gracia, Aguascalientes.
- 7) Realizar acciones de transferencia de tecnología para enlaces de sanidad de la Comisión Nacional Forestal y brigadas de sanidad forestal en México.

### **Antecedentes**

Las moscas sierra de la familia Diprionidae son insectos que se alimentan de las hojas de *Pinus*, *Juniperus*, *Cupresus*, *Abies* y *Larix*, ocasionando defoliaciones extensivas en los bosques de clima templado del hemisferio norte, incluyendo México y centroamérica (Smith, 1988, 1993, Quiñonez, 2006; Olivo 2011). En México, los primeros daños reportados por este tipo de insectos se dieron en la Meseta Tarasca en Michoacán durante los periodos 1930-1943 y 1966-1974 (Cisneros, 1970; Méndez y Cibrián, 1985) y en Chihuahua a inicios de los años 1980's (Castro, 1981). Recientemente este grupo de insectos ha retomado importancia, registrándose daños en Chihuahua (Olivo, 2011; Sánchez-Martínez

*et al.*, 2012), Durango (Álvarez-Zagoya y Díaz-Escobedo, 2007; Quiñonez, 2006), Jalisco (DGGFS, 2008), Guerrero, Oaxaca, y San Luis Potosí (Smith *et al.*, 2010) involucrando los géneros *Zadiprion* y *Neodiprion* y *Monoctenus* (Smith *et al.*, 2010).

En forma natural las poblaciones de moscas sierra son afectadas por agentes de control natural como hongos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*), bacterias (*Bacillus thuringiensis*) y virus de poliedrosis nuclear; así como parasitoides destacando las moscas de la familia Tachinidae y avispidas de la familia Ichneumonidae.

En México, las dependencias del sector forestal (CONAFOR) han implementado estrategias de control biológico de moscas sierra con aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* y hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*; sin embargo, las infestaciones por estos insectos persisten en varias entidades federativas. En Canadá y Europa, el control de moscas sierra se ha realizado exitosamente a través de enfermedades virales, debido a que, a diferencia de los insecticidas químicos, los virus entomopatógenos y particularmente los baculovirus, son agentes que se replican y pueden permanecer viables en el ambiente por varios años (Thompson *et al.*, 1981). Según Moreau *et al.* (2005) y Lucarotti *et al.* (2007), los agentes los más eficaces para suprimir los brotes epidémicos de las moscas sierra son los virus.

En Rusia y Siberia se aisló al virus *Birdiavirus diprionis* de *Diprion similis* (Gulli, 1971 citado por Fuxa *et al.*, 1998). Además, un virus aislado de *Neodiprion lecontei* (Fitch) denominado Lecontvirus, en EU y Canadá ocasionó mortalidades superiores al 90% a la población de esa mosca sierra, después de 15 días de su aplicación aérea (Johnson *et al.*, 1978; De Groot *et al.*, 1979; Podgwaite *et al.*, 1986; Cunningham *et al.*, 1987). En Canadá también se ha aplicado “Abietiv” para proteger a *Abies balsamea* contra el ataque de *Neodiprion abietis*. Este último producto es una formulación comercial de un virus de poliedrosis nuclear (NeabVPN) aislado de *Neodiprion abietis* en 1997 (Moreau *et al.*, 2005; Lucarotti *et al.*, 2007). Existen otros productos para el control de moscas sierra que contienen virus como: Latvian, Neocheck-S, Virox, Virin-Diprion todos contra *Neodiprion sertifer* (Geoffroy) (Zarin and Augstkalnin, 1976; Glowacka *et al.*, 1987; Kulikouskii, 1984 citados por Fuxa *et al.*, 1998; Podgwaite *et al.*, 1984). Los nucleopoliedrovirus (VPN) de moscas sierra son muy específicos del insecto hospedante, lo cual los hace ideales para su uso en campo, ya sea por vía terrestre o aérea, ya que no se disturba el ambiente al no tener efecto contra otros organismos no objetivo.

La propagación de baculovirus insecticidas en cultivos celulares presenta una serie de ventajas potenciales como proceso controlado, ya que permite obtener virus libres de contaminación con otros microorganismos o con productos

alergénicos tales como proteínas del insecto o cutículas (Weiss *et al.*, 1981). El procedimiento debe tener las siguientes características: a) Línea celular bien caracterizada, b) Medio de cultivo de composición simple y bajo costo, apto para sostener la proliferación celular y la producción viral, c) Cepa viral de elevada patogenicidad para el insecto blanco, y genéticamente estable, d) Conocimiento de las condiciones óptimas de cultivo e infección para alcanzar elevados rendimientos del fenotipo viral insecticida. El Centro Forestal de los Grandes Lagos (Canadá) ha producido 150 líneas de células de insectos para investigación en plagas forestales, algunas de ellas son: *Choristoneura fumiferana*, *Malacosoma disstria*, *Manduca sexta*, *Lymantria dispar*, *Pissodes strobi*, *Lygus lineolaris* y *Neodiprion lecontei*, representando seis orígenes: larvas neonatas, prepupas, embriones, ovarios, hemocitos y células del intestino medio; así como cuatro órdenes: Lepidóptera, Hymenóptera, Coleóptera y Hemíptera (Caputo *et al.*, 2011).

## **Materiales y métodos de actividades octubre 2018-octubre 2019**

### ***Obtención de material biológico***

Para la recolecta de material biológico de moscas sierra primero se contactó a los enlaces de Sanidad de la CONAFOR en los diferentes estados, para determinar si conocían de la existencia actual o pasada de ataques de moscas sierra en su área de influencia. En caso positivo se concertó una visita para la obtención de material biológico y que los enlaces sirvieran como guía y dar seguridad al personal, ya que son personas conocidas en las comunidades o sitios de muestreo.

Durante 2019 se realizaron recolectas en Aguascalientes (La Congoja, Barranca el Rico y Barranca Piletas), Chihuahua (Balleza, Guachochi y Madera), Coahuila (Cañón de San Lorenzo), Durango (Pueblo Nuevo), Guanajuato (Xichu), Guerrero (La Unión de Isidoro Montes de Oca e Ixcateopan), Hidalgo (Acaxochitlan), Michoacán (San Juan Parangaricuturo, Patamban, Santa Cruz Tanaco), Puebla (Pahuatlan del Valle), Oaxaca (Putla), Tamaulipas (Miquihuana) y Veracruz (Atzalán, Xico y ).

### ***Identificación de moscas sierra (morfológica y molecular)***

En esta actividad se formaron dos grupos de trabajo 1) identificación de larvas, considerando la morfología externa (MC. Ernesto González Gaona), como molecular (Dra. Alejandra Rosalía Gijón Hernández) y 2) Identificación a nivel de adultos mediante la morfología externa (Dr. Guillermo Sánchez Martínez) y técnicas moleculares (Dra. Alejandra Rosalía Gijón Hernández) y en forma complementaria se realizaron fotografías con el microscopio electrónico de barrido (Dr. Víctor Manuel Arriola Padilla).

El material biológico se procesó de diferentes maneras a) morfología externa de larvas, para material de reciente colecta, los ejemplares se mataron en agua caliente a  $>70^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 3 minutos y después se conservaron en alcohol al 70%, b) caracterización molecular se emplearon ejemplares preservados en alcohol al 70% sin el proceso de muerte en agua caliente y ejemplares conservados directamente en Alcohol etílico absoluto (Etanol Anhidro al 99%), c) material adulto montado en seco de la colección del Dr. Guillermo Sánchez Martínez y material de reciente adquisición por donación de Personal de los Enlaces de Sanidad de la CONAFOR y por nuevas recolectas del MC. Ernesto González Gaona.

Para la morfología externa de los adultos y larvas se tomaron fotografías de los ejemplares con una cámara (Moticam 5.0) adaptada a un microscopio de disección (Motic con 40X). Para los adultos solo se emplearon las hembras a las cuales se les quito, el abdomen y se sometió a un proceso de maceración en Hidroxido de potasio al 10% (KOH) por 15 min en forma posterior se extrajo la lanceta y se limpió con agua destilada, después se montó sobre un portaobjetos utilizando bálsamo de Canadá como medio de montaje y se cubrió con un portaobjetos que se selló con esmalte de uñas transparente y se procedió a la observación bajo un microscopio compuesto considerando los escritos de Smith, 1988; *Smith et al.*, 2010 y 2012 . En el caso de larvas se realizaron observaciones de las características de la cabeza, escleritos de las propatas y las características del tórax y tercer segmento abdominal. Como referencias para la identificación se consultó a Ross (1955), Smith (1971), Smith (1974), Wong y Szlabey (1986), *Smith et al.* (2010), y *Smith et al.* (2012).

En forma adicional se tomaron fotografías de las larvas con un microscopio estereoscópico Stemi 2000 C con cámara de video Axio Cam MR3. Las imágenes se editaron con el Software CombineZp; para procesar el conjunto de fotografías (por estructura) y mezclar sus áreas enfocadas, se eligieron los métodos: aling and balance used frames, do stack, do soft stack, do weighted average, pyramid weighted average, pyramid do stack, pyramid maximum contrast, ya que son los que permitieron obtener la mejor calidad de resolución. Mientras que para el caso de adultos hembras se siguió un procedimiento similar con KOH al 10% pero ahora, las lancetas, se incluyeron en concentraciones crecientes y sucesivas de etanol (de 75% al 100%) para su deshidratación, y al final se colocaron en viales pequeños con aceite mineral. Para observarlas al microscopio Electrónico de Barrido, SEM (EVO MA15, Zeiss), se ubicaron en "stums" cubiertos de cinta de carbono. Las características técnicas con las que fueron adquiridas las imágenes fueron, aumento (Mag): 113-132 X, distancia de trabajo (WD): 8.5 mm, tipo de señal (Signal A): CZ BSD, modo de vacío (Vacum Mode): presión variable.

En el 2019 Se trabajó con un total de 50 colectas de larvas y adultos de mosca sierra (Diprionidae: Hymenoptera) provenientes de 16 estados de un periodo de 2011-2019 (Cuadro 1). Los especímenes fueron previamente identificados taxonómicamente y conservados en alcohol al 70%. Se registró la información de cada colecta en una base de datos en Excel con el objetivo de tener un control de todas las muestras (Cuadro 1).

Por cada colecta se seleccionó un ejemplar, que cumpliera con la calidad requerida para los análisis moleculares y se fotografió en vista dorsal, lateral y ventral antes de la extracción de ADN, para tener identificado el espécimen durante todo el proceso. Las fotografías se tomaron con un microscopio estereoscópico Stemi 2000-C con cámara AxionCam MRc marca Zeiss. Para crear imágenes compuestas de profundidad de campo se utilizó el programa Combine versión ZP. Para procesar cada uno de los conjuntos de imágenes (por cada colecta) y mezclar sus áreas enfocadas, se eligieron los métodos: align and balance used frames, do stack, do soft stack, do weighted average, pyramid weighted average, pyramid do stack, pyramid maximum contrast, ya que estos permitieron obtener la imagen con la mejor resolución. Una vez que se obtuvo la imagen compuesta, se utilizó el editor de gráficos GNU Image Manipulation Program (GIMP) para mejorar la calidad de las fotografías.

A nivel larvario, Los ejemplares conservados en alcohol al 70% se lavaron tres veces con agua destilada estéril y las larvas se disectaron en cinco partes: capsula cefálica, mandíbulas, patas verdaderas, pseudopatas y la parte terminal del abdomen mientras que los insectos adultos se dividieron en: tórax, abdomen y cabeza, con el objetivo de establecer protocolos eficientes de extracción de ADN y de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Los ejemplares se colocaron en tubos Eppendorf, agregando nitrógeno líquido para macerar, posteriormente se adicionó 150µL de buffer de lisis y en forma posterior se agregaron otro 350µL adicionales. El tubo se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugo 1.0 min a 12,000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se le adicionaron 300µL de fenol:cloroformo, se colocó en el vortex durante un minuto y se centrifugó a 12,000 rpm durante 3min. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se agregaron 200µL más de fenol:cloroformo.

El sobrenadante se trasladó a un tubo y se adicionaron 300µL isopropanol y 30µL de acetato de amonio, se mezclaron ligeramente y se centrifugó durante 5min a 12,000 rpm, se decantó el sobrenadante. La pastilla resultante se lavó

Cuadro 1. Relación de Moscas Sierra de la familia Diprionidae (adultos y larvas) que se emplearon para la identificación molecular.

CLAVE	FECHA DE COLECTA	HOSPEDERO	ESPECIE	LUGAR DE COLECTA
JALZF10	10/12/17	<i>Pinus devoniana</i>	<i>Zadiprion sp.</i>	Jalisco, San Juan de los Potreros, Chimaltitlan
AGSNO3	31/07/19	ND	<i>Neodiprion omosus</i>	Aguascalientes, La Congoja, San José Gracia
JALZF1_11	12/01/12	<i>Pinus douglasiana</i>	ND	Jalisco, Cruz del muchacho, Gómez Farías
CHIMAC	14/06/19	<i>Abies</i>	<i>Neodiprion sp.</i>	Chihuahua, Santuario de la Cotorra, Serrana Madera
CHIAP2	20/09/18	ND	<i>Zadiprion sp.</i>	Chiapas, Cuartel Miliar, San Cristobal de las Casas
SONZF2	21/02/18	<i>Pinus engelmannii</i>	<i>Zadiprion sp.</i>	Sonora, La Joya, Yecora
OAXN1_23	02/05/15	ND	<i>Neodiprion sp.</i>	Oaxaca, La Muralla, Santiago Ixtlayutla
CHIMPM	13/06/19	<i>Pseudotsuga menziensis</i>	<i>Neodiprion sp.</i>	Chihuahua, Santuario de la Cotorra, Serrana Madera
VERZR5	29/09/16	<i>Pseudotsuga chiapensis</i>	<i>Zadiprion rowheri</i>	Veracruz, Arroyo Colorado, Atzalan
QROZ1	09/09/16	ND	ND	Querétaro, Campo Santo, Pinal de Amoles
DGON3	26/09/11	<i>Pinus cooperi, ayacahuit</i>	<i>Neodiprion sp.</i>	Durango, La Ermita, Pueblo Nuevo
GROZ2	25/04/19	ND	<i>Zadiprion sp.</i>	Guerrero, La Union de Isidoro Montes de Oca, La Unión
OAZXF2_36	16/08/18	ND	<i>Zadiprion sp.</i>	Oaxaca, Ixtepejil, Santa Catarina
OAZXZ4_38	12/09/12	ND	<i>Zadiprion sp.</i>	Oaxaca, San Juan Tepeuxila, San Juan Teponaxtla
CHIZ0	21/08/18	ND	<i>Zadiprion ojedae</i>	Aguascalientes, Guachochi
CHIZ7_39	15/05/19	<i>Pinus duranguensis</i>	<i>Zadiprion sp.</i>	Chihuahua Balleza El Vergel, Ejido San Carlos
GROM2_2	08/09/12	<i>Juniperus flaccida</i>	<i>Monoctenus sp.</i>	Chihuahua Ciudad Madera ND
CHIMPS	13/06/19	<i>Pinus strobidormis</i>	<i>Neodiprion sp.</i>	Chihuahua, Ciudad Madera
SON20_13	16/01/15	<i>Pinus engelmannii</i>	<i>Zadiprion ojedae</i>	Sonora, Yecora, La Joya
VERZR2	20/08/18	ND	<i>Zadiprion rowheri</i>	Veracruz, Atzalan, Xicotes
SLPMS19	07/09/11	<i>Juniperus flaccida</i>	<i>Monoctenus sanchenzi</i>	San Luis Potosí, Armadillo de los Infantes, Barranca de San Isidro
GROZ1	25/04/19	ND	<i>Zadiprion sp.</i>	Guerrero, La Union de Isidoro, Montes de Oca La Unión
GRON13	00/11/2017	ND	<i>Neodiprion sp.</i>	Guerrero, Costa Grande
OAZX21_17	06/05/15	ND	<i>Zadiprion sp.</i>	Oaxaca, San Juan Colorado, Cuesta del Toro
MICHNO	00/07/2011	<i>Pinus pseudostrobus</i>	<i>Neodiprion sp.</i>	Michoacán, Nuevo Parangaricutiro, San Juan Nuevo
CHIMZF	09/07/19	<i>Pinus duranguensis</i>	<i>Zadiprion falsus</i>	Chihuahua, Ciudad Madera, La Norteña
OAX2FL_31	05/12/17	<i>Pinus oaxacana</i>	<i>Zadiprion sp.</i>	Oaxaca Ixtepejil La Cienega, Santa Catarina
HGON1	00/09/2017	<i>Pinus patulla</i>	<i>Neodiprion sp.</i>	Hidalgo, Acaxochitlan
GTOM1_35L	06/08/18	<i>Juniperus flaccida</i>	<i>Monoctenus sp.</i>	Guanajuato, Xichú, Llano Grande
HGON2	ND	<i>Pinus gregii</i>	<i>Neodiprion sp.</i>	Hidalgo, Metztitlan, Olotla
AGSNO2	28/11/11	<i>Pinus halepensis</i>	<i>Neodiprion omosus</i>	Aguascalientes, Sierra Fría, Los Alamitos
MICHNO_AD	15/10/12	<i>Pinus pseudostrobus</i>	<i>Neodiprion omosus</i>	Michoacán, Nuevo Parangaricutiro, San Juan Nuevo
SLPNB2	19/01/12	<i>Pinus gregii</i>	<i>Neodiprion bicolor</i>	San Luis Potosí, Armadillo de los Infantes, Rancho Quemado
CHINA	25/11/12	<i>Pinus arizonica</i>	<i>Neodiprion autumnalis</i>	Chihuahua, Guachochi
SLPMS2	19/06/12	<i>Juniperus flaccida</i>	<i>Monoctenus sanchenzi</i>	San Luis Potosí, Armadillo de los Infantes, La Barranca
JALZF_AD	12/09/12	<i>Pinus douglasiana</i>	<i>Zadiprion falsus</i>	Jalisco, Ciudad Guzman, El rodeo
DOZGF1	11/06/12	ND	<i>Zadiprion falsus</i>	Durango, Pueblo Nuevo, Los Bancos
CHINA4	28/11/13	<i>Pinus arizonica</i>	<i>Neodiprion autumnalis</i>	Chihuahua, Guachochi
DOZGF15	12/06/12	ND	<i>Zadiprion falsus</i>	Durango, Pueblo Nuevo, Los Bancos
SLPNB	15/02/12	<i>Pinus gregii</i>	<i>Neodiprion bicolor</i>	San Luis Potosí, Armadillo de los Infantes, El Picacho de los Dolores

MICHNO	15/10/12	<i>Pinus pseudostrobus</i>	<i>Neodiprion</i> <i>sp.</i>	Michoacán, Nuevo Parangaricutiro, San Juan Nuevo
JALSF2	17/09/11	<i>Pinus douglasiana</i>	<i>Zadiprion</i> <i>falsus</i>	Jalisco, Ciudad Guzman, El rodeo
TAMPZR6	20/01/18	<i>Pinus cembroides</i>	<i>Zadiprion</i> <i>rowheri</i>	Tamaulipas, Miquihuana
SLPMS29	03/08/12	<i>Juniperus flaccida</i>	<i>Monoctenus</i> <i>sanchezi</i>	San Luis Potosí, Armadillo de los Infantes, La Barranca
GROM2_AD	19/07/17	<i>Juniperus flaccida</i>	<i>Monoctenus</i> <i>sp.</i>	Guerrero, Oxcatopan, La Barranca
CHIZFM7	16/06/15	<i>Pinus engelmannii</i>	<i>Zadiprion</i> <i>sp.</i>	Chihuahua, Moris
OAXZF1	11/02/17	<i>Pinus oaxacana</i>	<i>Zadiprion</i> <i>falsus</i>	Oaxaca, Ixtepejil, Santa Catarina
OAXZF3_29	11/07/18	ND	<i>Zadiprion</i> <i>falsus</i>	Oaxaca, Ixtepejil, Santa Catarina
OAXZF213	17/08/18	ND	<i>Zadiprion</i> <i>falsus</i>	Oaxaca, Ixtepejil, Santa Catarina
CHIZFG1	02/09/18	<i>Pinus duranguensis</i>	<i>Zadiprion</i> <i>sp.</i>	Chihuahua, Guachochi

con 50µL de etanol al 70%. El precipitado se secó a temperatura ambiente y se suspendió en 50µL de agua libre de nucleasas. La calidad del ADN obtenido se midió en un Nano Drop 2000 de la marca Thermo Scientific.

El producto se conservó a una temperatura de  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  para ser utilizado para la amplificación de ADN ribosomal. Para realizar la PCR, se utilizaron los cebadores universales (primers) LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994) para la amplificación de regiones del ADN ribosomal, los cuales reconocen al gen Citocromo C Oxidasa, subunidad I (COI). Las reacciones de PCR se realizaron por medio de la adición de los reactivos descritos en Cuadro 1. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador T100 de la marca Biorad usando el programa detallado en la Cuadro 2.

Cuadro 2. Reactivos y concentraciones para realizar la PCR del ADN de larvas de moscas sierra

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	CANTIDAD
BUFFER PCR	5x	5 µl
MGCL <sub>2</sub>	25mm	0.75 µl
DNTP'S	10mm	0.25 µl
PRIMER 1	10nmol	1 µl
PRIMER 2	10nmol	1 µl
DNA TAQ POLIMERASA	5u/µl	0.5 µl
DNA BLANCO	20 ng/µl	3 µl
AGUA GRADO PCR	2 µm	13.5 µl

Cuadro 3. Programa para la amplificación del ADN de larvas de moscas sierra en el termociclador Biorad T100.

ETAPA	NO. DE CICLOS	DURACIÓN	TEMPERATURA
DESNATURALIZACIÓN INICIAL	1	3 minutos	95°C
DESNATURALIZACIÓN ALINEAMIENTO	5	1 minuto 30 segundos	95°C 51°C
EXTENSIÓN		1 minuto	72°C
DESNATURALIZACIÓN ALINEAMIENTO	35	1 minuto 30 segundos	94°C 51°C
EXTENSIÓN		1 minuto	72°C
EXTENSIÓN FINAL	1	5 minutos	72°C
CONSERVACIÓN		∞	4°C

Los fragmentos amplificados se corrieron en geles de agarosa al 1%, con 0.4µL de bromuro de etidio y se visualizaron en un fotodocumentador Infinity-ST5 Vilber Lourmat. La banda de interés se cortó para su purificación. El producto de PCR fue purificado con el kit WIZARD® SV Gel and PCR Clean-Up System, siguiendo el protocolo del proveedor (Promega Corporation, 1999). Se adicionaron 50µl de la solución 1 al gel de agarosa conservado en tubos eppendorf, se disolvió a 65°C. Se transfirió el mix del gel diluido a una mini columna insertada en un tubo colector y se incubó a temperatura ambiente por 1.0 min, se centrifugó a 14,000 RPM durante 1.0 min y se decantó el sobrenadante del tubo colector. Posteriormente se realizaron dos lavados con 700µl de la solución 2 y se centrifugó a 14,000 RPM por 3.0 min, se decantó el sobrenadante del tubo colector. Se transfirió la mini columna a un tubo eppendorf estéril y se dejó secar a temperatura ambiente. Se adicionaron 50µl de agua libre de nucleasas, se incubó a temperatura ambiente por 5 min y se centrifugó a 14,000 RPM por 1 min, se desechó la mini columna, el producto se conservó ± 4°C. Los productos de PCR purificados se enviaron a secuenciar a MacroGen Korea (<http://www.macrogen.com/eng/>) en Seoul, Republica de Korea.

Las secuencias de cada espécimen de Mosca Sierra se limpiaron y ensamblaron en el módulo SeqMan Pro del programa DNASTAR Lasergene Molecular Biology 16. Posteriormente cada uno de los ensamblados se sometieron a un análisis de homología BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) contra la base de datos de nucleótidos del National Center of Biotechnology Information (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), así mismo se analizaron en la base BOLD SYSTEMS.

### Construcción de la base de datos de secuencias de Mosca Sierra

Para los análisis filogenéticos, se realizó una búsqueda de secuencias de referencia de los géneros *Neodiprion*, *Zadiprion* y *Monoctenus* en la base de datos del Gen Bank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), de acuerdo a la información taxonómica previa de los especímenes y al análisis de homología, todas las

secuencias descargadas correspondieron a amplificaciones del gen Citocromo C Oxidasa, subunidad I (COI).

### **Construcción de árboles filogenéticos**

Se realizaron tres análisis filogenéticos diferentes para cada uno de los géneros de Diprionidae (*Neodiprion*, *Zadiprion* y *Monoctenus*) y se incluyeron los ensamblajes obtenidos a partir de la secuenciación de los ejemplares de las colectas y las bases de datos de referencia resultado de la búsqueda en el Gen Bank, además, se hizo un cuarto análisis en el cual solo se incluyeron las secuencias de los ejemplares en estudio de este proyecto. Todas las secuencias se alinearon con el método clustal con el programa CLUSTAL OMEGA 1.2.2 (Sievers y Higgins, 2014) y se realizó la búsqueda del mejor modelo de sustitución de nucleótidos con el programa ModelTest-NG (Darriba *et al.*, 2019). La reconstrucción filogenética se realizó con inferencia bayesiana mediante Markov Chains Monte Carlo (MCMC), implementado en el programa BEAST v1.10.4 (Suchard *et al.*, 2018) con 1,000,000 de generaciones. Para la anotación del mejor árbol, se descartó el 25% de los árboles producidos y la probabilidad posterior se determinó con los árboles restantes. Para los cuatro análisis, se utilizó como fuera de grupo la secuencia HM114320 del GenBank correspondiente a *Sirex noctilio* Fabricius, 1793 (Hymenoptera: Siricidae(<http://barcodeoflife.org>)).

### **Fenología de Moscas Sierra**

Cabe mencionar que en el protocolo inicial sobre la determinación de la fenología de las especies de moscas sierra se consideró seguir la fenología de *Neodiprion omosus* en Tecpan de Galeana Guerrero y para *Zadiprion falsus* en Yecora, Sonora o en Chihuahua; sin embargo, por problemas seguridad en dichos sitios (Comunicación personal de los enlaces de Sanidad: Ing. Juan Carlos Gómez Núñez en Guerrero y Biol. Juan Antonio Olivo Martínez en Chihuahua) no se llevó a cabo dicha actividad en los sitios señalados. En esta actividad se monitoreo la fenología de *Zadiprion rowheri* en Tamaulipas, *Neodiprion omosus* en Aguascalientes, *Monoctenus* sp. en Ixcateopan de Cuauhtémoc, Guerrero, *Zadiprion* circa *rowheri* en Atzalán, Veracruz.

#### **Miquihuana, Tamaulipas**

Esta actividad se inició desde el 22 de noviembre de 2017 en el paraje “Mesa del Jaralillo” (23°38’39.2’’; 99° 50’37.2’’ y 2,210 msnm) del ejido Servando Canales, Miquihuana Tamaulipas se seleccionaron 26 *Pinus cembroides* con infestación por *Zadiprion rohweri*. El sitio fue visitado en forma quincenal durante todo 2019 por el PSP Ing. Hugo Enrique Borja Nava con la finalidad de observar la recuperación de la población y consignar los diferentes estadios de la plaga.



Figura 1. Aspecto de larvas y adultos de *Zadiprion rohweri* afectando *Pinus cembroides* en Miquihuana, Tamaulipas.

### ***Ixcateopan de Cuauhtémoc, Guerrero***

Esta actividad se inició desde el 24 de enero de 2017 y se continuó hasta septiembre de 2019 en dos sitios con registro de daños por *Monoctenus* sp. sobre *Juniperus fláccida*: los sitios fueron; La Barranca (18° 32'5.56''; 99°47'15,6'') y Antes de Ixcateopan (18°30'17.37''; 99° 47'4.81). El monitoreo de la población durante el año estuvo a cargo de la PSP Ing. Estefania Grizzel Piza Núñez.

### ***CEPAB, Aguascalientes***

La presencia de la plaga en los pinos dentro de las instalaciones del CEPAB se consideró como la presencia de la plaga en forma natural. Los adultos obtenidos de estas poblaciones escapadas, se emplearon para inducir infestaciones artificiales (González *et al.*, 2013), que se mantuvieron bajo condiciones de campo hasta que las larvas llegaron al cuarto estadio y se cortó la rama para ponerlos en la incubadora para evitar que la larva abandonara el árbol y se bajara a pupar al suelo, considerándose que la diferencia entre el tiempo de la pupación de la incubadora y la de forma natural es de dos o tres días. Los datos se tomaron dos veces por semana consignándose la duración del periodo de huevecillo, primer estadio larvario (por la presencia de las mudas), el tercer estadio y cuarto estadio, días a pupación desde la emergencia. La toma de datos estuvo a cargo de la PSP Ing. Yahaira Elizabeth Rodríguez Cruz.

### ***Atzalán, Veracruz***

Durante 2019 en dos localidades de Atzalán, “Xicotes” (19°52' 03''; 97°14'19'' y 836 msnm) y “Arroyo Colorado” (19°52'40'';97°14'16'' y 892 msnm) se etiquetaron arbolitos de *Pinus chiapensis* afectados por *Zadiprion* circa *rowheri* mientras que en “Xico” la mosca sierra fue *Neodiprion omosus* y el pino fue *Pinus patula*. Para seguir el desarrollo de la población mediante visitas quincenales por el PSP Ing. David Machuca Pérez.

### **Sitios con presencia de Virus de Poliedrosis Nuclear**

Larvas oscuras con posibilidad de presencia de VPN se enviaron al Dr. Alejandro Pérez Panduro (CP) para la posible detección y aislamiento de un VPN asociado a las larvas, en primera instancia se mandaron larvas que se tenían del proyecto CONAFOR 2010-CO2NUM: 147913 conservadas en frascos con silica gel o en seco. Mientras que con la finalidad de establecer líneas de células de las moscas sierra se envió material biológico al Dr. Estefan Miranda Miranda (CENID Parasitología)

### **Incremento de Poblaciones de moscas sierra**

Las poblaciones de larvas recolectadas durante los recorridos en los diferentes sitios de muestreo se criaron con el mismo follaje del árbol afectado dentro de botes de plástico de un galón con una tapa de malla de organza en un extremo, Los botes se ubicaron dentro de una incubadora Binder a 26°C y 14:10 L:O, sin humedad controlada, con la finalidad de obtener pupas y en forma posterior adultos.

Para el incremento de las poblaciones se siguió la metodología de González *et al.* (2013) que consiste en encerrar un pino con una jaula de malla e introducir en su interior 3 hembras y 3 machos. Ubicando el pino dentro de una cámara bioclimática con temperatura, humedad y luz controlada, dejar 3 días en exposición y sacar para confirmar la presencia de oviposiciones, así como el inicio de la eclosión de las larvitas; dejar en condiciones ambientales de laboratorio hasta el segundo estadio y después colocar las larvitas en bolsas zip lock y meter en la cámara bioclimática. Debido a problemas con la temperatura en la cámara bioclimática se modificó, la metodología de incremento. La inducción de la oviposición se hizo a temperatura ambiente en las instalaciones del Campo Experimental Pabellón (INIFAP-CIRNOC-CEPAB) donde existe una población de diferentes tipos de pinos.

Con la finalidad de obtener un método de cría de moscas sierra en forma artificial se recolectó follaje de pinos hospederos de los diferentes géneros de mosca sierra, (*P. douglasiana* para *Zadiprion*, *Juniperus fláccida* para *Monoctenus* y *P. leiophylla* para *Neodiprion*), el follaje se secó y molió y se llevó el 28 de septiembre de 2018 al Dr. Alejandro Pérez Panduro del CP para la formulación de dietas con las cuales criar las larvas de *Neodiprion omosus* del CEPAB, Aguascalientes y *Monoctenus* sp. de Ixcateopan de Cuauhtémoc, Guerrero. En forma posterior el 16 de octubre de 2018 se enviaron larvas de primer estadio de *Zadiprion* sp., obtenidas de Guachochi, Chihuahua, afectando a *P. durangensis*, para tratar de criarlas con dieta artificial.

Para el establecimiento de líneas de células se procesaron 120 pupas así como aproximadamente 250 mg de huevos de *Zadiprion rowheri* y *Neodiprion* sp mismas que se prepararon para el aislamiento de células embrionarias acorde al procedimiento descrito previamente (Rocher *et al.*, 2004), brevemente se dividieron las pupas y huevos en lotes de 20 pupas y 50 mg de huevos y se sometieron por separado a procedimientos de esterilización tres lavados en hipoclorito de sodio al 10% seguidos de otros tres lavados en solución de Benzal al 10% para finalmente lavar cada lote con solución de antibiótico/antimicótico 1X diluido en agua estéril (ABAM® GIBCO). Una vez estériles las muestras de pupas y/o huevos se maceraron cuidadosamente usando un mortero de porcelana estéril tratando de disgregar los órganos internos en el caso de las pupas y las células embrionarias en el caso de los huevos pero sin llegar a dañar las células objetivo del cultivo. Se transfirieron los macerados a un colador de células estéril (Cell Strainer® BD FALCON) y se sometieron a centrifugación en un tubo Falcon de 15 ml a 1000 g durante 10 min. Los sedimento conteniendo una mezcla de células de todo tipo se resuspendieron en medio mínimo esencial (MEM GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino y ABAM 1X, las células re suspendidas se sometieron a cultivo en atmosfera de CO<sub>2</sub> al 2.5% a una temperatura de 28°C con cambios de medio cada tercer día.

### ***Distribución de especies de moscas sierra***

Para obtener los mapas de la distribución de las especies de moscas sierra se consideró la información escrita en los diferentes medios, tesis, artículos, publicaciones, folletos e informes, así como los registros de condiciones epidémicas de moscas sierra registrados por la Gerencia de Sanidad de la CONAFOR a partir del 2007, esta última información se solicitó directamente a dicha institución, así como los datos de recolectas de material por los colaboradores del proyecto. Se consideraron dos categorías 1) endémicos cuando se le ubica en uno o varios árboles en menos de cinco hectáreas, 2) Epidémico cuando la infestación se ubica en forma dispersa en un área que puede iniciar en 5 -10 ha, incrementándose cada año en una región dada y donde se han realizado acciones de combate. Los registros se consideraron como: a) históricos cuando las fechas de detección eran antes de 2,000, b) recientes del 2,000-2,015 en este caso existen registros obtenidos por el personal que los detectó y aún hasta material biológico y c) actuales, cuando los reportes se ubican del 2,016 al 2,018 y se les ubica como activos o vigentes, en los cuales el área afectada está creciendo o el brote presenta uno o dos años. El material fue depurado por el MC Ernesto González Gaona y enviado al Dr. Víctor López Martínez para su análisis y elaboración de mapas de distribución.

## **Resultados**

### ***Obtención de material biológico***

De acuerdo a comunicación vía telefónica o correo electrónico con los enlaces de Sanidad de la CONAFOR en los diferentes estados, manifestaron que no tenían reportes de daños o presencia de mosca sierra en los siguientes estados Campeche, Ciudad de México, Colima, Nuevo León, Sinaloa, Zacatecas y Yucatán. En Tlaxcala se tienen noticias de detección de moscas sierra y ya se contactó con la MC. Luz Oliva Muñoz Cabrera para realizar un viaje de recolecta de material biológico en esta entidad que se realizará cuando la MC Luz Oliva indique que esta la presencia de la plaga.

Se recolectó material biológico de los estados de:

Aguascalientes (CEPAB, se recolectaron larvas escapadas en años anteriores de pruebas de incremento de *N. omosus* y que afectan *Pinus leiophylla* a un costado del auditorio, las larvas se emplearon para incremento de una colonia de *N. omosus* en el CEPAB. Se agregó un nuevo registro de *N. omosus* en la comunidad de “La Congoja” en *Pinus leiophylla* en una casa en calle lateral atrás de la Iglesia del Pueblo). Se le dio seguimiento a la presencia y aparición de las dos especies de *Zadiprion* spp. detectadas durante el primer año (*Z. townsendi* y *Zadiprion* nv. sp. de las cuales se está realizando un escrito para describir y nombrarlas ya que se considera que son dos especies no consideradas en la revisión del género por Smith et al., 2010).

Para el estado de Chiapas el 23 de octubre de 2019 se programó un viaje a recolectar material biológico en el Cuartel Militar de San Cristobal de las Casas 16°39'51''; 92°34'12'', 2,235 msnm, donde ya se ha detectado la presencia de *Zadiprion* sp. y en otra detección cerca de lagunas de Montebello; sin embargo no se pudo obtener el permiso ya que no se permite el ingreso a las instalaciones por lo ocurrido en Sinaloa el 17 de octubre y aunque se fue al segundo sitio no fue posible detectar la presencia de la paga (Comunicación personal con el PSP Raúl Fernando Álvarez Narcia).

En Chihuahua, del 13 al 15 de febrero se muestreo la mesa del manzano en Guachochi (26°49'53.4'N; 100°57'24.9'') en este caso las larvas era de segundo estadio, la especie causante del ataque se ubicó como *Zadiprion ojedae* atacando *P. durangensis* se enviaron ejemplares al CENID PAVET y al Dr Alejandro Pérez Panduro del Colegio de Posgraduados para pruebas de cría y aislamiento de VPN el 19 de febrero de 2019. El 15 de mayo se monitoreo el paraje Alto del álamo del ejido San Carlos, Balleza (26°28'20.1'' N; 106°36'58.2''W y 2,601 msnm), donde se detectó ataque de *Zadiprion ojedae* sobre *Pinus durangensis* en este caso las larvas ya se encontraban en cuarto y quinto estadio y se recolecto material para enviar para pruebas de detección de infección viral a los colaboradores citados. El 16 de mayo, se visitó el Santuario de la cotorra serrana dentro del Área de Protección de Flora y Fauna Campo Verde (APFFCV) dentro del Ejido Socorro Rivera, en Ciudad Madera, donde se tenía conocimiento de ataques sobre *Abies concolor* paraje “Cinco Millas”

(29°19'23.8"N; 108°12'40.3"y 2620 msnm) y el paraje "Las cebadillas" *Pseudotsuga menziesii* (29°19'38.4"N; 108°12'4.5" y 2,498 msnm. En este sitio se menciona que se había detectado la plaga desde 2016. Durante este y siguientes recorridos nos acompañaron personal del APFFCV (Biólogo Alejandro Gómez Nisino, Bióloga Ana Adeliz Rascón Mendoza y Bióloga Aracely Duarte entre otros) en mayo la plaga se encontraba en larvitas de segundo estadio, para el 13 de junio se observaron larvas más grandes y se detectó otro sitio de ataque sobre *Pinus strobiformis* que se encontraban junto a *A. concolor* atacados (29°19'25.3"N; 108°12'36.9" W y 2,729 msnm) en esta ocasión las larvas eran más grandes, tercero y cuarto estadio, en este caso se tomó una muestra y se llevó al laboratorio del CEPAB donde se alimentaron con follaje del hospedero y se obtuvieron pupas. Debido a que empezaron a emerger adultos en el laboratorio se realizó una tercer revisión para constatar si ocurría lo mismo en campo, el 23 de septiembre se detectaron en campo ocho adultos (6 hembras y 2 machos) y la presencia de huevecillos en el hospedero. Este hallazgo se reportará como un artículo o nota científica donde se consigna el primer reporte de *Neodiprion abietis* para México.

El 09 de julio se fue a la norteña dentro del ejido "El Largo" de Ciudad Madera, se visitó la parcela de mayito (29°40'55.7"N; 108°26'02.4"W y 2,104 msnm) y sitios aledaños donde se ubicó un ataque por *Zadiprion falsus*. sobre *P. durangensis* en alrededor de 180 ha, en esta ocasión las larvas ya se encontraban en últimos estadios y la mayoría de la población ya se había enterrado para pupar. El 23 de septiembre ya no se pudo ir a recolectar material biológico por problemas de seguridad (Comunicación Personal con A. Olivo enlace de Sanidad de la CONAFOR).

Coahuila, se realizaron dos viajes a sitios con reportes de daños; sin embargo, no fue hasta el 17 de octubre que se logró detectar la presencia de *Zadiprion rowheri* en estado larvario aunque en poca cantidad ya que personal de PROFAUNA habían realizado acciones de combate. Se encargó al personal de dicha institución el apoyo para la recolecta de material biológico para el estudio. En este estado nos apoyo, el personal de la CONAFOR para los recorridos (Ing. Erick Ricardo Covarrubias A).

Durango, en este caso el Ing. Luis Aguilar Vitela de la Comisión Forestal Gobierno del estado, donó el 26 de septiembre larvas de cuarto estadio de *Zadiprion falsus* de la zona de Pueblo Nuevo, que fueron enviadas al Dr. Alejandro Pérez Panduro para el incremento de VPN.

Guanajuato, el 15 de agosto, nos acompañó la Bióloga Magda Vianey Nava Navarrete a visitar el paraje "Llano Grande" en Xichu (21°16'9.9"N 100°03'13.0" W y 2,100 msnm)) se revisaron 30 árboles de *Juniperus fláccida* y en la mayoría se encontraron larvas aunque en poblaciones bajas, con respecto a los años pasados. Se fotografió un adulto momificado y al parecer es de

*Monoctenus sanchezi*. Del material recolectado unos se desarrollaron a pupa y otros se llevaron a Jiutepec, Morelos para desarrollar una línea de células de esta especie.

Guerrero, el 28 de mayo se visitó el paraje El Centinela (17° 53'58.6''N; 101°33'54.36''W y 1629 msnm) de la Colonia General Baltazar R. Mancilla municipio de la Unión de Isidoro Montes de Oca en este lugar ya no existían larvas y se recolectaron pupas del suelo, así mismo se detectó un árbol donde había una epizootia ya que se observaron muchas larvas muertas alrededor de un árbol, mientras que de La Laguna de Oxidación en Ixcateopan (18°30'17.37''; 99° 47'4.81), la regidora María Dolores Bustamante Cirilo y su grupo de trabajo recolectaron pupas de *Monoctenus* sp. del suelo de *Juniperus fláccida* afectados por moscas sierra, que nos proporcionó para estudios de detección de VPN y de identificación específica.

En Hidalgo, el ing. Eduardo Vargas Solís nos acompañó a visitar el predio donde se había aplicado contra el agallador *Andaricus querculae* y donde había observado la presencia de mosca sierra. Acaxochitlan (20° 12'19.9''N; 98° 14'49.6'' y 2,252 msnm) se observaron varios árboles con muy pocas larvas de *Neodiprion* sp. afectando *P. patula*. Otro punto de detección fue la escuela en San Miguel el Resgate (20°13'32.7''N; 98° 10'54.8''W y 2,175 msnm) en donde se observaron tres árboles de *P. montezumae* dentro de un jardín con múltiples ataques de *Neodiprion* sp.

Michoacán, el Ing. Hipólito Jesús Muñoz Flores y el Dr. Víctor Manuel Coria Avalos detectaron en forma endémica en la sierra Puérhpecha a *Neodiprion omosus* afectando preferentemente sobre *Pinus pseudostrobus* en varias localidades Cuadro 4.

Cuadro 4. Localidades/parajes muestreados con presencia de "Mosca Sierra" (*Neodiprion omosus* Smith), en el área de influencia de la Sierra Puérhpecha, Michoacán.

PARAJE	COORDENADAS	ALTITUD (msnm)	HOSPEDERO
<b>Comunidad Indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro</b>			
La Alberca	N 19°27'37.4" Y W 102°11'46.3"	2,568	<i>P. pseudostrobus</i>
Parío	N 19° 26' 39.4" Y W 102° 10' 21.4"	2,694	Regeneración natural de <i>Pinus pseudostrobus</i>
Condenbaro	N 19°28'57.2" Y W 102°12'24"	2,520	<i>P. pseudostrobus</i>
La Cruz	N 19° 27' 40.2" Y W 102° 12' 04.3"	2,605	Reforestación de <i>Pinus pseudostrobus</i> y árboles de <i>P. leiophylla</i>
Gómez	N 19° 29' 25.7" Y W 102° 11' 08.1"	2,476	Regeneración natural de <i>Pinus pseudostrobus</i>

<b>Patzingo</b>	N 19°29'23" Y W 102°12'07.9"	2 446	Regeneración natural de <i>P. pseudostrobus</i>
<b>Área de ecoturismo Patzingo</b>	N 19°29'42" Y W 102°11'57.5"	2 437	Área de ecoturismo de "Patzingo" árbol de 3 m de alto de <i>P. ayacahuite</i> fuertemente infestado de mosca
<b>Patzingo-2</b>	N 19°24'13.4" Y W 102°11'35.2"	2 520	Reforestación bajo dosel de <i>P. pseudostrobus</i>
<b>Canuto</b>	N 19°28'41.6" Y W 102°09'21.6"	2 270	Reforestación bajo dosel de <i>P. pseudostrobus</i> de 1.30 m
<b>Patzingo</b>	N 19°29'33" Y W 102°11'56.7"	2 464	Árboles plantados como cerco vivo de <i>P. ayacahuite</i>
<b>Cutzato</b>	N 19° 29' 39.8" Y W 102° 11' 31.8"	2, 502	Regeneración natural de <i>Pinus pseudostrobus</i>
<b>El Tejamanil</b>	N 19° 24' 16.7" Y W 102° 14' 12.7"	2,650	Plantación experimental de <i>P. pseudostrobus</i>
<b>La Cabaña de Piedra</b>	N 19° 29' 38.7" Y W 102° 12' 07.8"	2,428	Reforestación de <i>Pinus pseudostrobus</i> en terreno de cubierto por arena volcánica
<b>San Nicolás</b>	N 19° 26' 43.8" Y W 102° 14' 13.0"	2,676	Regeneración natural de <i>Pinus teocote</i>

#### **Comunidad Indígena de Patamban, Michoacán.**

<b>El Llano</b>	N 19° 45' 44.0" y W 102° 15' 45.9"	2,473	Reforestación de <i>Pinus pseudostrobus</i>
<b>La Cuesta</b>	N 19° 45' 46.8" y W 102° 17' 27.2"	2,440	Reforestación de <i>Pinus pseudostrobus</i>
<b>La Cuesta-2</b>	N 19° 23' 37.5" y W 102° 03' 06.1"	2,439	Reforestación de <i>Pinus pseudostrobus</i>

#### **Comunidad Indígena de Santa Cruz Tanaco, municipio de Cherán**

<b>La Escondida</b>	N 19° 43' 37.37"y W 102° 03' 10.78"	2,180	Reforestación de <i>Pinus pseudostrobus</i>
---------------------	-------------------------------------	-------	---

Oaxaca, el 28 de agosto se visitó el Paraje Estanzuela Grande de la Reforma Putla (16° 39'42.7"N; 97°51'23.7"W y 962 msnm) en esta localidad estaban aplicando biológicos para control de *Neodiprion bicolor*, aunque las larvas ya habían bajado a pupar y solo se encontraron larvas aisladas de *Zadiprion* sp.

Puebla, se colectaron larvas de *Neodiprion* sp. afectando *Pinus patula* en Pahuatlan del Valle (20° 15'30.9"N; 98°12'00.8"W y 1994 msnm), solo se detectó un árbol afectado.

Tamaulipas, Mesa del Jaralillo" Ejido Servando Canales, Miquihuana, (23°38'39.2"; 99° 50'37.2" y 2,210 msnm), se continuó monitoreando la fenología de la larva; sin embargo, el retraso de las lluvias, ocasiono que los

adultos se presentaran hasta octubre y al 22 de octubre se observaron las primeras larvitas de segundo estadio y todavía existen hembras ovipositando.

Veracruz se siguió monitoreando la fenología por parte del PSP, el Ing. David Machuca en “Xicotés” (19°52' 03''; 97°14'19'' y 836msnm) y “Arroyo Colorado” (19°52'40'';97°14'16'' y 892 msnm). Se detectó un sitio adicional en Area Natural Protegida Pancho Poza del municipio de Altotonga, se observaron 10 árboles de *P. strobiformis* afectados por *Neodiprion* sp. de plantaciones de ornato de 2.5 m de alto

Con el material Biológico conservado y el recién recolectado se formularon colecciones para las diferentes estrategias de identificación y envió para detección de VPN o para el establecimiento de líneas células. En los envíos se incluyó material de los estados Aguascalientes, Baja California, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Durango, Jalisco, Guerrero, Guanajuato, Michoacán, Oaxaca, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas y Veracruz. La colección de larvas se le entregara a la CONAFOR un vez que se halla identificado la mayoría de los ejemplares con precisión.

### ***Identificación de moscas sierra (morfológica y molecular)***

#### ***Complejo de especies de *Zadiprion rowheri****

De acuerdo a las claves y descripciones de adultos y larvas hechas por Smith (1971), Wong y Szlabey (1986) y Smith *et al.* (2012), durante el transcurso de la primera etapa del proyecto, se determinó la identidad de *Zadiprion rohweri* presente en la Sierra de San Pedro Mártir, Ensenada, Baja California, especie que se alimenta de *Pinus jeffreyi* (Durante 2019, se trató de ir a recolectar material biológico de la especie; sin embargo, no se obtuvo el permiso de los encargados del área natural protegida ya que se menciona que este pino esta bajo protección). Muy cercanas a esta especie, además se examinaron dos especies de *Zadiprion*; una en Miquihuana, Tamaulipas y otra en Atzalán, Veracruz, las cuales presentan el primer anillo de la lanceta en forma de herradura invertida, característica distintiva de *Z. rohweri*; sin embargo, la coloración de las larvas es totalmente distinta, especialmente de la especie presente en Veracruz en las que predomina el color negro, y además ataca a *Pinus chiapensis*, especie diferente al grupo de los pinos piñoneros (Figura 2).

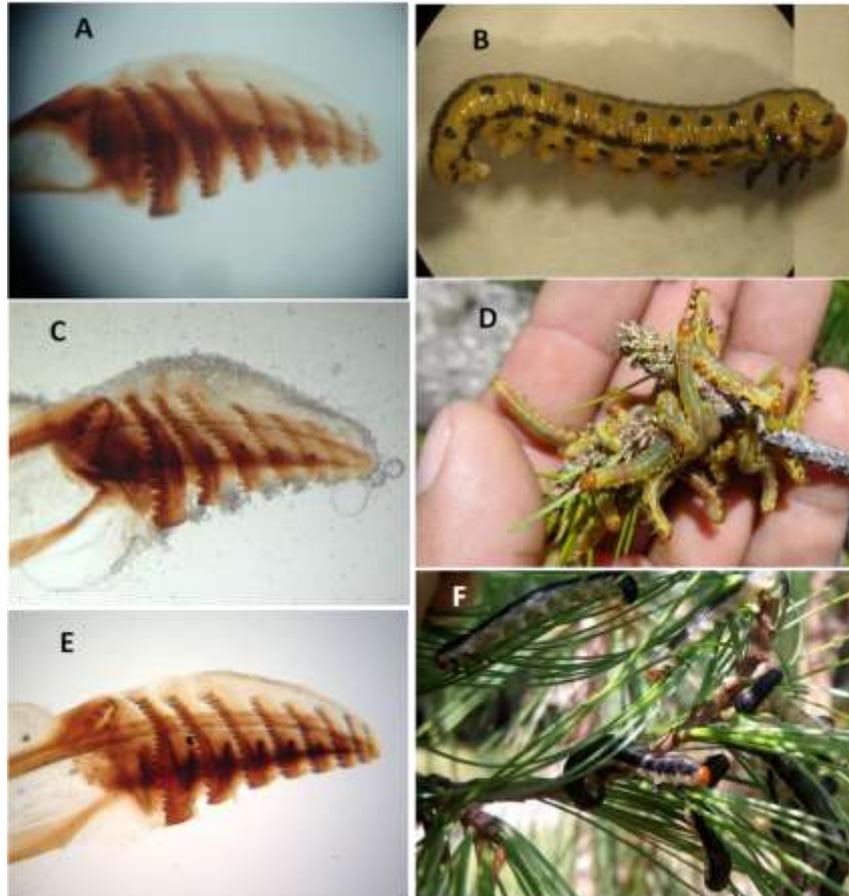


Figura 2. Lanceta de la hembra y aspecto de las larvas de *Zadiprion rohweri* presente en la Sierra de San Pedro Mártir, Ensenada, Baja California (A y B); *Zadiprion sp. circa rohweri* presente en Miquihuana, Tamaulipas (C y D); *Zadiprion sp. circa rohweri* presente en Atzalán, Veracruz.

Aunque de momento se ha clasificado a la especie que ataca a *Pinus chiapensis* en Veracruz como *Zadiprion sp. circa rohweri*, las siguientes características distintivas se utilizarán para proponerla como una nueva especie: En la hembra, la parte inferior del escutelo es menos angulado que el escutelo de *Zadiprion rohweri* de Tamaulipas. El área alrededor de los ocelos es immaculada y los márgenes internos de los ocelos laterales son abultados, con puntuaciones y setas abundantes. La antena de la hembra tiene entre 21 y 23 segmentos, adicionales al escapo y pedicelo, con media y moda de 22 (n = 9). Las antenas no presentan coloración oscura en los últimos cuatro segmentos o apenas es ligeramente oscura. En cuanto a la lanceta, aunque presenta la forma de herradura invertida como ocurre en *Z. rohweri*, se aprecian diferencias cuando se compara con las ilustraciones de Smith (1971) y con ejemplares de *Z. rohweri* procedentes Baja California. La lanceta presenta un pseudo anillo con hasta cinco pseudo dientes entre el primer y segundo anillo y una proyección oscura en cada anillo a lo largo de la lanceta, lo cual es diferente a las ilustraciones de la lanceta de *Z. rohweri* que no presenta ese pseudo anillo ni la proyección

oscura en cada anillo. En el caso de los machos, éstos presentan sus alas café oscuras; y en cada órbita superior de los ojos está presente una mancha amarilla, similar a lo que se describe para *Zadiprion rohweri*; sin embargo, esta característica aparentemente existe para varias especies de *Zadiprion* por lo que se descarta como característica determinante. Además, como se aprecia en la Figura 2, las larvas de *Zadiprion rohweri* son de color claro con puntos negros muy marcados en la parte lateral del mesotórax y metatórax; puntos negros grandes en ambos lados de cada segmento abdominal y pequeños puntos debajo de cada espiráculo abdominal; mientras que las larvas de *Zadiprion* sp. *circa rohweri* presente en Aztatlán, Veracruz, presentan franjas negras que cubren completamente ambos lados del mesotórax, metatórax y abdomen, careciendo además de puntos negros debajo de los espiráculos abdominales.

### ***Zadiprion* spp. en Aguascalientes**

Durante la primera etapa del proyecto se registraron dos especies de *Zadiprion* encontradas en San José de Gracia, Aguascalientes (Figura 3). Constituyendo esto en el primer reporte del género en el estado y una nueva distribución de las especies de este género.



Figura 3. Larvas de *Zadiprion townsendi* en follaje de *Pinus teocote* (izquierda) y de *Zadiprion* sp. consumiendo follaje de *Pinus michoacana*, en San José de Gracia, Aguascalientes. Nuevos registros del género *Zadiprion* para el estado de Aguascalientes.

De las dos especies de *Zadiprion* descubiertas en la Sierra Fría de Aguascalientes, en la primera etapa del proyecto, la primera de ellas que utiliza como hospedero a *Pinus teocote*, había sido clasificada como *Zadiprion* sp. *circa townsendi*; sin embargo, después del montaje y observación del ovipositor, se encontraron las siguientes diferencias: *Zadiprion townsendi* presenta un primer anillo con 11 a 13 dientes, el segundo con 14 dientes claramente definidos, mientras que la especie observada presenta un primer anillo con solo seis a siete dientes y el segundo con 10 a 11 anillos distinguibles. Por otra parte, el segundo

y tercer anillo de *Zadiprion townsendi* son ligeramente convergentes, mientras que en la especie observada son marcadamente convergentes. Una tercera diferencia observada es que la parte ventral del ovipositor en *Zadiprion townsendi* es ligeramente recta, mientras que en la especie observada es curva (Figura 4). Estas características morfológicas, además de la diferencia en la coloración de las larvas, nos llevan a la conclusión de que se trata de una nueva especie, esperando sea corroborado a través de los análisis moleculares. Para esta especie se obtuvo la emergencia de dos ejemplares adulto hembra, uno de los cuales fue disectado para la observación detallada del ovipositor y el otro conservado completo para la descripción de la especie

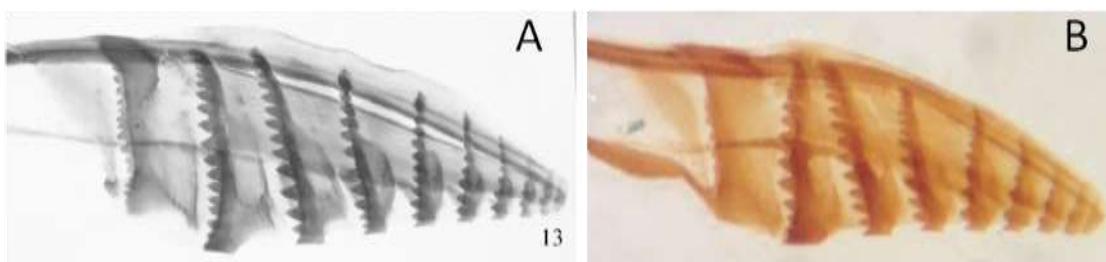


Figura 4. A) Ovipositor de *Zadiprion townsendi* según Smith et al. (2012). B) Ovipositor de *Zadiprion* morfo especie 1 recolectado en la Sierra Fría, San José de Gracia, Aguascalientes, que utiliza como hospedero a *Pinus teocote*. Notar la diferencia en el número de dientes del primer anillo (Lado izquierdo) y la mayor convergencia de los anillos dos y tres en B.

De la segunda especie de *Zadiprion* que se encontró en la primera etapa del proyecto, alimentándose de árboles adultos de *Pinus michoacana*, y que fue clasificada inicialmente de como *Zadiprion* sp.; se pudieron obtener 17 hembras adultas y 4 machos, lo cual sirvió para poder observar el estado adulto y así como las características morfológicas del ovipositor. En este caso, el ovipositor difiere del de las especies descritas de este género y es ligeramente parecido al de *Zadiprion ojedae*; sin embargo, presenta las siguientes diferencias: ovipositor con 9 anillos en vez de ocho (Figura 5); en el adulto hembra, margen alrededor de los ocelos marcadamente negro en vez de un margen delgado o ausente, llegando la coloración negra hasta el margen superior de los ojos; escutum con color negro en la parte inferior de lóbulo medio y en la parte interna de de ambos lóbulos laterales; mesepisternum oscuro en vez de anaranjado (Figura 6). Las características fueron cotejadas con los especímenes tipo y paratipo que se encuentran en la Colección de Insectos Forestales del Campo Experimental Pabellón. Estas características además de la diferencia contrastante en la coloración de las larvas (verde claro en *Z. ojedae* y negras en la especie observada) nos hacen concluir que igualmente se trata de otra nueva especie de *Zadiprion*.

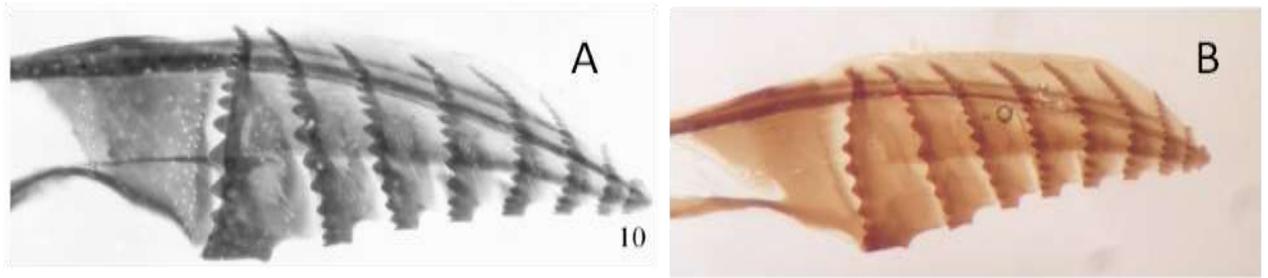


Figura 5. A) Ovipositor de *Zadiprion ojedae* según Smith et al. (2012). B) Ovipositor de *Zadiprion morfo especie 2* de la Sierra Fría, San José de Gracia, Aguascalientes. Nótese la diferencia en el número de anillos en *Z. ojedae* y al menor tamaño de dientes del primer anillo de *Z. morfo especie 2*.

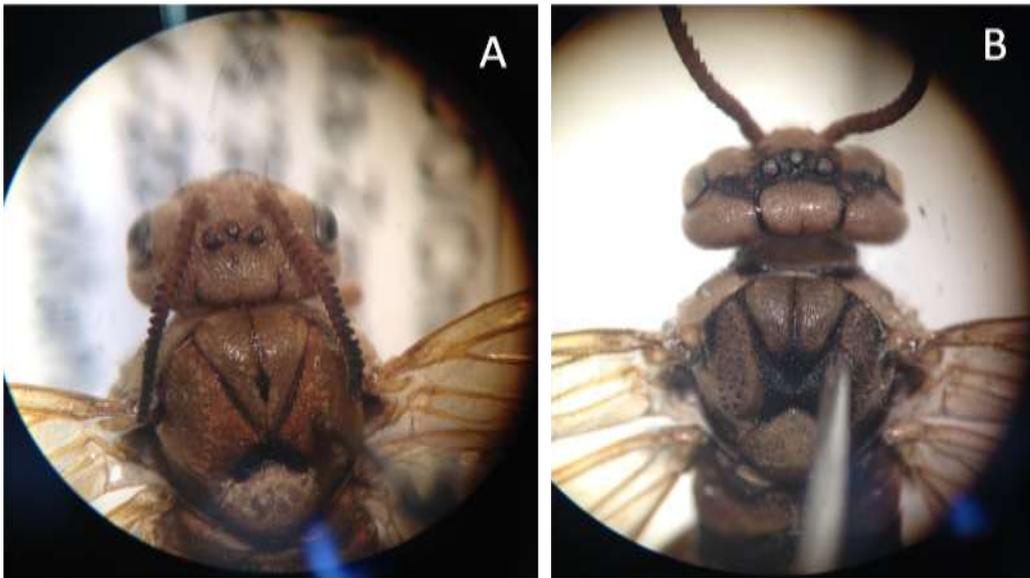


Figura 6. Cabeza y torax de *Zadiprion ojedae* paratipo hembrab(A) y *Zadiprion morfo especie 2*, hembra, de la Sierra Fría, San José de Gracia, de Aguascalientes (B).

Con base en los hallazgos de estas dos especies de *Zadiprion* en la Sierra Fría de Aguascalientes, se elaborará un manuscrito que será enviado para publicación en la siguiente etapa del proyecto. De momento, con propósitos de seguir los estudios taxonómicos y fenológicos, se denomina a estas dos especies como *Zadiprion morfo especie 1* y *Zadiprion morfo especie 2*.

### ***Zadiprion* sp. en Oaxaca**

También durante esta primera etapa se determinó la identificación correcta de *Zadiprion howdeni*, que se alimenta de *Pinus oaxacana* en la comunidad Santa Catarina, municipio de Ixtlán, en el estado de Oaxaca, cuya identidad fue corroborada a través del análisis morfológico de la lanceta de las hembras. Hasta antes de este proyecto, los productores y dependencias del sector forestal en Oaxaca tenían clasificada a esta especie como *Zadiprion falsus*. El 24 de agosto

de 2018 se hizo un comunicado oficial al M. C. Abel Plascencia González, Gerente de Sanidad de la Comisión Nacional Forestal, haciéndole saber de la corrección en la identificación de la especie.

### ***Monoctenus* spp. afectando a *Juniperus flaccida***

En cuanto al género *Monoctenus*, se recibieron muestras del estado de Guerrero recolectadas por el MC. Ernesto González Gaona, cuyas características morfológicas coinciden con una morfoespecie previamente recolectada en Guatemala (Smith *et al.* 2010). A diferencia de *Monoctenus sanchezi* y *Monoctenus sadadus*, que presentan 15 segmentos en sus antenas, los especímenes de Guerrero presentan antenas con 13 segmentos. Además, los antenómeros centrales son más cortos que los que presenta *Monoctenus sadadus*, pero más largos que los de *Monoctenus sanchezi*. Smith *et al.* (2010) menciona que la morfoespecie revisada de Guatemala puede tratarse de una especie distinta a las dos especies del género hasta ahora descritas y que falta un mayor número de especímenes para corroborar esa hipótesis. Los especímenes de Guerrero servirán para comprobar la hipótesis y en su caso describir la nueva especie.

### ***Neodiprion* sp. en Veracruz**

Respecto a especímenes de *Neodiprion*, se revisaron especímenes adultos procedentes del Ejido Zilacatipan, Huayacocotla, Veracruz, con fecha del 5 de septiembre de 2016, los cuales resultaron ser *Neodiprion bicolor*.

### ***Neodiprion* sp. en el sitio de anidación de la cotorra serrana**

Durante esta primera etapa se recolectaron el 28 de agosto de 2018, 20 pupas en el suelo de dos *Abies* sp, en el ejido Socorro Rivera en Ciudad Madera, Chihuahua, sitio previamente detectado por el Biol. Antonio Olivo Martínez y la Biol. Ana Adeliz Rascón Mendoza (Figura 7). Del material recolectado el 16 de septiembre emergieron un macho y una hembra, en forma complementaria se solicitó a la bióloga Ana Adeliz Rascón Mendoza fotografías de la detección en años anteriores. Para la identificación se consultó en internet si existían imágenes de *Neodiprion abietis*. En el sitio de Bold Systems para *Neodiprion* ([http://v3.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser\\_Taxonpage?taxid=104315](http://v3.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxid=104315)) se encontró una imagen que coincide con la hembra adulta emergida, por lo cual se considera que la especie en Ciudad Madera es *N. abietis* (Figura 8), lo cual constituye un nuevo registro de la especie en México. Se elaboró un artículo sobre la detección de esta especie, que esta en proceso de revisión y completar el aspecto molecular.



Figura 7. Características de hallazgo de mosca sierra en *Abies concolor* en 2017: A) aspecto de los sitios de anidación de la cotorra serrana occidental Ejido Socorro Rivera, municipio de Madera, Chihuahua, B) acercamiento del daño observado por moscas sierra y C) aspecto de las larvas que ocasionan el daño.

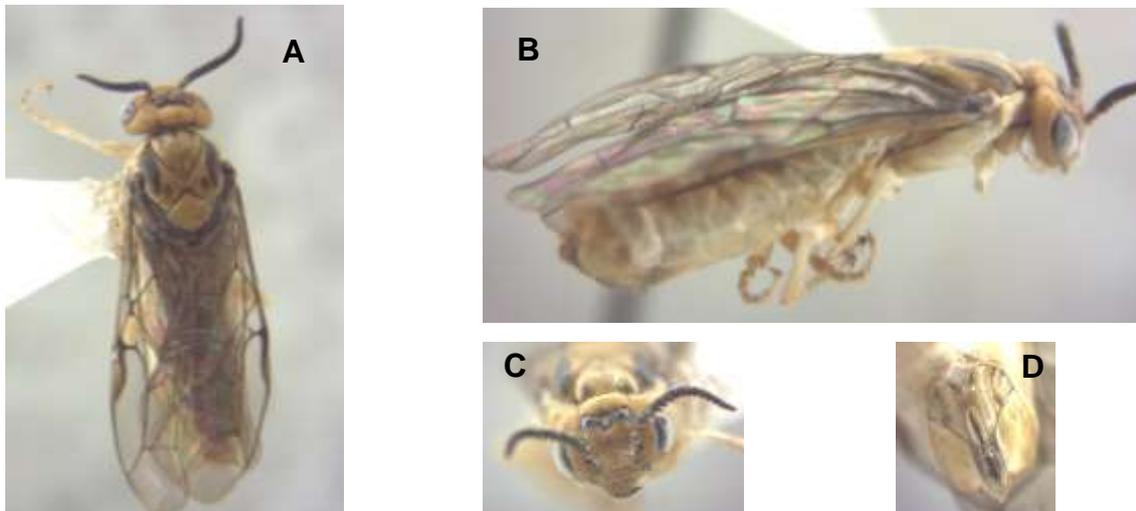


Figura 8. Aspecto de la hembra de *Neodiprion abietis* obtenida de pupas atacando *Abies concolor* en la Región Prioritaria para la Conservación Madera. A) dorsal, B) lateral, C) frontal de la cabeza y D) ventral del último segmento abdominal

### Extracción de ADN de diferentes partes del cuerpo

Con respecto a la extracción de ADN de las diferentes partes de la larva, el abdomen fue la sección que presentó las mayores concentraciones y calidad de ADN y para la PCR fue la que mejor amplificó, esto coincide con los resultados reportados por Gijón *et al* (2018), que determinaron que el abdomen fue el mejor para los estudios de PCR con la palomilla resinera (*Synanthedon novaroensis*). Para el caso de adultos las mejores fueron cabeza y abdomen. Los estudios moleculares mostraron que la banda del producto de PCR para larvas y adultos de Mosca Sierra fue de un peso aproximado de 740 pb del gen mitocondrial

citocromo C oxidasa subunidad I (Figura 9 y 10). Folmer *et al.* (1994) reportan una banda de amplificación de aproximadamente 700 a 710 pb para artrópodos para los cebadores universales LCO1490 y HCO2198. Gijón *et al.* (2016) obtienen un producto amplificado de 750 pb para coleópteros *Dendroctonus valens* e *Ips cribricollis*.

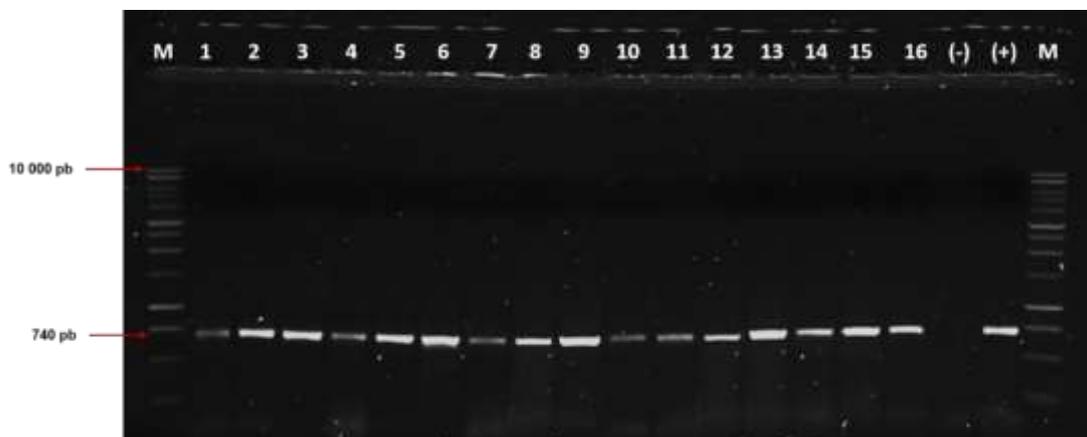


Figura 9. Productos amplificación por PCR con los primers LCO1490 y HCO2198. M: Marcador molecular 1kb; Carril del 1 a 16 muestras de larvas de Mosca Sierra; (-) Control negativo; (+) Control positivo; M: Marcador molecular 1kb).

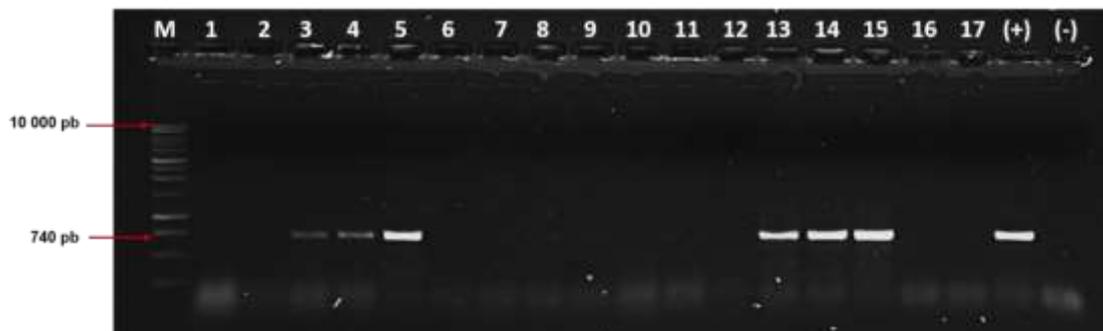


Figura 10. Productos amplificación por PCR con los primers LCO1490 y HCO2198. M: Marcador molecular 1kb; Carril del 1 a 17 muestras adultos de Mosca Sierra; (+) Control positivo; (-) Control negativo.

### **Análisis de homología de las secuencias de Mosca Sierra**

En cuanto a los análisis individuales, se construyó un catálogo para cada género con secuencias de referencia que correspondieran a mitocondrion, específicamente al gen citocromo C oxidasa subunidad 1 en base a una búsqueda en las bases de datos Taxonomy del NCBI. Para *Monoctenus* solo se encuentran depositadas 34 secuencias correspondientes a COI, sin embargo, el 60% de ellas corresponden solo a las especies *Monoctenus juniperi* y *Monoctenus obscuratus*, mientras que el resto se encuentran registradas a

género. *Zadiprion* solo cuenta con 4 secuencias registradas que corresponden a COI de las cuales solo dos se encuentran a especie, registradas como *Zadiprion rowheri*. Por último, el género *Neodiprion* es el más representativo, cuenta con 272 secuencias de COI, sin embargo, más del 90% de las secuencias contienen la unión de tres regiones: COI, tRNA<sup>Leu</sup> y COII, por lo cual se tuvieron que fragmentar y solo obtener la región correspondiente al gen de interés.

Los resultados del análisis de homología en BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en GenBank del National Center of Biotechnology Information) y Código de Barras BOLD SYSTEMS de las muestras de Mosca Sierra de describen el Cuadro 5.

Cuadro 5. Resultados del análisis de similitud en BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) VS Código de Barras BOLD para las muestras de Mosca Sierra.

Muestra	Región	BLAST			IDS de BOLD Systems	
		Descripción del alineamiento	Sequence ID	Identidad (%)	Género	Similitud (%)
CHIMPS	COI	<i>Neodiprion abietis</i>	<a href="#">JN294221.1</a>	94.53	<i>Neodiprion</i> sp.	96.83
CHIMAC	COI	<i>Neodiprion abietis</i>	<a href="#">JN294221.1</a>	94.53	<i>Neodiprion</i> sp.	96.84
CHIMPM	COI	<i>Neodiprion abietis</i>	<a href="#">JN294221.1</a>	94.53	<i>Neodiprion</i> sp.	96.83
CHIZ0	COI	<i>Zadiprion rohweri</i>	<a href="#">KF936531.1</a>	87.48	<i>Zadiprion rohweri</i>	88.58
GROZ1	COI	<i>Zadiprion rohweri</i>	<a href="#">KF936531.1</a>	87.63	<i>Zadiprion rohweri</i>	88.73
OAZXF2_36	COI	<i>Zadiprion rohweri</i>	<a href="#">KF936531.1</a>	87.97	<i>Zadiprion rohweri</i>	89.4
VERZR2	COI	<i>Zadiprion rohweri</i>	<a href="#">KF936531.1</a>	90.95	<i>Zadiprion rohweri</i>	92.13
AGSNO3	COI	PREDICTED: <i>Neodiprion lecontei</i>	<a href="#">XM_015658055.1</a>	91.14	<i>Neodiprion</i> sp.	92.41
JALZF10	COI	<i>Zadiprion rohweri</i>	<a href="#">KF936531.1</a>	87.8	<i>Zadiprion rohweri</i>	88.79
JALZF1_11	COI	<i>Zadiprion rohweri</i>	<a href="#">KF936531.1</a>	87.59	<i>Zadiprion rohweri</i>	88.64
GRON13	COI	<i>Neodiprion abietis</i>	<a href="#">JN294221.1</a>	92.55	<i>Neodiprion</i> sp.	93.62
OAZX21_17	COI	<i>Zadiprion rohweri</i>	<a href="#">KF936531.1</a>	88.4	<i>Zadiprion rohweri</i>	89.71
SLPMS19	COI	<i>Monoctenus</i> sp.	<a href="#">KF936592.1</a>	93.09	<i>Monoctenus</i> sp.	93.57
GROM2_2	COI	<i>Monoctenus</i> sp.	<a href="#">KR797365.1</a>	92.71	<i>Monoctenus</i> sp.	92.69
OAZXZ4_38	COI	<i>Zadiprion rohweri</i>	<a href="#">KF936531.1</a>	87.8	<i>Zadiprion rohweri</i>	88.99
CHIZ7_39	COI	<i>Zadiprion rohweri</i>	<a href="#">KF936531.1</a>	88.39	<i>Zadiprion rohweri</i>	89.55
CHIMZF	COI	PREDICTED: <i>Neodiprion lecontei</i>	<a href="#">XM_015658055.1</a>	93.1	<i>Neodiprion mundus</i>	94.92
DGOZF1	COI	<i>Zadiprion rohweri</i>	<a href="#">KF936531.1</a>	88.02	<i>Zadiprion rohweri</i>	89.14
MICHNO	COI	<i>Neodiprion abietis</i>	<a href="#">JN294221.1</a>	93.91	<i>Neodiprion</i> sp.	94.58
GTOM1_35L	COI	<i>Monoctenus</i> sp.	<a href="#">KF936592.1</a>	92.78	<i>Monoctenus</i> sp.	93.54
OAX2FL_31	COI	<i>Zadiprion rohweri</i>	<a href="#">KF936531.1</a>	87.78	<i>Zadiprion rohweri</i>	88.89
TAMPZR6	COI	<i>Zadiprion rohweri</i>	<a href="#">KF936531.1</a>	92.23	<i>Zadiprion rohweri</i>	93.72
GROM2_AD	COI	<i>Monoctenus</i> sp.	<a href="#">KR797365.1</a>	92.71	<i>Monoctenus</i> sp.	92.69

Las secuencias de los especímenes en estudio coinciden con el género, pero no con la especie que se tiene determinada taxonómicamente, esto porque en la base de datos del GenBank hay pocas secuencias y no existen en esta base las especies mexicanas. Se hará el registro en el GenBank y esto será una aportación importante de esta investigación. Por otra parte, al hacer la comparación con el Código de Barras de BOLD VS BLAS, se obtiene resultados similares no coinciden en la mayoría con las especies determinadas taxonómicamente, esto debido a que no hay secuencias de las especies en estudio (Cuadro 5).



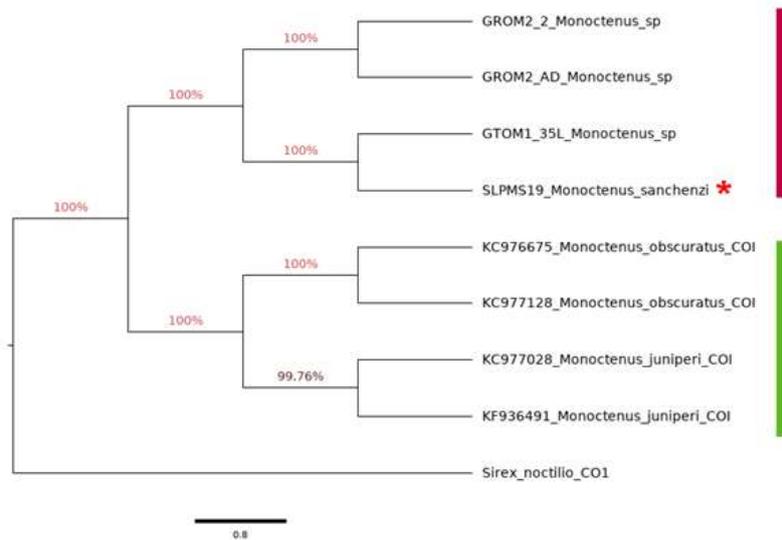


Figura 12. Árbol filogenético de consenso basado en inferencia bayesiana que ilustra la relación de las especies del género *Monoctenus* contenidas en las colectas.

Por otra parte, el árbol consenso para el género *Zadiprion* obtenido con 1,000,000 de generaciones y una desviación estándar final de 0.008970, se observan dos clados bien definidos. En el primer clado *Zadiprion ojedae* (CHIZO) se relaciona con el ejemplar CHIZ7\_39 con un soporte del 100% lo que indica que se tratan de la misma especie, al igual que los ejemplares OAX2FL\_31, OZXZ4\_38 y OAZX21\_17, los cuales, a su vez, se encuentran relacionados con un 99.45% de probabilidad con GROZ1. El agrupamiento entre *Z. falsus* y JALZF10 presenta un soporte muy bajo, menor al 50%, mientras que la relación de ambos con OAZXF2\_36 tiene una probabilidad posterior del 100%, por lo que se necesitará realizar un análisis de homología para definir las relaciones. Finalmente, ambas especies identificadas como *Z. rowheri* se agrupan en un mismo clado (100%) junto con las únicas especies de las bases de datos del GENBANK que corresponden a *Zadiprion rowheri* (Figura 13).



## Fenología de las moscas sierra

### *Zadiprion rohweri* en el municipio de Miquihuana, Tamaulipas

En Miquihuana, el 14 de diciembre se presentaron temperaturas muy bajas que ocasionaron que la población de larvas de esta localidad muriera. Esta especie muestra varias generaciones de adultos por ciclo (Figura 15) una emergencia en los tres primeros meses (enero a marzo) otra durante mayo-junio y la otra de agosto hasta noviembre, la época de menor presencia de los adultos fue en abril y julio. En épocas de mayor población cuando las temperaturas no son frías y no se retrasan las lluvias se presenta la generación de mayo-junio, en caso contrario se presentan solo las poblaciones de principios de año y la de agosto-noviembre. Esta especie no presenta una diapausa reproductiva y puede producir hasta tres generaciones por año.

Bajo las condiciones del CEPAB los adultos empezaron a emerger a partir del 13 de enero 2018 terminando el 30 de mayo, suspendiéndose la emergencia hasta octubre cuando emergieron un macho y una hembra el 08 y 14 de octubre, esto representa una generación con emergencia bimodal, aunque con la mayoría de la población emerge tres meses después de la formación de capullos. En total se obtuvieron 78 hembras y 60 machos. Bajo estas condiciones solo se presentaron parasitoides de la familia Tachinidae (27 especímenes). Las moscas Tachinidae son las primeras en emerger de los cocones y se mantienen aún durante la época de emergencia de los adultos. (Figura 16).

2014												
ESTADIO	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DIEMBRE
ADULTOS											XXXXXX	
HUEVECILLOS											XXXXXX	
LARVAS			XXXXXX								XXXXXX	
PUPAS												
2015												
ADULTOS			XXXXXX		XXXXXX	XXXXXX			XXXXXX			
HUEVECILLOS			XXXXXX		XXXXXX	XXXXXX			XXXXXX			
LARVAS		XXXXXX	XXXXXX		XXXXXX	XXXXXX			XXXXXX			XXXXXX
PUPAS												
2016												
ADULTOS								XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX		
HUEVECILLOS								XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX		
LARVAS		XXXXXX				XXXXXX		XXXXXX				
PUPAS												
2017												
ADULTOS	XXXXXX											
HUEVECILLOS												
LARVAS	XXXXXX											
PUPAS												
2018												
ADULTOS	XXXXXX		XXXXXX		XXXXXX	XXXXXX		XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX	
HUEVECILLOS			XXXXXX		XXXXXX	XXXXXX		XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX	
LARVAS												
PUPAS		XXXXXX					XXXXXX					

Figura 15. Época de aparición de los diferentes estados de *Zadiprion rohweri* atacando *Pinus cembroides* en Miquihuana, Tamaulipas

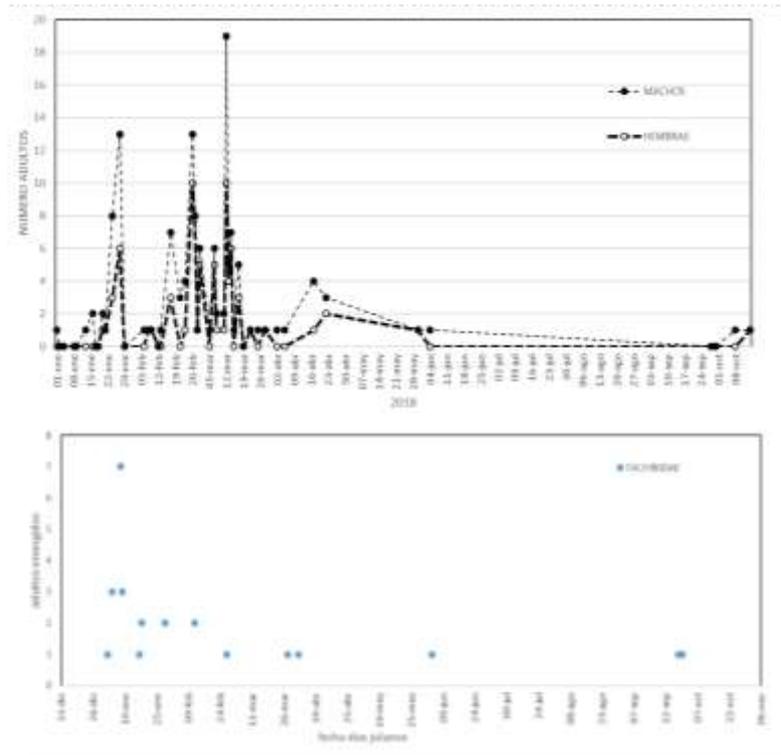


Figura 16. Emergencia de *Zadiprion rowheri* bajo condiciones del CEPAB, Aguascalientes.

### ***Neodiprion sp. circa omosus* en el municipio de Xico, Veracruz**

Durante esta segunda etapa, esta especie se mantuvo en nivel endémico, a veces imperceptible, lo cual dificultó definir con precisión la fenología. A pesar de eso, se pudo definir que durante enero y febrero predomina el estado de huevo. A partir de marzo se presentan principalmente larvas del primer estadio aunque también se presenta de manera traslapada el estado de huevo. Para el mes de abril, ya predomina el estado larvario en estadios intermedios. La ocurrencia de un evento meteorológico de baja temperatura al parecer afectó a la especie en observación ya que, el 23 de abril de 2019, en 10 de 12 árboles en observación ya no había larvas. El 12 de junio del mismo año se encontró el segundo estadio, así como capullos. Para el 28 de junio se encontraron tanto estadios intermedios como capullos y el 08 de julio de 2019 en la comunidad El Rincón, del municipio de Atotonga, se encontraron larvas en estadios iniciales e intermedios, así como huevos y un adulto. Posterior a esta fecha y hasta el 30 de septiembre de 2019, la población de *Neodiprion sp. circa omosus* colapsó en el área de estudio y ya no se encontraron árboles infestados para dar seguimiento a la fenología. Conjuntando las observaciones realizadas durante 2016 (antes del proyecto), 2018 y 2019, se corrobora que esta especie en los municipios de Xico y Atotonga, Veracruz presenta dos generaciones por año, ya que en 2018 se observaron larvas en febrero y en septiembre, y en 2019 se observaron huevecillos durante enero y febrero y otra vez en julio, tiempo en que también fue observada la hembra. Además, de acuerdo con antecedentes previos al proyecto, el 04 de agosto de 2016 se recolectaron varios adultos

mientras ovipositaban. De manera general, y bajo las limitaciones que impuso el bajo nivel de población del insecto, puede decirse que este insecto presenta una generación de enero a agosto y otra de agosto a diciembre.

### ***Zadiprion* sp. circa *rohweri* en el municipio de Atzalán, Veracruz**

En principio se determinó que esta especie nominada inicialmente como *Zadiprion* sp. *circa rohweri*, constituye una nueva especie, la cual será descrita en un manuscrito que será enviado para publicación en la siguiente etapa del proyecto. En cuanto a la fenología, las observaciones realizadas en campo durante la segunda etapa permitieron complementar y precisar la información en este aspecto de estudio. La fenología de esta especie se describe de la siguiente manera: La especie presenta una emergencia bimodal; es decir, hay un periodo de emergencia de adultos a fines de junio y posteriormente otro a partir de la segunda semana de julio hasta la primera semana de agosto. Las primeras larvas pueden observarse principalmente a partir de la primera semana de agosto; sin embargo, excepcionalmente, algunas se observan desde mediados de junio. El desarrollo de instares intermedios se presenta en la tercera semana de agosto y primera semana de septiembre, cuando la defoliación y los grupos de larvas son más notorios en el follaje. Para la tercera semana de septiembre se presentan desde instares intermedios y avanzados, hasta los primeros capullos. El desarrollo larvario continua y para la segunda semana de octubre la mayoría de las larvas llegan a su estado final de desarrollo y son menos abundantes, ya que descienden al suelo para tejer sus capullos y entrar en el estado de prepupa. Para mediados de octubre la defoliación es notable llegando en algunos árboles a alcanzar del 90 al 100%.

Se corroboró que el desarrollo larvario es relativamente rápido, ya que dura principalmente de la primera semana de agosto a la tercera semana de octubre, lo cual significa una corta ventana de oportunidad para el saneamiento. Durante este corto periodo el nivel de defoliación puede llegar hasta el 90 a 100% en árboles jóvenes y adultos.

### ***Monoctenus* sp. en Ixcateopan de Cuauhtémoc, Guerrero**

Los adultos se observaron del 18 de julio al 24 de agosto, ya no observándose después del 04 de septiembre, lo que representa un mes más tarde de lo reportado para *M. sanchezi* en San Luis Potosí. En total, se observaron 187 hembras y solo dos machos; lo cual coincide con los datos de San Luis Potosí, donde se observó una baja emergencia de machos. La revisión de los cocones permitió determinar que las pupas se observan desde el 27 de abril, con la mayor presencia del 27 de julio al 10 de agosto, lo que coincide con la emergencia de adultos y con la disminución de los gusanos verdes en los cocones, y representa dos meses antes de lo reportado para *M. sanchezi*.

La presencia de larvas se detectó después del 18 de julio, con la mayor población el 10 de agosto, la que se mantuvo hasta el 29 de septiembre. La mortalidad de larvas, efecto del tratamiento de combate, se observó después del 04 de septiembre, que representa 10 días después de la aplicación. Los nuevos cocones se empezaron a formar después de octubre, y dentro de ellos, los gusanos permanecieron en diapausa (gusano verde dentro de los cocones sin alimentarse), con mayor proporción en noviembre y diciembre; en esta condición permanecieron hasta el 09 de abril de 2019. Estos datos indican que las pupas se forman a partir de finales de abril, como se presentó en 2018. Los datos permiten inferir que solo se presenta una generación por año, al igual que en San Luis Potosí, aunque con diferencias en la época de aparición, debido a condiciones de clima, el cual fue más cálido en Guerrero, y con la presencia de lluvias para la emergencia de los adultos.

De los factores que afectan la población de cocones en el suelo, el más importante es la mortalidad ocasionada por parasitoides, seguido por la depredación por roedores, moscas de la familia Bombyliidae y Tachinidae. De los hongos entomopatógenos, *B. bassiana* fue el más prevaleciente, en comparación con *M. anisopliae*.

De los frascos bajo condiciones controladas, se observó la emergencia de adultos de *Monoctenus* sp., del 30 de septiembre al 3 de octubre, lo cual representa un retraso, respecto a lo que ocurre en forma natural, y da una idea de que el detonante para la emergencia es la lluvia; evento que no ocurrió en la cámara climática. Emergieron 32 hembras y un macho, lo cual es acorde a lo que ocurre naturalmente.

### ***Neodiprion omosus* en Aguascalientes**

Bajo las condiciones de clima natural *N. omosus* presentó una generación por año con la oviposición en junio y julio observándose las larvas desde agosto a octubre (Cuadro 6), aunque en 2019 se observó su presencia desde el 25 de julio. Los capullos de esta población se observan enterrados en el suelo de agosto a septiembre y la prepupa permanece en latencia dentro de ellos. Si las condiciones de temperatura son frías la emergencia de adultos coincide con el inicio de las lluvias el siguiente año, lo cual está acorde a los señalamientos de Sánchez y González (2007) sobre la presencia de *N. omosus* en la Sierra Fría de junio-agosto. Sin embargo, en Guerrero se ha reportado la presencia de dos generaciones de adultos una en junio-julio y otra en septiembre-octubre (Comunicación personal de Juan Carlos Gómez Núñez, Enlace de Sanidad de la CONAFOR en Guerrero).

Cuadro 6. Etapas de desarrollo de *Neodiprion omosus* en *Pinus Leiophylla*, observadas bajo condiciones climáticas naturales en el Campo Experimental Pabellón. Aguascalientes, en 2018.

Estado	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Larvas	0	0	0	0	0	0	25/07/2019	09/08/2018	17/09/2018	17/10/2018	0	0
Capullo	0	0	0	0	0	0	0	06/08/2018	19/09/2018		0	0
Adultos	0	0	0	0	0	0	0	25/08/2019	0	16/10/2018	0	0

Bajo las condiciones de laboratorio, en la cámara bioclimática, se observó que *N. omosus* puede emerger como adulto en agosto y octubre confirmando el señalamiento de la situación de Guerrero de que pudiera presentarse más de una generación por año. Con el empleo de cámara Binder y los adultos de la población obtenida de La Congoja se obtuvieron dos generaciones adicionales, conformando en total tres generaciones, dos adicionales a lo que ocurre en forma natural. (Figura 17).

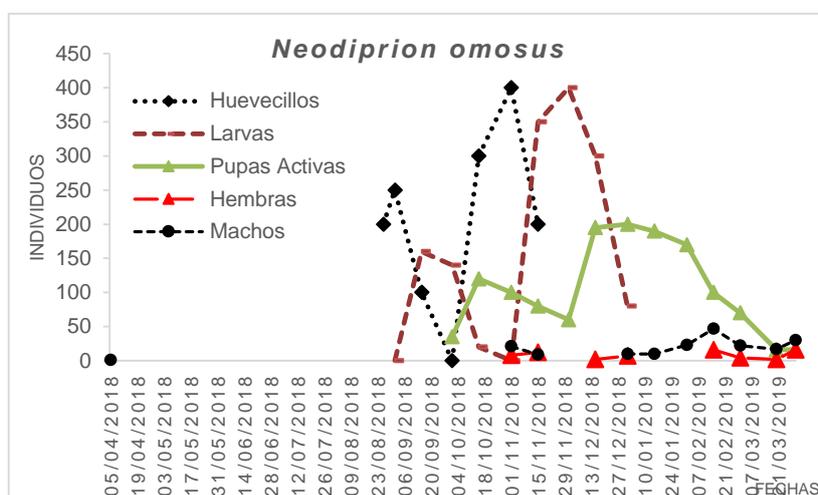


Figura 17. Fenología de *Neodiprion omosus* producida por Infestación inducida en *P. leiophylla* en Aguascalientes.

Con los primeros adultos se logró que las moscas sierra ovipositaran del 26 de agosto al 24 de septiembre, lo cual dio origen a las larvas del 18 de septiembre al 26 de octubre y se obtuvieron las pupas del 15 de octubre al 14 de enero de 2019; de estas pupas emergieron los nuevos adultos del nueve de noviembre al 14 de enero. Cabe mencionar que esta generación no se presenta en forma natural. Con las nuevas moscas se inició otra generación con los huevecillos del 17 de octubre al 16 de noviembre que dieron origen a las larvas de 26 de noviembre al 06 de febrero de 2019, estas empezaron a pupar del 24 de diciembre al 20 de marzo dando origen a una nueva generación de adultos del 29 de enero al 21 de marzo. Se trató de obtener otra generación adicional a partir de marzo-abril; sin embargo, existió poca oviposición y/o los huevecillos no emergieron. Se considera que, por las altas temperaturas y la poca humedad

relativa, es necesario inducir la oviposición sobre pequeños árboles en macetas dentro de la cámara bioclimática.

### **Sitios con presencia de Virus de Poliedrosis Nuclear**

Se revisaron 18 grupos de cadáveres de larvas de Diprionidae en microscopio óptico (400 y 1000X) con técnica de contraste de fases y de campo oscuro. Dichos cadáveres procedían de colectas de campo de distintas regiones del país. Algunas de estas muestras fueron colectadas desde 2013, otras en años más recientes y, la mayoría, durante las actividades de este proyecto. Los hallazgos en éstos se compilan en el Cuadro 7.

Seis muestras (2, 3, 7, 14, 16 y 17 Cuadro 7), de cinco orígenes geográficos distintos (Zehuaran, Chi.; Durango (Jaula 16), Pachón, Pueblo Nuevo, Dgo.; Sierra de Ixtapa e; Ixcateopan de Cuahutemoc, Gro.) pertenecientes, al menos a tres especies distintas [*Monoctenus* sp., *Z. ojedae* (probable) y *Z. falsus*] tuvieron cadáveres con cuerpos brillantes parecidos poliedros baculovíricos. La consistencia de los cadáveres con cuerpos brillantes fue variable: unas fueron cuerpos licuados, como es común en lepidópteros muertos por baculovirus; pero otros fueron firmes correosos e, incluso, los hubo duros. Adicionalmente a los cuerpos brillantes se encontraron microorganismos como bacterias de tipo coco o bacilo, microsporidios y hongos. Frecuentemente hubo dos o más de estos grupos de microorganismos en un solo cadáver.

Aunque de acuerdo con la experiencia previa de este equipo de trabajo, centrada en baculovirus de lepidópteros, algunas características de los cuerpos brillantes hallados en estos diagnósticos motivan duda sobre su naturaleza baculovírica, pero también hay evidencias que sugieren que tales cuerpos brillantes sí pueden ser poliedros baculovíricos. Las características que motivan duda son: 1) su relativa poca abundancia en la mayoría de los cadáveres revisados, aunque algunos sí tienen suficiente abundancia como para ser considerados poliedros baculovíricos; 2) la relativa firmeza de los tejidos de la mayoría de los cadáveres con cuerpos brillantes y; 3) el resultado negativo en la prueba de PCR realizada con un primer genérico para baculovirus de lepidópteros.

Las evidencias que sugieren que esos cuerpos brillantes sí pueden ser poliedros baculovíricos son las siguientes: 1) uno de los equipos participantes de investigación participantes en este proyecto, los colegas del CENID-PAVET del INIFAP, ubicado en Jiutepec, Morelos., usando un primer más específico para los baculovirus de Diprionidae, encontró individuos positivos e incluso pudo cultivar el virus en una línea de células permisivas de *Spodoptera frugiperda*. En nuestra porción de esa colecta, encontramos individuos con cuerpos brillantes. 2) Cuatro cadáveres de los que revisamos, pertenecientes a distintas muestras, fueron usados como inóculo para tratar sendos grupos de larvas de *Z. rohweri* y los cuatro reprodujeron síntomas compatibles con infección baculovírica (pérdida

gradual de movilidad y muerte), además de proliferación de cuerpos brillantes en sus cadáveres. 3) Comúnmente, los baculovirus de Diprionide atacan solo a las células del intestino, implicando la posibilidad de que el resto del cuerpo de las larvas afectadas se mantenga firme, lo cual explicaría su aspecto correoso o duro, según el grado de degradación de sus tejidos por efecto de otros microorganismos concomitantes o saprofiticos. Con base en lo anterior, postulamos que los cuerpos brillantes que encontramos en diversos cadáveres de moscas sierra son, muy probablemente, poliedros baculovíricos, a pesar de que nuestro primer de PCR, genérico para baculovirus de lepidóptera, no lo detecta. Sin embargo, esta incertidumbre temporal, se superará cuando tengamos el primer específico para baculovirus de Diprionidae. El cual pediremos a los colegas del CENID-PAVET. También intentaremos conseguir una muestra comercial del virus de baculovirus de *Zadiprion avietis*, Abietiv™, el cual usaremos como testigo positivo específico en las nuevas PCR que se correrán a las muestras de ADN extraídas a los diprionidos. Esto los meses por venir dentro de la vigencia del proyecto. La poca biomasa de cadáveres de mosca sierra con cuerpos brillantes obtenida hasta ahora, nos ha limitado hacer procedimientos de purificación. Necesitamos conseguir abundantes larvas susceptibles para incrementar el inóculo hasta poder purificarlo

Cuadro 7. Grupos de cadáveres de larvas de Diprionidae colectadas en distintas regiones de México y resultado de su revisión microscópica en microcopio ópticos a 400 y 1000X

Grupo	Identificación y número de individuos revisados (n)	Comentario	Resultado
1	Predio la Barranca, SLP. (10)	Colecta de 2013	Cocos y microsporidios.
2	"Virus" Zerahuaran, Chi.	Cuerpo licuado	Hifas de hongos <b>Muy pocos cuerpos brillantes</b>
3	"Virus" jaula 16, Dgo.		<b>Pocos cuerpos brillantes</b> Bacilos pequeños
4	Cruz de Piedra, Pueblo Nuevo, Dgo. (10)	Colecta de 2013	Bacilos, microsporidios y cocos.
5	Los Alamites, Sierra Fría, Ags. (10)	Colecta de 2013	Cocos
6	Chimaltitlán, Jal. (10)	Colecta de 2013	Cocos y microsporidios
7	El Pochón, Pueblo Nuevo, Dgo. (10) <i>Zadiprion falsus</i>	Cuerpo licuado Colecta de 2013	<b>1, abundantes cuerpos brillantes</b>
8	Guachochi, Chih. (10)	Colecta de 2013	9 larvas con bacilos y cocos Bacilos y cocos

(Cuadro 1). Continuación .....

Grupo	Identificación y número de individuos revisados (n)	Comentario	Resultado
9	San Juan Parangaricutiro, Mich. (10)	Colecta de 2013	Cocos
10	Pueblo Nuevo, Dgo. (10)	Larvas negras preservadas en masa y parcialmente desintegrados. Colecta 2013.	Bacilos, microsporidios y cocos
11	Pueblo Nuevo, Dgo. (10)	Larvas café-amarillo. Preservados en masa y parcialmente desintegrados. Colecta 2013	Bacilos, microsporidios cocos
12	Cruz del muchacho, Gómez Farías, Jal. (10)	Colecta 2013	Bacilos y microsporidios
13	Cruz del muchacho, Gómez Farías, Jal. (10)	Larvas negras y deshidratadas en cápsulas de gelatina. Colecta 2013.	Bacilos y microsporidios
14	Cadáveres colectados en la sierra de Ixtapa (43 larvas). Posiblemente <i>Z. ojedae</i>	Tomadas de las acículas de ramas bajas. Cuerpo negro, escurrido y correoso. Colecta 2019.	<b>1, cuerpos brillantes en gran abundancia</b>
			37, bacilo pequeño y ovoide y <b>escasos cuerpos brillantes</b>
			<b>3, cuerpos brillantes poco abundantes</b> , bacilo largo y microsporidios
	Cadáveres secos y duros colectados al pie de los pinos	<b>2, abundantes cuerpos brillantes</b>	
15	Cadáveres colectados en sierra de Ixtapa. Larvas secas y duras colectadas al pie de los árboles (125)	85 Incubadas en cámara húmeda y 60 en agar de PDA. Colecta de 2019	Predominio de hongos contaminantes. Un aislamiento de bacilo mediano y otro de <i>Beauveria bassiana</i> .
16	<i>Monoctenus</i> sp. de Ixcateopan, Gro. (25)	Larvas enviadas por mensajería y muertas durante su en traslado al COLPOS. Consistencia dura.	<b>1 con cuerpos brillantes</b> 6 con de cocos abundantes 10 con cocos en poca abundancia 8 con cocos, microsporidios y bacilos
17	<i>Monoctenus</i> sp. Ixcateopan, Gro. Larvas (75)	Colectadas vivas y muertas en trayecto a COLPOS. Consistencia firme.	<b>3 con cuerpos brillantes escasos</b> 72 con cocos
18	<i>Monoctenus</i> sp. Pupas de Ixcateopan, Gro. 419 recibidas; 102, revisadas	Colectadas en agosto y recibidas en Ixcateopan en noviembre del 2018	102 revisadas: 54 vivas, 31 muertas y secas; 7 muertas frescas; 10 parasitadas por Tachinidae.

### ***Inoculación de cadáveres con sospecha de virosis***

Cuatro larvas (cadáveres) procedentes de distintas muestras de las enlistadas en el cuadro 7, fueron usadas como fuente de inóculo para tratar larvas sanas de *Z. rohweri*, procedentes de Xicotés y Atzalán, Veracruz. El criterio para elegir las como fuente de inóculo fue la presencia de cuerpos brillantes semejantes a poliedros baculovíricos o la inscripción "virus" en su etiqueta de campo. Sus identidades, características y efectos en las larvas de *Z. rohweri* se consignan en el Cuadro 8. Con cada uno de éstos inóculos fuente se trató a un grupo de 20 larvas sanas de *Z. rohweri* con propósito de reproducir al patógeno que mató a los individuos fuente. Posteriormente, con cadáveres resultantes de los inóculos 1a y 4a enlistados en el Cuadro 8 (los que más poliedros tuvieron), se inocularon otras 30 larvas con cada fuente, esta vez para para fijar individuos con síntomas de enfermedad, pero aún vivos, con propósito de obtener ADN de buena calidad para pruebas de PCR. El propósito fue fijar estas larvas en la

etapa de replicación activa del virus, pero aún sin degradación de sus tejidos porque se ese modo se obtendría ADN de la mejora calidad.

Las larvas del primer grupo de inoculaciones desarrollaron síntomas de enfermedad: dejaron de comer, tuvieron movimientos gradualmente más lentos y morían con manchas oscuras en el abdomen. Al revisarlas sus cadáveres bajo el microscopio se obtuvo lo siguiente. Los dos inóculos con fuerte abundancia de cuerpos brillantes indujeron proliferación de cuerpos brillantes en la mayoría de las larvas tratadas (17 de 19 y 18 de 22, para los inóculos 1a y 4a, respectivamente). Los otros dos inóculos fuente, con poca abundancia de cuerpos brillantes 2a y 3a, indujeron presencia de cuerpos brillantes en 1 de 20 y 6 de 20 larvas, respectivamente y, adicionalmente la proliferación de alguno de tres tipos de bacilos (pequeños, medianos o grandes), todos diferenciables en microscopio bajo 1000X y campo oscuro. De las 20 larvas tratadas con el inóculo 2a, 13 tuvieron proliferación de hifas semejantes a las encontradas en el inóculo fuente, por lo que se deduce que dicho hongo contribuyó, concomitantemente, con los cuerpos brillantes, a la muerte del individuo donante del inóculo fuente. Finalmente, 5 larvas inoculadas con las fuentes 2a, 3a o 4a, mostraron también proliferación de una bacteria de tipo coco, la cual siempre fue concurrente con alguno de los microorganismos previos: hifas fúngicas, bacilos o los cuerpos brillantes.

Por su parte, los cadáveres del segundo grupo de inoculaciones también manifestaron síntomas de enfermedad. Cada 24 h fueron revisados para fijar a los individuos con movilidad reducida. Luego de fijarlos en agua calientes, se les preservó en alcohol al 70% para su posterior procesamiento para extracción de ADN y PCR. Los individuos que murieron entre una y otra revisión fueron conservados en congelación para posterior diagnóstico en microscopio.

Cuadro 8. Inoculación de larvas de *Zadiprion rohweri* con macerado de cadáveres sospechosos de virosis por presencia de cuerpos brillantes o por su aspecto al colectarlos en campo.

Tratamiento	Etiqueta Inóculo Fuente*	Diagnóstico Microscópico	Efectos en larvas de <i>Z. rohweri</i>
1a	<i>Z. falsus</i> , Pachón. Pueblo Nuevo, Dgo.	Cuerpos brillantes abundantes Cuerpo licuado Hifas de hongos	Cuerpos brillantes (17/19)*; Bacilo pequeño (10/19); mediano (8/19). Cuerpos brillantes (1/20); Bacilo pequeño (6/20), mediano (5/20); grande (8/20), Hongos (13/20) y cocos (2/20).
2a	"Virus" Zerahuaran, Chi.	Muy pocos cuerpos brillantes	Cuerpos brillantes (6/20); Bacilo pequeño (20/20); mediano (9/20); cocos (1/20).
3a	"Virus" jaula 16, Dgo.	Bacilos pequeños Pocos cuerpos brillantes Cuerpos brillantes	Cuerpos brillantes (22/22); Bacilo pequeño (2/20); mediano (6/20); grande (10/20).
4a	Cadaver duro. Ixtapa, Gro. Posiblemente <i>Z. ojedae</i> .	abundantes	

\*] Los inóculos 2a y 3a no mostraron cuerpos brillantes semejantes a poliedros baculovíricos, pero el aspecto de sus cadáveres los hacía sospechosos de daño por virosis.

\*\*] La mayoría de los cadáveres de las larvas tratadas tenían más de un tipo de microorganismo a la vez.

### **Búsqueda de donantes de ADN positivo a baculovirus**

Dado que la técnica de PCR requiere ADN positivo (testigos positivos), se buscaron individuos donantes de ADN portadores de infección encubierta entre lepidópteros de varias especies del género *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) de seis orígenes geográficos Cuadro 9. Cuando se obtuvieron varios especímenes positivos (adultos de *S. exigua* procedentes de Tamaulipas y larvas de *S. exigua* de Córdoba España) fue posible iniciar con los diagnósticos de larvas de moscas sierra.

Cuadro 9. Muestras de *Spodoptera* spp. procesadas por PCR para buscar testigos positivos a la infección por baculovirus, calificación del ADN obtenido y resultado de la PCR.

Muestra y número de individuos procesados (n)	Calificación del ADN	Diagnóstico
<i>Spodoptera frugiperda</i> (Gro.)	Limpio	Negativo
<i>S. Frugiperda</i> (Oax.)	Limpio	Negativo
<i>S. Frugiperda</i> (COLPOS)	Degradado	_____
<i>Spodoptera</i> sp. (Gto.)	Limpio	Negativo
<i>S. exigua</i> (Tam.)	Limpio	Positivo
<i>S. exigua</i> (España)	Limpio	Positivo

### **Diagnóstico de Baculovirus de Moscas Sierra por PCR**

Para determinar si existía o no presencia de baculovirus en cadáveres de larvas de moscas sierra colectados en campo o tratados en laboratorio, se hicieron extracciones de ADN a diversas muestras, las cuales se enlistan en el Cuadro 10. Algunas de las muestras analizadas dieron ADN degradado, el cual no es útil para la PCR; no obstante, a varios de esos individuos se les realizó la prueba igual que a los que dieron buen ADN.

Todos los individuos procesados por PCR dieron resultado negativo, independientemente de la calidad del ADN obtenido en las extracciones Cuadro 10. No obstante este resultado, hay razones los razonamientos discutidos en el punto (2) sugieren que muy posiblemente sí tenemos individuos con infección baculovírica en nuestras muestras, lo cual podría verificarse más adelante cuando consigamos el primer específico para baculovirus de moscas sierra que han usado los colegas de CINID-PAVET, usaron un primer específico para baculovirus de Diprionidae, mientras que nosotros en el COLPOS, hemos usado un primer genérico para baculovirus de lepidópteros. Estimamos que muy probablemente nuestro primer (genérico para baculovirus de Lepidoptera) no detecta a los baculovirus de Diprionidae. Adicionalmente, también intentaremos conseguir una muestra de baculovirus de *Neodiprion abietis*, comercializado en Canadá como Abietiv™ para tener un testigo positivo específico y mejorar la

precisión de nuestras determinaciones en lo que resta de los trabajos de este proyecto.

Cuadro 10. Muestras de Diprionidae procesadas por PCR para buscar individuos positivos a infección encubierta por Baculovirus, calificación del ADN obtenido y resultado de la PCR.

Muestra y número de individuos procesados (n)	Calificación del ADN	Diagnóstico por PCR
Cruz del muchacho 1. <i>Zadiprion</i> sp. Larvas delgadas. Gómez Farías, Jal. (9)	degradado	Negativo*
Cruz del muchacho 2. <i>Zadiprion</i> sp. Larvas negras. Gómez Farías, Jal. (9)	degradado	Negativo*
<i>Zadiprion</i> sp. Pueblo nuevo, Dgo. Larvas (90)	Bueno	Negativo
Larvas de <i>Monoctenus</i> sp, de Ixcateopan, Gro. Pupas de 2017 (40)	degradado	—
Larvas cocidas y preservadas en alcohol de 2018 (80)	49 bueno, 31 regular o degradado	Negativo
Larvas de <i>Zadiprion ojedae</i> de Guachochi, Chi. ADN extraído con fenol (40)	20 malo 20 bueno	Negativo
ADN extraído con chelex (20)	Regular	Negativo
ADN extraído con fenol (40)	Bueno	Negativo
ADN extraído con fenol (30)	Bueno	Negativo

### **Inducción de la brotación de las infecciones encubiertas**

De acuerdo con experiencias previas nuestras y varios reportes científicos, diversos factores de estrés fisiológico como agentes químicas, físicos y biológicos, [por ejemplo, el Sulfato de Cobre ( $\text{CuSO}_4$ )], pueden ocasionar que, infecciones encubiertas de baculovirus se activen en poblaciones de bajo cría, por ejemplo: en *Spodoptera exigua*, donde lo hemos hecho reiteradamente para recuperar inóculo viral silvestre.

Con base en estos antecedentes, hicimos dos pruebas de inducción de activación de infecciones virales latentes: una con *Z. ojedae* de Guachochi, Chi. y otra con *Z. rohweri*, de Xicotés y Atzalán, Veracruz. En la primera se impregnaron acículas de *Pinus duranguensis* (hospedera natural de *Z. ojedae*) con concentraciones de 2.5, 1.0, 0.5, 0.25 y 0.125% de sulfato de cobre. Gradualmente, las larvas tratadas fueron dejando de comer y perdieron movilidad y murieron. Los individuos bajo tratamiento se revisaron cada 24 h, las larvas y los individuos muertos fueron congelados para su diagnóstico posterior, el cual fue realizado mediante la revisión de un frotis de los tejidos de cada cadáver bajo microscopio a 400 y 1000X con la técnica de contraste de fases y campo oscuro, el cual arrojó los resultados compilados en el Cuadro 11.

Este resultado muestra que el agente de inducción viral ensayado, no activó infecciones virales, pero sí la proliferación de dos tipos de bacilos (largos o cortos), en forma dosis dependiente. Bajo dosis altas (2.5, 1.0, 0.5%),

proliferaron los bacilos largos, mientras que, en dosis bajas (0.25. y 0.125 %), los bacilos pequeños (ovoides). Adicionalmente, es relevante que las larvas muertas en el testigo tuvieron tanto al bacilo pequeño como cuerpos brillantes, sugiriendo que tanto el bacilo pequeño como los cuerpos brillantes se inhiben con la proliferación de los bacilos largos favorecidos por las dosis altas del sulfato de cobre. Por su parte, el tiempo de mortalidad de las larvas negativamente dependiente de la dosis: 8 días en las dosis altas y 14 en las bajas.

Cuadro 11. Hallazgos en cadáveres de *Zadiprion ojedae* tratados con solución de sulfato de cobre impregnado su dieta natural.

Dosis (%)	Larvas muertas	Vivas	Revisadas	Hallazgos
2.5	20	0	10	6, bacilos largos abundantes 1, bacilos largos escasos
1	20	0	10	1, bacilos pequeños escasos 6, bacilos largos abundantes 2, bacilos largos escasos
0.5	17	3	10	1, bacilos pequeños escasos 3, bacilos largos abundantes 1, bacilos con largos escasos
0.25	14	6	10	1, bacilos pequeños escasos 1, bacilos largos abundantes 3, bacilos largos escasos y bacilos cortos abundantes
0.125	13	7	10	2, bacilos pequeños abundantes y cuerpos brillantes escasos 2, bacilos abundantes y pequeños 1, bacilos escasos y cocos muy abundantes
0.0 (testigo)	4	16	4	3, bacilos pequeños abundantes 4, bacilos pequeños y cuerpos brillantes escasos

La evidencia obtenida en este ensayo sugiere que el sulfato de cobre hizo algún daño a la membrana peritrófica del intestino de las larvas o daño fisiológico en su sistema inmune y, que dicho daño, permitió que la flora residente del intestino proliferara en el hemocele (septicemia), la cual causó la muerte de las larvas. La mitad de los cadáveres tratados se conservan en congelación, para un intento posterior de cultivo e identificación de las especies bacterianas causantes de la septicemia y subsecuentes pruebas de patogenicidad. Se estima que es igualmente posible que las bacterias encontradas en los cadáveres sean inocuas o que, siendo patogénicas, causan enfermedad cuando los huéspedes sufren algún estrés que les reduce su resistencia natural al patógeno.

El hecho de que concentraciones bajas, <0.25%, aplicadas una sola vez o reiteradamente inducen mortalidad, resulta relevante porque tales concentraciones son menores o semejantes a las utilizadas para corregir deficiencias de cobre como micronutriente o para tratamientos fitosanitarios contra enfermedades fungosas o bacterianas de las plantas cultivadas, lo cual

sugiere cierto potencial de uso de este compuesto como agente de control por facilitación de epizootias en estos insectos. Aunque aún se necesitan pruebas de campo, es posible que dosis cercanas a 0.5 kg de sulfato de cobre asperjado por hectárea podrían dar algún grado de inducción de tales epizootias.

### ***Aislamiento de $\gamma$ -Baculovirus en el CENID PAVET***

Se comprobó que las células Sf9 que recibieron partículas virales de manera forzada con transfectina (BIORAD) pueden ser usadas para corroborar la presencias del  $\gamma$ -baculovirus en las muestras de pupas de *Zadiprion rowheri* y *Neodiprion* sp sospechosas de infección viral y probablemente sirvan como preparación de suspensiones virales útiles para posterior infección de los cultivos celulares obtenidos de las moscas sierra sin embargo pese a observarse cuerpos de oclusión en el núcleo de las células Sf9 estos no se multiplicaron ni indujeron el efecto citopático en las células afectadas y tampoco dieron reacción positiva en el PCR de polihedrovirus usado por lo que se concluye que los poliedrovirus que se observaron no corresponden al tipo de virus buscado y/o esperado Figura 18.



Figura 18. Aspecto de infección forzada de poliedrovirus en células Sf9. La flecha indica donde se observan cuerpos de inclusión en los núcleos de las células.

### **Incremento de Poblaciones de moscas sierra**

Para *Neodiprion omosus* se han recolectado larvas de infestaciones naturales que se han criado en cámaras bioclimáticas y se han realizado pruebas de incremento mediante el embolsado de ramas con malla (Figura 19), llegando a tener más de 500 pupas de esta especie. Se ha enviado material biológico a colaboradores para pruebas de adaptación a cría artificial y de obtención de líneas de células.



Figura 19. Infestación de ramas de *Pinus leiophylla* con *Neodiprion omosus* bajo la técnica de embolsado de ramas en el CEPAB.

### **Aislamiento de líneas celulares y cultivos primarios**

Se obtuvieron los órganos internos de la larva (Figura 20) que incluyeron el intestino y las glándulas salivales, que se mantuvieron durante meses en medio de cultivo y en el caso de las glándulas salivales (Figura 21) se encontró que constituyen un línea muy estable que podrían ser útiles en la replicación del poliedrovirus que podrían ser un objeto de estudio y verificar si el virus podría infectarlas.

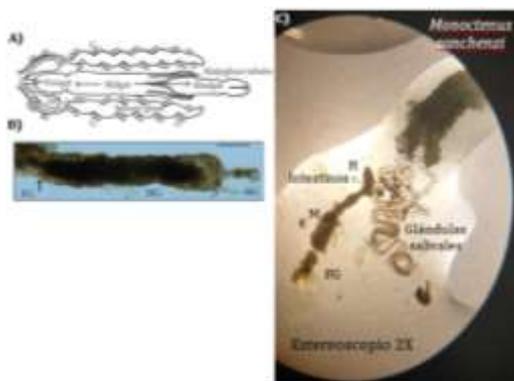


Figura 20. Comparación de intestinos de moscas de la familia diprionidae. A) Ilustración representativa del aparato alimentario de *Neodiprion abietis* (Lucaroti et al., 2011). B) Intestinos disectados de *N. abietis* C) Disección de la larva de *Monoctenus sanchezi*.

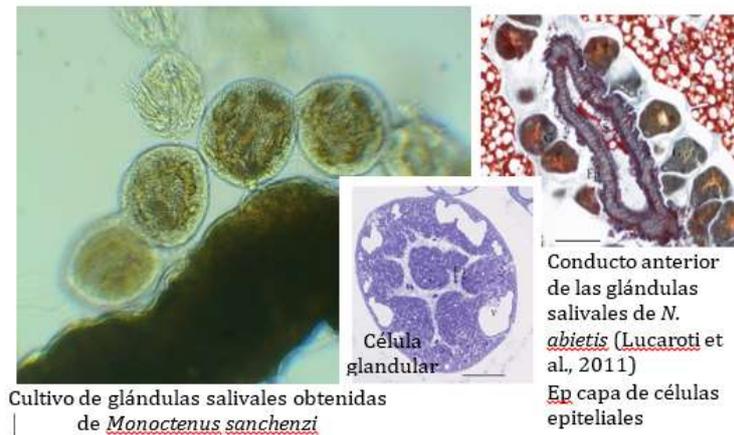


Figura 21. Cultivo de órgano de glándulas salivales y comparación con las células reportadas en la literatura.

Se obtuvieron siete líneas celulares de las pupas y cuatro líneas celulares de los huevos que se mantienen estables con signos de crecimiento lineal a lo largo de tres meses de cultivo celular experimental (Cuadro 12). Estas células son en su mayoría diferenciadas y algunas fácilmente identificables como amebocitos, monocitos y células epiteliales comunes en otros artrópodos. Sin embargo, algunas células son difíciles de identificar por comparación y es necesario una mayor cantidad de observaciones para tratar de clasificarlas por otros procedimientos. Actualmente los cultivos progresan creciendo de manera lineal y se espera que y medio alternativo pueda inducir crecimiento exponencial que es el tipo de crecimiento necesario para cultivar un  $\gamma$ -baculovirus útil en procedimientos de control biológico.

Cuadro 12. Líneas celulares de moscas sierra de la familia Diprionidae

Género/especie de avispa	Lugar de aislamiento	Estadio de desarrollo	Tipo de células obtenidas	Medio de cultivo	Tiempo de cultivo
<i>Neodiprion sp</i>	Sierra fría, Aguascalientes	Huevos, larvas, pupas, adultos	Embrionarias, amebocitos, epiteliales, grasas.	MEM/GRACE Complementados	seis meses
<i>Zadiprion rowheri</i>	Miquihuana, Tamaulipas	Huevos, larvas, pupas, adultos	Embrionarias, amebocitos, epiteliales, grasas.	MEM/GRACE Complementados	cuatro meses
<i>Zadiprion ojedae</i>	Guachochi, Chihuahua	Huevos, larvas, pupas, adultos	Embrionarias, amebocitos, epiteliales, grasas.	MEM/GRACE Complementados	tres meses
<i>Monoctenus sp</i>	Ixcateopan, Guerrero	Huevos, larvas, pupas, adultos	Embrionarias, amebocitos, epiteliales, grasas.	MEM/GRACE Complementados	cuatro meses

### **Cría de larvas de moscas sierra en dieta artificial**

Las larvas de *Monoctenus sp.* en dieta artificial produjeron 1/8 de la cantidad de excretas producidas por igual número de larvas en la dieta natural (Cuadro 13);

mientras que las larvas *Z. ojedae*, sobrevivieron 11.2 d y produjeron  $\leq$  de 2% de las excretas de las larvas en dieta natural. Claramente, las larvas de ambas especies de moscas sierra, mostraron un nivel de consumo muy bajo de las dietas artificiales proveídas. Puede afirmarse que esa cantidad consumida no les proporciona suficiente energía y nutrientes para completar su desarrollo larval, lo cual explica su gradual pérdida de movilidad y muerte. Con lo observado, aún no es clara la razón de tan reducido consumo de la dieta artificial, pero se postulan dos posibles razones: posible falta de estimulantes del consumo (sustancias químicas presentes en el follaje fresco y ausentes en el follaje seco y molido) o adaptaciones conductuales que les inducen a comer de las acículas y no de una placa de dieta. En futuros intentos, las sustancias del follaje fresco podrían incorporarse a la dieta artificial machacando brotes tiernos, en vez de triturar las ramillas (o acículas) secas.

Cuadro 13. Excretas y longevidad de *Monoctenus* sp. y *Zadiprion ojedae* alimentadas con dieta natural y artificial

<i>Monoctenus</i> sp. <sup>1</sup>		<i>Zadiprion ojedae</i> <sup>1</sup>		
Bajo dieta natural	Bajo dieta artificial <sup>2</sup>	Dieta Natural	Dieta artificial	
<i>Juniperus flaccida</i>		<i>Pinus duranguensis</i> (50)	<i>Pinus duranguensis</i> (50)	<i>Pinus douglasiana</i> (50)
379	41	----	----	----
----	----	5,578	106	56

1| Para *Monoctenus* se observaron 18 larvas en cada dieta; mientras que para *Z. ojedae*, se observaron 50 en cada dieta.

2 Ensayo suspendido cuando las larvas en dieta natural iniciaron la pupación

### **Distribución de especies de moscas sierra**

Se conformó un archivo donde se identifican los puntos de detección y/o daños por moscas sierra considerando varias fuentes de información y con el cual se realizarán los mapas de distribución actual y futura. Se muestran mapas preliminares por género (Figuras 22, 23, 24 y 25)



Figura 22. Distribución de los ataques de mosca sierra en la República Mexicana



Figura 23. Distribución de los ataques de *Monoctenus* spp. en la República Mexicana

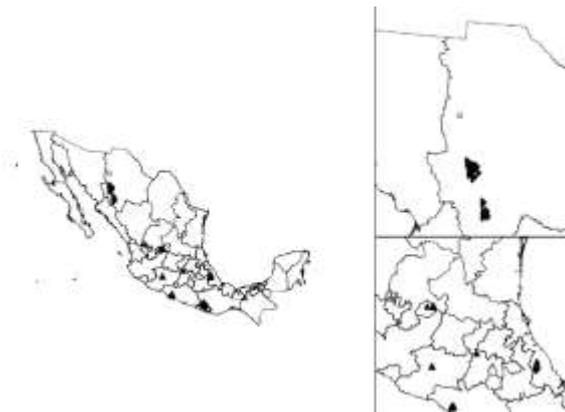


Figura 24. Distribución de los ataques de *Zadiprion* spp. en la República Mexicana

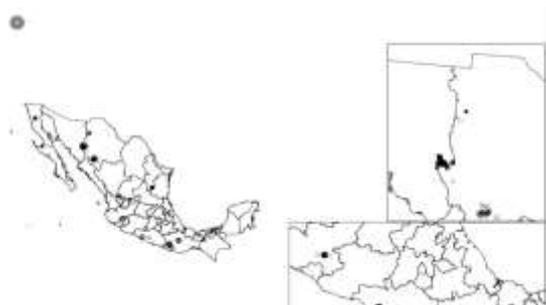


Figura 25. Distribución de los ataques de *Neodiprion* spp. en la República Mexicana

## Literatura citada

- Álvarez-Zagoya, R., y V. M. Díaz-Escobedo. 2007. Enemigos naturales de la mosca sierra *Zadiprion falsus* Smith (Hymenoptera: Diprionidae) en Durango. *In: memorias del XIV Simposio Nacional de Parasitología Forestal*. SEMARNAT- CONAFOR – INIFAP - Fundación Produce Aguascalientes, Aguascalientes, México. pp. 137 - 143.
- Caputo, G. F., S. S. Shar, S. V. Hooey, L. J. Gringorten. 2011. Insect cell line and baculoviruses as effective biocontrol agents of forest pests. *Biomed Central Proceedings*. Suppl 8 p 71 disponible en línea: [www.biomedcentral.com/1753-6561/5/s8/p71](http://www.biomedcentral.com/1753-6561/5/s8/p71).
- Castro, C. J. 1981. Contribución al estudio de la biología del defoliador de pino *Neodiprion fulviceps* (Cresson) complex (Hymenoptera: Diprionidae) en el estado de Chihuahua. *Ciencia Forestal* 6: 43- 51.
- Cisneros, P. S. 1970. Observaciones sobre *Zadiprion vallicola* Rohwer en la Meseta Tarasca, Michoacán. *Boletín Técnico* Núm. 33. SAG - INIF, México. 13 p.
- Cunningham, J. C., de Groot, P., Kaupp, W. J. 1987. A review of aerial spray trials with lecontvirus for control of redheaded pine sawfly *Neodiprion lecontei* (Hymenoptera: Diprionidae) in Ontario, Canada. *Proceedings Entomological Society of Ontario* 117: 65-72.
- Darriba D., Posada D., Kozlov A. M., Stamatakis A., Morel B., Flouri T. 2019. ModelTest-NG: A New and Scalable Tool for the Selection of DNA and Protein Evolutionary Models, *Molecular Biology and Evolution*, msz189, <https://doi.org/10.1093/molbev/msz189>
- De Groot, P., Cunningham, J. C. 1985. Aerial spray trials with a baculovirus to control redheaded pine sawfly in Ontario in 1979 and 1980. *Information Report FPM-X-63*. Forest Pest Management Institute 12 p.
- Dirección General de Gestión Forestal y de Suelos (DGGFS). 2008. Notificaciones para realizar trabajos de saneamiento expedidad en el 2008. SEMARNAT- Subsecretaria de Gestión para la protección ambiental. Dirección de Sanidad Forestal México. Concentrado por tipo de plaga. 1 p.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3(5): 294-299.
- Fuxa, R. J., R. A. Ayyappath, R. A. Goyer. 1998. Pathogen and microbial control of North American Forest Insect Pest. ForestHealth Techonlogy Enterprise Team. USDA Forest Service. FHTET-97.27p 9-1.

- Gijón, H. A. R., Rivera, C. M. I., Arriola, P. V. J. y Pérez, G. I. M. 2016. Protocolo rápido para la identificación molecular de descortezadores (Coleóptera: Curculionidae: Scolytinae). *Revista Entomología mexicana*, 3: 800–804.
- Glowacka, B., Ziemnicka, J., Lipa, J. J., Chaldny, J. 1987. Laboratory studies and field efficacy of Virox in control of the European pine sawfly (*Neodiprion sertifer* Geoffr.) (Hymenoptera: Diprionidae) *Prace Naukowe Institutu Ochrany Roslin* 28: 399-407.
- Gonzalez, G. E., 2013. Método de cría para moscas sierra del género *Neodiprion* (Hymenoptera: Diprionidae). XVII Simposio Nacional de Parasitología Forestal en la ciudad de Durango
- González, G. E., Bonilla, T. F., Quiñonez, B. S., Sánchez, M. G., Tafoya, R. F., España, L. M. P., Robles, U. S. 2014. Guía Para la identificación de moscas sierra de la familia Diprionidae presentes en el Centro Norte de México. *Publicación Especial*, 41, 36 p.
- González, G. E., y G. Sánchez, M. 2018. Identificación y manejo de moscas sierra de la familia Diprionidae presentes en el centro norte de México. Folleto técnico producido con apoyo del fondo sectorial CONACYT-CONAFOR, México. 122p.
- Johnson, W. T., Cunningham, J. C., Kaupp, W. J. Edwards J. C. 1978. Insect virus application with a cold fog generator *Canadian Forestry Service* 34: 25-26.
- Lucarotti, C. J., Morin, B., Graham, R. I., & Lapointe, R. 2007. Production, Application, and Field Performance of Abietiv™, the Balsam Fir Sawfly Nucleopolyhedrovirus. *VIROLOGICA SINICA*, 22(2), 163-172.
- Méndez, M. J. T. y D. Cibrián, T. 1985. Impacto del ataque de *Zadiprion vallicola*, defoliador de los pinos sobre el incremento de diámetro de *Pinus montezumae*, en la Meseta Tarasca. In: *Memorias de los Simposios Nacionales de Parasitología Forestal II y III*. México, D.F. SARH, México. *Publicación Especial No. 46* pp. 249 - 255.
- Moreau, G., C. J. Lucarotti, E. G. Kettela, G. S. Thurston, S. Holmes, C. Weaver, D. B. Levin, B. Morin. 2005. Aerial application of nucleopolihedrovirus induce decline in increasing and peaking populations of *Neodiprion abietis*. *Biological Control* 33: 65-73.
- Olivo, M. J. A. 2011. Brotes epidémicos de diprionidos en la Sierra Tarahumara de Chihuahua. In: *Memorias del XV Simposio Nacional de Parasitología Forestal*. Colegio de Postgraduados (eds.), Oaxaca, Oaxaca, México. pp. 33 - 35.
- Podgwaite, J. D., Rush, P., Hall, D., Walton, G. S. 1986. Field evaluation of nucleopolyhedrosis virus for control of readheaded pine sawfly

(Hymenoptera: Diprionidae). Journal Economic Entomology 79: 1648-1652.

- Quiñonez, B. S. 2006. Diagnostico Forestal de insectos defoliadores en varios ejidos de los municipios de Pueblo Nuevo y Durango, en Durango, México. Seminario de Titulación. Ingeniero Forestal con Orientación en Silvicultura. Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. México 90 p.
- Rocher, J. M. Ravallec, P. Barry, A. N. Volkoff, D. Ray, G. Devauchelle and M. Duonor. 2004. Establishment of cell lines from the wasp *Hyposoter didymator* (Hym Ichneumonidae) containing the symbiotic polydnavirus *H. didymator* ichnovirus. Journal of General Virology 85: 863-868.
- Ross, H. H. 1955. The taxonomy and evolution of the sawfly genus *Neodiprion*. Forest Science 1 (3): 196-209.
- Sánchez, M. G. y E. González, G. 2006. Biología y hábitos de la mosca sierra de los pinos (*Neodiprion omosus* Smith) en la Sierra Fría, Aguascalientes. In: Memorias de Resúmenes del Séptimo Seminario de investigación. Universidad Autónoma de Aguascalientes. pp. 84 - 87.
- Sánchez, M. G., H. Alanis, M., M. Cano, R., y J. A. Olivo, M. 2012. Biología y aspectos taxonómicos de dos especies de mosca sierra de los pinos en Chihuahua. SAGARPA - INIFAP - CIRNOC - Campo Experimental Pabellón. Aguascalientes, México. Folleto Técnico Núm. 44. 26 p.
- Sievers F., Higgins D.G. 2014. Clustal Omega, Accurate Alignment of Very Large Numbers of Sequences. In: Russell D. (eds) Multiple Sequence Alignment Methods. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 1079. Humana Press, Totowa, NJ.
- Smith, D. R. 1971. The genus *Zadiprion* Rohwer (Hymenoptera: Diprionidae). Proc. Ent. Soc. Wash. 73 (2): 187-197.
- Smith, D. R. 1974. Conifer sawflies, Diprionidae: Key to North American genera, checklist of world species, and new species from Mexico (Hymenoptera). Proc. Ent. Soc. Wash. 76 (4): 409-418.
- Smith, D. R. 1988. A synopsis of the sawflies (Hymenoptera: Symphyta) of America south of the United States: Introduction Xyelidae, Pamphiliidae, Cimbicidae, Diprionidae, Xyphydriidae, Siricidae, Orussidae, Cephidae. Systematic Entomology 13: 205-261.
- Smith, D. R. 1993. Systematics, life history and distribution of sawflies. In: M. R. Wagner and K.F Raffa (eds.) Sawfly life history adaptations to wood plants. Academic Press. California EUA. pp. 3 - 32.
- Smith, R. D., G. Sánchez-Martínez., and S. Ordaz - Silva. 2010. A new *Monoctenus* (Hymenoptera: Diprionidae) damaging *Juniperus flaccida*

- (Cupressaceae) in San Luis Potosí, México. Proceedings of the Entomological Society of Washington 112: 444 – 450.
- Smith, D. R., G. Sánchez, M., and A. Ojeda, A. 2012. A new species of *Zadiprion* (Hymenoptera: Diprionidae) on *Pinus durangensis* from Chihuahua, Mexico, and a review of other species of the genus. Proc. Entomol. Soc. Wash. 114: 224–237.
- Suchard M.A., Lemey P., Baele G., Ayres D.L., Drummond A.J. & Rambaut A. 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10 *Virus Evolution* 4, vey016. DOI:10.1093/ve/vey016
- Thompson, C. G., Scott, D. W., and Wickman, B. E. 1981. Long term persistence of the nuclear polyhedrosis virus of the Douglas fir tussock moth, *Orgyia pseudotsugata* (Lepidoptera: Lymantriidae), in forest soil. Environ. Entomol. 10: 254-55.
- Wong, H. R. and D. L. Slabey. 1986. Larvae of the north American genera of Diprionidae (Hymenoptera: Symphyta). Canadian Entomologist 118: 577-587.
- Zarin, I. A. Augstkali, M. P. 1976. Effectiveness of nuclear polyhedrosis virus in controlling pine sawfly *Neodiprion sertifer*. Zashchita Khvoynykh v Latvii SSR 64-72.

## **Anexo A.- REPORTE TÉCNICO ACTUALIZADO SEGUNDA ETAPA**

**Clave del Proyecto: CONAFOR 2017-CO2 NUM: 291304**

**Título del Proyecto: ESTADO DEL ARTE SOBRE TAXONOMÍA, FENOLOGÍA, Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE MOSCAS SIERRA DE CONÍFERAS (*Zadiprion* spp., *Neodiprion* spp. y *Monoctenus* spp.) QUE HABITAN LOS BOSQUES DE MÉXICO, ASÍ COMO LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE VIRUS DE POLIEDROSIS NUCLEAR CON POTENCIAL PARA EL CONTROL BIOLÓGICO ESPECÍFICO.**

**Sujeto de Apoyo: INIFAP-Campo Experimental Pabellón, Aguascalientes**

**Informe No.: 2 de 3. Periodo: Octubre de 2018 a Octubre de 2019**

### **1. AVANCES DEL PROYECTO EN LA ETAPA**

Durante 2019, se recolectó material biológico en 11 estados (Ags., Chih., Coah., Gro., Gto., Hgo., Mich., Oax., Pue., Tamps., y Ver.) y se obtuvo donaciones de tres (BCN, Gto., y Gro.). Se conformó una colección de referencia de larvas mosca sierra (una copia se entregara a CONAFOR) solo falta recolectar material de Tlaxcala. Se identificó a *Neodiprion abietis* como la especie que está dañando *Abies concolor* en el área de anidación de la cotorra serrana occidental, constituyéndose un nuevo registro de la especie para Mexico. Se obtuvo evidencia para describir dos nuevas evidencias de *Zadiprion* en Aguascalientes y otra en Veracruz. (los escritos están en proceso). Respecto a *Monoctenus* se Constató que la especie que está afectando *Juniperus fláccida* en Guerrero es diferente a *Monoctenus sanchezi* que afecta a este cedro en San Luis Potosí Y Xichu, Guanajuato. Se obtuvo la fenología de *Zadiprion rowheri* que afecta *Pinus cembroides* en Miquihuana Tamaulipas y *Zadiprion* circa *rowheri* en Veracruz sobre *Pinus chiapensis*, así como *Monoctenus* sp en Ixcateopan, Guerrero; *Neodiprion omosus* en Aguascalientes. Se están elaborando mapas de distribución de las infestaciones de mosca sierra en la República Mexicana. Se obtuvieron los protocolos para la determinación molecular de larvas y adultos de moscas sierra. Se ingresaran los datos de identificación de las especies mexicanas a las bases de datos genéticos ya que actualmente solo determinan para género por la falta de información de las especies de México. Se obtuvo la metodología para obtener líneas de células de moscas sierra de los diferentes géneros. Se tienen varias detecciones sospechosas de virus de poliedrosis nuclear (por la presencia de cuerpos brillantes observados en microscopio de

contraste de fases). Se logró aislar al VPN presente en *Zadiprion rowheri* en Tamaulipas aunque no se incrementa en la línea de Sf9. Los primers y pruebas de PCR empleado hasta ahora no identifican los VPN en moscas sierra. Las pruebas con dieta artificial no han logrado el éxito adecuado y se están incrementando las poblaciones con el método de la malla en árbol hospedero.

## **2. LOGRO DE METAS RESPECTO DE METAS COMPROMETIDAS**

Solo falta obtener muestras biológicas de Tlaxcala, aunque se obtuvo material de todos los estados comprometidos originalmente. Se hizo una colección de referencia de moscas sierra a nivel larvario solo falta a nivel adulto. Se están realizando los escritos para la descripción de nuevas especies (tres de *Zadiprion* y una de *Monoctenus*) se obtuvo la fenología de al menos una especie de los tres géneros. Se obtuvieron los protocolos para la identificación molecular de larvas y adultos de moscas sierra para las especies mexicanas. Se detectaron individuos sospechosos de estar infectados por VPN, pero es necesario obtener primers específicos para la correcta identificación. Se obtuvo la metodología para la cría de cultivos de células de moscas sierra y la factibilidad de producir VPN en líneas no necesariamente del hospedero natural. No se ha logrado el aislamiento, identificación y evaluación de VPN de moscas sierra. Se han detectado varios *Bacillus* que se encuentran en larvas muertas y que son patogénicos a las larvas de moscas sierra; se está en proceso de aislamiento individual. Se están incrementando las poblaciones de *Neodiprion omosus* con la técnica de encerrado de ramas, lo cual no ha funcionado en *Zadiprion*.

## **3. LOGRO DE OBJETIVOS RESPECTO DE COMPROMISO**

Se logró aislar dos cepas de VPN de *Zadiprion Falsus* y *Zadiprion rowheri*. Se establecieron líneas de células de moscas sierra a partir de huevecillos y pupas de *Zadiprion rowheri*, y *Monoctenus* sp. Se determinó que la línea de células de Sf9 es permisible a la cepa de VPN de *Z. rowheri*. Lo anterior es una muestra de que esta estrategia de conservar VPN en líneas de células es factible de emplear con las moscas sierra de la familia Diprionidae y que existen líneas de células permisibles a otros virus extraños a la línea original, lo cual no ocurre en forma natural. Al parecer la obtención de la línea de células es más factible de obtener a partir de las pupas. Se obtuvo material biológico para determinar a la mayoría de las especies de moscas sierra de la familia Diprionidae presentes en nuestro país falta la corroboración de dos grupos *Monctenus* spp. y *Zadiprion rowheri*. Es necesaria la secuenciación de las poblaciones restantes tanto a nivel larvario como adulto y subir los datos de las especies mexicanas a las bases de datos especializadas. Se iniciaron las actividades de transferencia del proyecto.

## **4. GRUPO DE TRABAJO**

Dr. Guillermo Sánchez Martínez, MC. Karla Vanessa De Lira Ramos y MC. Candelario Serrano Gómez (INIFAP-CIRNOC-CEPAB), Dr. Estefan Miranda

Miranda y Dra. Raquel Cossio Bayugar (CENID-PAVET), Dr. Víctor Manuel Coria Ávalos e Ing. Jesús Muñoz Flores (INIFAP-C. E. Uruapan), Dr. Víctor López Martínez (UAEM), Dra. Alejandra Rosalía Gijón Hernández, Biol. José Francisco Reséndiz, Dr. Víctor Arriola Padilla (INIFAP-CENID-COMEF) Dr. Alejandro Pérez Panduro (COLPOS).

## **5. DESVIACIONES Y/O MODIFICACIONES EN LA ETAPA**

No se logró la identificación de los VPN detectados ya que primero se deben incrementar en sus hospederos naturales pero estos no se han presentado o han sufrido mortalidad por temperaturas bajas, No se establecieron las actividades de fenología en *Zadiprion falsus* en Chihuahua o *Neodiprion omosus* en Guerrero debido a problemas de inseguridad.

## **6. ACCIONES DERIVADAS DE LAS DESVIACIONES Y/O MODIFICACIONES**

Se establecieron estudios de fenología sobre *Zadiprion* sp. en Atzalán, Veracruz. Se están realizando pruebas de patogenicidad con las cepas de *Bacillus* detectadas que pueden convertirse en un agente de control biológico adecuado después de realizar pruebas con organismos no objeto de control (abejas, hormigas, etc).

## **7. ACCIONES REALIZADAS CON LOS SECTORES USUARIOS**

### **Acciones con productores**

Se involucró en las actividades de recolección del proyecto a personal de enlace de sanidad de la CONAFOR en los estados monitoreados.

### **Presentación de resultados a la comunidad científica**

Se presentaron tres carteles del proyecto en la reunión de la RENIAF en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas el 23 al 25 de octubre. Se presentarán dos carteles del proyecto en el Congreso Nacional de Control Biológico en Boca del Río, Veracruz del 02 al 07 de noviembre. Se participó con una ponencia oral en el congreso Nacional de Entomología Aplicada 05 de junio en Morelia Michoacán dentro del Simposio de Plagas de Importancia Forestal.

### **Capacitación de técnicos**

Se realizaron tres cursos-Taller de Capacitación en Oaxaca 30 y 31 de julio, en Cholula, Puebla el 10 y 11 de octubre y en Aguascalientes el 15 y 16 de octubre.

### **Formación de recursos humanos**

No aplica

### **Evaluaciones de avances del proyecto**

No se han realizado evaluaciones del avance del proyecto.

## **8. OBSERVACIONES RELEVANTES SOBRE EL PRESUPUESTO AUTORIZADO**

No se solicitaron los reactivos para la identificación de los VPN detectados ya que se tiene muy pocos ejemplares infectados y es necesario incrementarlos primero en su hospedero original y después distribuir material para experimentos, lo anterior debido a que la plaga o no se ha presentado o sufrió una mortalidad por las temperaturas frías de diciembre de 2017. No se realizó la visita a Canadá para capacitación en la obtención de líneas de células de moscas sierra, debido a que las poblaciones de moscas sierra apenas se están presentando el 15 de octubre la población de *Zadiprion* sp. en Guachochi Chihuahua estaban en larvas de primer estadio.

## **9. ESTADO DE LAS APORTACIONES COMPLEMENTARIAS**

No aplica

## **10. PRODUCTOS OBTENIDOS EN LA ETAPA**

Bases de datos de los sitios de recolecta, Realización de una colección de referencia de larvas de moscas sierra y elaboración de mapas de distribución a nivel género, Bases de datos y Protocolos para la identificación morfológica y molecular de larvas y adultos. Se obtuvo una base de datos de fotografías de las diferentes especies de moscas sierra a nivel larvario. Se obtuvieron las bases de datos de fenología de *Monoctenus* sp. en Guerrero y *Neodiprion omosus* a nivel infestación natural e inducida en Aguascalientes. Se completó los datos de Fenología de *Zadiprion* sp. en Veracruz y *Zadiprion rowheri* en Tamaulipas. Se obtuvieron sitios con probable infección con VPN falta corroborar con primers específicos. Se obtuvieron los protocolos para el establecimiento de líneas de células en *Zadiprion* y *Monoctenus*. Se obtuvieron bases de datos de incremento de *Neodiprion omosus* bajo la técnica de ramas encerradas en Aguascalientes. Se aislaron cepas de *Bacillus* spp. patogénicas a larvas de moscas sierra. Elaboración del Segundo Informe técnico de las actividades del proyecto.

## **11. COMPROMISOS PARA LA ETAPA SIGUIENTE**

Recolectar material biológico de Tlaxcala, Durango, Chihuahua, Tamaulipas San Luis Potosí, y Oaxaca (*Neodiprion bicolor*), para realizar pruebas de incremento y patogenicidad de VPN y *Bacillus* spp.. Incrementar las cepas de VPN de *Zadiprion falsus* y *Z. rowheri* en la línea de células de *Spodoptera frugiperda* Sf9. Obtener la línea de células de *Neodiprion omosus*. Incrementar las cepas de VPN obtenidas en las líneas de células o con el hospedero natural y realizar acciones para su identificación y caracterización. Realizar pruebas de efectividad biológica de los VPN detectados y de *Bacillus* spp. Terminar los escritos de la identificación de las especies de *Monoctenus* sp. y *Zadiprion* spp. y *Neodiprion abietis*. Desarrollar los mapas de distribución actual y potencial de las especies

de moscas sierra en bosques de Coníferas de México. Elaborar escritos sobre la identificación de moscas sierra a nivel larvario como adulto con las diferentes especies presentes en México. Desarrollar un método de cría de moscas sierra con dieta artificial.