

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Rango de hospederos, búsqueda y validación de la técnica de tinción de meconia con Buffalo Black para la obtención de una colonia de *D. magnifactella* libre de *Cypovirus*

**TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A:

Biol. VICTOR CARPANTA CAPISTRAN

Directora:

Dra. VERÓNICA OBREGÓN BARBOZA



CUERNAVACA, MORELOS

Julio, 2017

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en el Laboratorio de Control Biológico perteneciente al Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del estado de Morelos bajo la dirección de la Dra. Verónica Obregón Barboza, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través de la beca No. 738206.

DEDICATORIA

A mi familia, por ser ejemplo de constancia y trabajo además de siempre estar a mi lado y apoyarme siempre incondicionalmente. Mi más sincera admiración a todos ustedes y agradezco a la vida por tan maravillosa familia que tengo.

A todos los mexicanos de este país que contribuyeron con sus impuestos en forma de beca CONACYT que se me otorgó, con ello contribuyeron a que realizara mi maestría.

A mi abuelo paterno Pedro Carpanta Teodosio que lamentablemente murió hace un año. Desafortunadamente no pude visitarlo como debería cuando enfermo por mi trabajo y porque pensaba que la muerte estaba lejos, me equivoque.

Lo que nos queda al final son recuerdos.



AGRADECIMIENTOS

Primeramente, me debo agradecer a mí ya que este camino no fue fácil, existieron varios contratiempos en el desarrollo de este proyecto. Sin duda esta tesis me deja grandes enseñanzas como la tolerancia a la frustración, la infraestructura (recursos) es extremadamente importante en el desarrollo de cualquier proyecto, y por último las ideas y la creatividad son lo más importante en los proyectos de investigación.

Debo agradecer a mis padres Pedro y Albina ellos han sido pieza clave en el desarrollo de esta tesis ya que para mí son ejemplo de entereza, perseverancia, constancia, fortaleza. Además de siempre me han apoyado incondicionalmente en todas las metas que me he propuesto.

Agradezco a mis hermanos por su confianza, por siempre brindarme su apoyo, creo que más le agradezco es que siempre han confiado en mí. Porque yo creo que la confianza es algo muy difícil de lograr, pero muy fácil de perder. Por eso y por siempre estar a mi lado.

Mención particular tienen mis sobrinos Oscar y Kimberly ellos siempre me distraen hacen que mis problemas pasen a segundo término, al jugar con ellos me tranquilizan y serenán.

Agradezco a la Dra. Verónica mi titora en este proyecto de tesis, agradezco su tolerancia porque no fui un alumno fácil de llevar, por siempre darme libertad de redacción y en las materias de la maestría que no son fáciles darme el tiempo de estudiar, por siempre ponerme proyectos interesantes y difíciles porque siempre confió en mi capacidad de entenderlos y desarrollarlos. Además de su sincera amistad.

Dedo agradecer también a la Maestra Laura Lina, por siempre apoyarme, por siempre escuchar, además de siempre buscar la manera de apoyarme hasta en las colectas de campo, por darme de sus larvas y conseguir otras ajenas y sobre todo por siempre hacer tan amena mi estancia en el laboratorio. ¡Gracias profa Lau!

A mis compañeros y amigos del laboratorio, principalmente Anita (manita) por apoyarme siempre en los experimentos y su alegría. A Dustan que al principio me caía mal agradezco tus sugerencias, burlas, y apoyo en los experimentos y por tu amistad, Kary y Mare por siempre tener disposición para ayudarme y regalarme sus larvas (sus hijas) para que yo las matara. Alis y Ivet por sus comentarios, sugerencias, por acompañarme a colectar y por su sincera amistad.

A mis compañeros Feme, Edwin y Thalís muchas gracias por acompañarme a las colectas de campo y su apoyo en los experimentos.

Agradezco a la Dra. Elba cristina Villarreal, por siempre mantener las puertas de su laboratorio abiertas para mí, y por estar al pendiente de mí, aunque ya no era mi tutora.

A la bióloga Fernanda Cristina y al ingeniero Jesser por apoyo en cada tramite más aun cuando surgía una complicación o contratiempo siempre se solucionó gracias a ustedes, estoy muy agradecido por su apoyo.

A Silvia y Paty mis grandes amigas de generación y de años atrás siempre me apoyaron me alentaron, calmaron en situaciones difíciles y me guiaron en esta maestría. Agradezco mucho su amistad porque, aunque somos muy diferentes y, es difícil de creer que seamos amigos de muchos años. Espero contar con su amistad siempre.

Se me olvida Mariel adame gracias por regañarme y como los dos somos igual de pesimistas no apoyábamos. A todos mis compañeros de LEFIP que siempre me apoyaron.

A y a Erubiel tú sabes porque, espero un día regresarte el favor.

¡A todos ustedes gracias!

La suerte es para los haraganes que no se la merecen.

Anónimo

COMISIÓN REVISORA

Dra. Verónica Obregón Barbosa
Tutor principal

Dr. Victor Manuel Hernández Velázquez
Asesor

Dr. Ramón Suarez Rodríguez
Asesor

Dra. Lidia Gonzales Morales
Asesor

Dr. Guadalupe Peña Chora
Asesor

Les agradezco sus comentarios, sugerencias y por guiarme durante todo el proceso

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ABREVIATURAS.....	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Género <i>Diatraea</i> Guilding, 1828 (citado en Box, 1960).....	3
2.2 <i>Diatraea magnifactella</i>	3
2.2.1 Clasificación taxonómica	3
2.2.2 Distribución	3
2.2.3 Cultivos afectados por <i>D. magnifactella</i>	4
2.2.4 Daños producidos por <i>D. magnifactella</i>	4
2.2.5 Control biológico de <i>Diatraea</i>	5
2.3 Importancia de la cría de insectos en laboratorio.....	6
2.3.1 Infecciones provocadas por entomopatógenos en colonias de insectos .	6
2.4 Virus entomopatógenos (VEs)	7
2.5 Familia Reoviridae	10
2.6 <i>Cypovirus</i> o Virus de la poliedrosis citoplasmática.....	10
2.7 Hallazgo de un <i>Cypovirus</i> en la colonia de <i>Diatraea magnifactella</i>	12
2.8 ECOLOGÍA DE VIRUS ENTOMOPATÓGENOS	14
2.8.1 Propagación Horizontal de <i>Cypovirus</i>	15
2.8.2 Propagación Vertical de <i>Cypovirus</i>	15
2.9 El ambiente como fuente de entomopatógenos.....	17
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	20
5.1 Objetivo general.....	20
5.2 Objetivos particulares.....	20
6. METODOLOGÍA.....	21
6.1 Cría de <i>Diatraea magnifactella</i>	21

6.2 Amplificación del gen de polihedrina de <i>Cypovirus</i> en adultos	22
6.3 Método de tinción de cuerpos de oclusión en meconias por medio del colorante Buffalo Black.	24
6.4 Búsqueda de <i>Cypovirus</i> en especímenes de <i>D. magnifactella</i> colectados en el estado de Morelos.....	25
6.5 Amplificación del <i>Cypovirus</i> en larvas de <i>Diatraea magnifactella</i>	26
6.5.1 Pre-amplificación	26
6.5.2 Amplificación.....	27
6.6 Método de inoculación en hospederos para determinar el rango de hospederos del <i>Cypovirus</i> aislado en pie de cría de <i>D. magnifactella</i> CEIB-UAEM.....	27
7. Resultados	29
7.1 Formación de parejas de reproducción de <i>D. magnifactella</i>	29
7.2 Tinción de Meconia de parejas de reproducción de <i>D. magnifactella</i> con descendencia fértil.	30
7.3 Determinación de portadores de la infección por <i>Cypovirus</i> en <i>D. magnifactella</i>	31
7.4 Colecta en campo de larvas de <i>Diatraea magnifactella</i> en el estado de Morelos	32
7.4.1 Municipio de Tlaquiltenango	32
7.4.2 Municipio de Xochitepec	34
7.4.3 Municipio de Coatlán del Río	36
7.4.4 Municipio de Ayala.....	41
7.5 Revisión del inóculo original y amplificación en larva del <i>Cypovirus</i>	43
7.6 Determinación del Rango de hospederos del <i>Cypovirus</i>	47
7.6.1 <i>Spodoptera frugiperda</i>	47
7.6.2 <i>Galleria mellonella</i>	47
7.6.3 <i>Tenebrio molitor</i>	47
7.6.4 <i>Manduca sexta</i>	47
8. DISCUSIÓN	49
9. CONCLUSIONES.....	53
10. PERSPECTIVAS.....	54
LITERATURA CITADA.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Intestinos de larvas de <i>Helicoverpa armígera</i>	11
Figura 2. Signos de infección por <i>Cypovirus</i> en el ciclo de vida de Lepidópteros..	11
Figura 3. A) Larva pequeña de <i>Diatraea magnifactella</i> que presentó CO's.....	12
Figura 4. Adultos de <i>D. magnifactella</i> . A) Hembra de tamaño normal. B) Micro- hembra. C) Adulto normal. D y E) Adultos deformes. F) Adulto que no logro emerger.	13
Figura 5. Meconias observadas en 100x teñidas con Buffalo Black. Se observan CO's característicos de CPVs.	13
Figura 6. Pupas de <i>Tecia solanivora</i> , a) hembra, b) macho.	21
Figura 7. A) Meconia teñida de hembra de <i>D. magnifactella</i> , B) Meconia de macho de <i>D. magnifactella</i>	32
Figura 8. Muestra al fresco de intestino de larva de <i>D. magnifactella</i> colectada en Tlaquiltenango.	33
Figura 9. Tinción de cuerpos de oclusión de <i>Cypovirus</i> colectados en el municipio de Tlaquiltenango.	34
Figura 10. Muestra al fresco de intestino de larva de <i>D. magnifactella</i> colectada en Xochitepec.	35
Figura 11. Tinción de cuerpos de oclusión colectados en el municipio de Xochitepec.	35
Figura 12. Larva de <i>D. magnifactella</i> colectada en Coatlán de Río con signos típicos de infección por baculovirus encontrada dentro del tallo de una planta de caña de azúcar.	37
Figura 13. Cuerpos de oclusión obtenidos de larva de <i>D. magnifactella</i> colectada en la comunidad San Andrés perteneciente al municipio de Coatlán del Río.	37
Figura 14. Muestra al fresco de tejido de larva de <i>D. magnifactella</i> colectada en Coatlán del Río infectada con granulovirus.	39
Figura 15. Tinción de cuerpos de oclusión de granulovirus (Mancha azul del fondo de la imagen) obtenidos larva de <i>D. magnifactella</i> colectada en el municipio de Coatlán del Río.	39
Figura 16. A) Muestra al fresco de tejido de larvas con infección de granulovirus en donde se observan estructuras tetraédricas estructura típica de nucleopolihedrovirus.	40
Figura 17. Muestra al fresco de intestino de larva de <i>D. magnifactella</i> colectada en Ayala.	41
Figura 18. Tinción de cuerpos de oclusión colectados en el municipio de Ayala. .	41
Figura 19. Tinción de cuerpos de oclusión del <i>Cypovirus</i> con Buffalo Black del inoculo inicial (100x).	43
Figura 20. Disección de larvas de <i>D. magnifactella</i> contaminadas mostrando síndrome de intestino lechoso (polihedrosis).	44

Figura 21. Muestras al fresco de intestino de larvas de <i>D. magnifactella</i> contaminadas con <i>Cypovirus</i>	45
Figura 22. Muestras al fresco de intestinos de larvas de <i>D. magnifactella</i> de la amplificación del <i>Cypovirus</i>	46
Figura 23. Cuerpos de oclusión obtenidos de la infección <i>Manduca sexta</i> con el <i>Cypovirus</i> obtenido en el pie de cría de <i>D. magnifactella</i>	48
Figura 24. Cuerpos de oclusión que fueron obtenidos en <i>Manduca sexta</i> tenidos con el colorante Buffalo Black..	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reportes de crías de insectos contaminadas por entomopatógenos.	7
Tabla 2. Características de las familias y géneros de los VEs.	8
Tabla 3. Signos de infección por virus entomopatógenos.	9
Tabla 4. Proyección de la contrastación de los posibles resultados obtenidos con las técnicas de tinción de la meconia con Buffalo Black y amplificación de un gen específico a <i>Cypovirus</i> en las parejas reproductivas formadas. ...	23
Tabla 5. Secuencias de genes que codifican para la proteína polihedrina de <i>Cypovirus</i> secuenciados completamente.	24
Tabla 6. Datos obtenidos de la formación de parejas de reproducción de <i>D. magnifactella</i>	29
Tabla 7. Resultado de tinciones de meconias de parejas de reproducción de <i>D. magnifactella</i> con progenie.....	31
Tabla 8. Tinción de meconias de adultos de <i>D. magnifactella</i> contaminados con <i>Cypovirus</i> para determinar portadores.	31
Tabla 9. Datos obtenidos a partir de las larvas de <i>D. magnifactella</i> colectadas en el municipio de Tlaquiltenango.....	33
Tabla 10. Datos obtenidos a partir de las larvas de <i>D. magnifactella</i> colectadas en el municipio de Xochitepec.....	36
Tabla 11. Datos obtenidos a partir de las larvas de <i>D. magnifactella</i> colectadas en el municipio de Coatlán del Río.....	38
Tabla 12. Datos obtenidos a partir de las larvas de <i>D. magnifactella</i> colectadas en el municipio de municipio de Ayala.....	42

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

CAP: 7-metilguanosina trifosfato

CEIB: Centro de investigación en Biotecnología

CO's: Cuerpos de Oclusión

cm: Centímetro

cm²: Centímetro cuadrado

cm³: Centímetro cuadrado

GV: Granulovirus

Ha: Hectárea

UAEM: Universidad Autónoma del Estado de Morelos

UV: Luz ultravioleta

mm: milímetros

L:O: Luz oscuridad

RT: Retrotranscriptasa

PCR: Reacción en cadena de Polimerasa

SDS: Dodecilsulfato Sódico

VE's: Virus Entomopatógenos

°C: Grados centígrados

µL: microlitros

mL: mililitros

1. INTRODUCCIÓN

El género *Diatraea* comprende 56 especies (Dyar y Heinrich, 1927 citado en Box, 1960), distribuidas ampliamente en el continente americano, representando una plaga de importancia en cultivos de sorgo, maíz y caña de azúcar (Lastra *et al.*, 2006). En nuestro país hay 6 especies de barrenadores, destacando principalmente *Diatraea magnifactella* Dyar, misma que tiene una amplia distribución en regiones cañeras del país, incluyendo el estado de Morelos (Álvarez y Pérez, 2004; Campos *et al.*, 2006; Rodríguez-del-Bosque y Vejar-Cota, 2008).

Morelos es uno de los primeros estados en razón al rendimiento (t/ha) de caña de azúcar a nivel nacional. No obstante, este cultivo es atacado por insectos plaga en los que se incluyen a *D. magnifactella*, la cual se llega a presentar hasta en un 20%. En la etapa de larva de su ciclo biológico, este insecto se alimenta de los tallos de su hospedero, lo que ocasiona pérdidas significativas en el rendimiento de la planta y facilita la entrada de organismos patógenos (Dolores-Marcelo y Aldana-Diestra, 2011). El control de esta plaga se ha basado con el uso de insecticidas químicos, sin embargo, a menudo suele ser ineficiente debido a los hábitos crípticos de esta especie. Aunado a esto, el uso excesivo de estos agentes causa daños al hombre y al ambiente. Debido a esto, se han buscado alternativas amigables con el ambiente para el control de estos insectos. Una de ellas, es el control biológico, el cual emplea a los enemigos naturales de las plagas, dentro de ellos se incluyen a los depredadores, parasitoides y entomopatógenos (Vejar, 2004; Campos *et al.*, 2006; Vejar *et al.*, 2009).

Para evaluar entomopatógenos con potencial uso para el control biológico de *D. magnifactella* es necesario contar con la cría de insectos en laboratorio, la cual debe mantenerse libre de infecciones de patógenos para que los resultados en las evaluaciones sean los reales, por tal motivo es indispensable asegurar esta condición. En el laboratorio de control biológico-CEIB se estableció una colonia de *D. magnifactella* con el fin de evaluar diferentes entomopatógenos. Sin embargo, recientemente se reportó el hallazgo de un *Cypovirus* presente en esta colonia (Rosas Herrera, 2015). Esta familia de virus es altamente persistente al transmitirse a la descendencia, además de ser degenerados en su rango de hospederos, puesto que el propósito de la colonia de *D. magnifactella* es evaluar entomopatógenos que presenten potencial como controladores biológicos es prioridad para el laboratorio establecer un pie de cría libre del virus.

Al descubrirse el *Cypovirus* se realizó un esfuerzo para eliminarlo por medio de la desinfección superficial de los huevos y la selección de parejas reproductivas, esto eliminó en un principio la fase infectiva del virus. Sin embargo, recientemente se han vuelto a observar los signos de infección ocasionados por *Cypovirus* en la colonia de *D. magnifactella*, lo cual refleja posiblemente la persistencia del virus.

Por tal motivo en el presente trabajo se retomó el protocolo establecido por Rosas-Herrera en el 2015 pero añadiendo técnicas moleculares, con la finalidad de validar técnica de tinción de Buffalo Black de la meconia de parejas reproductivas y, adicionalmente, detectar parejas reproductivas aparentemente sanas, en las cuales el *Cypovirus* no esté en fase infectiva y de esta manera poder lograr su posible remoción del pie cría.

Sin embargo, una de las interrogantes es como se adquirió la infección de *Cypovirus* en el pie de cría, existen sin número de posibilidades, aunque nosotros nos centraremos en única opción, partiendo del supuesto que el ambiente es fuente natural de virus, y la cría de *D. magnifactella* partió de colectas de larvas en el campo de Morelos, es altamente probable que los virus fuesen adquiridos por las larvas en el campo desde el establecimiento de la cría en el 2009. Para probar esta opción muestreamos municipios cañeros en el estado de Morelos con el fin de buscar *Cypovirus* en poblaciones nativas de *D. magnifactella*. Por otro lado, existe otra opción en la que productos procedentes del campo puedan estar introduciendo partículas virales; por medio de las harinas y cereales que son utilizados en la preparación de la dieta meridica, mismos que no son esterilizados para conservar sus propiedades nutrimentales esto los convierte en potencial fuente de contaminación. Con el fin de demostrar que la dieta no es fuente de virus, un grupo de larvas procedentes de campo fue alimentado con dieta meridica.

El rango de hospederos es uno de los parámetros importantes dentro de la caracterización biológica, particularmente los *Cypovirus* son altamente degenerados por lo que se decidió evaluarlo, con el fin determinar la cantidad de hospederos susceptibles de infección por *Cypovirus* aislado de la colonia de *D. magnifactella* de esta manera poder tener una idea de cuales insectos son susceptibles y con ello poder amplificar los aislados de campo en diferentes hospederos ya que amplificarlos dentro de las larvas de la colonia genera incertidumbre.

2. ANTECEDENTES

2.1 Género *Diatraea* Guilding, 1828 (citado en Box, 1960)

Este género engloba 56 especies (Dyar y Heinrich citado en Box, 1960), las cuales muestran hábitos crepusculares y nocturnos. Estos insectos son conocidos comúnmente como “barrenadores de los tallos”. Este género de organismos es considerado plaga de gramíneas de importancia económica y alimentaria en las que se incluyen trigo, arroz, maíz y caña de azúcar (Rodríguez y Vejar-Cota, 2008).

Los barrenadores del tallo incluidos el género *Diatraea* están ampliamente distribuidos en el territorio del continente americano (CPC, 2011, citado en ficha técnica del barrenador). Dentro del territorio nacional, la distribución de este género ocupa 22 de los 31 estados (Rodríguez y Vejar-Cota, 2008). Reportando hasta la fecha la presencia de 6 especies: *Diatraea grandiosella* Dyar, *D. lineolata* Dyar, *D. muellerella* Dyar & Heinrich, *D. saccharalis* (fabricius), *D. considerata* Heinrich y *D. magnifactella* (Rodríguez y Vejar-Cota, 2008). Esta última presenta mayor distribución en la zona centro del país.

2.2 *Diatraea magnifactella*

2.2.1 Clasificación taxonómica

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Lepidoptera

Familia: Crambidae

Género: *Diatraea*

Especie: *Diatraea magnifactella* Dyar, 1911

2.2.2 Distribución

Diatraea magnifactella se encuentra reportada en los estados de Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Morelos (Campos *et al.*, 2006).

2.2.3 Cultivos afectados por *D. magnifactella*

D. magnifactella ataca a cultivos de importancia económica en los que se incluyen la caña de azúcar y esporádicamente al maíz. Particularmente para nuestro país, estos cultivos son muy importantes desde el punto de vista económico, alimentario y social. El maíz es un cultivo de consumo básico que se siembra en cerca de 8.5 millones de hectáreas (ha), de las cuales el 80% son de temporal y 20% de riego; por otro lado, el cultivo de la caña de azúcar constituye uno de los cultivos industriales más relevantes en el país la superficie sembrada es cerca de 700 mil hectáreas. Debido a su importancia, estos dos cultivos son colocados dentro del rango de productos básicos que son abundantemente cosechados para propio consumo y exportación (SIAP, 2014).

México a nivel mundial se posiciona en el sexto lugar en producción de maíz pues son cosechadas alrededor de 85 millones de toneladas anualmente (SIAP, 2014); y el cultivo de caña de azúcar se encuentra contemplado dentro de las 10 primeras naciones productoras, generando una riqueza de cerca de 30 mil millones de pesos en producción primaria (SE, 2014). Nuestra nación contiene 57 ingenios azucareros dentro de 15 estados: Campeche, Chiapas, Colima, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz. Siendo el último el que tiene mayor superficie sembrada. Por otro lado, el estado de Morelos está colocado en onceavo lugar; aunque, en cuanto rendimiento nuestro estado se encuentra en primer lugar con un rendimiento de 118.64 toneladas por hectárea en un área sembrada de 845,162.67 ha y una producción total de 61,182, 077.38 ton (SIAP, 2014).

2.2.4 Daños producidos por *D. magnifactella*

Los daños a cultivos ocasionados por *D. magnifactella* no son tan graves, sin embargo, su extensa distribución la posiciona, junto con *D. considerata*, *D. grandiosella* y *D. saccharalis*, como una de las principales plagas agrícolas en México (Álvarez y Pérez, 2004). Generalmente, la pérdida vinculada a los barrenadores se ha calculado que oscila entre el 40 y 50% (Rodríguez-del-Bosque y Vejar-Cota, 2008; Dolores y Aldana, 2011).

Al barrenar e introducirse al tallo, las larvas de *Diatraea* forman galerías longitudinales en donde se alimentan de la pulpa, esto trae como consecuencia la pérdida del flujo de agua y nutrientes en las plantas, lo cual ocasiona la reducción de peso de los tallos afectando directa e indirectamente a sus hospederos (CPC, 2011, citado en Ficha técnica del barrenador).

De manera directa, las larvas pueden ocasionar la muerte del meristemo primario, la destrucción de yemas y reducir el valor germinativo de las semillas. Dentro de los daños indirectos pueden favorecer la muerte y reducción de las dimensiones de los tallos. Además de disminuir el contenido de azúcar y contribuir a la invasión secundaria de patógenos a la planta (Álvarez y Pérez, 2004).

Diatraea magnifactella representa la principal plaga del cultivo de caña de azúcar en 20 municipios del estado de Morelos, en donde se llega a presentar hasta en un 20%. Habitualmente, esta plaga es controlada con el empleo de insecticidas de origen químico, sin embargo, debido a los hábitos crípticos, este tipo de control suele no ser efectivo (Campos *et al.*, 2012). Sumado a esto el uso excesivo de este tipo de control ha generado problemas graves para el hombre y el ambiente. Por tal motivo es importante la búsqueda de alternativas que resulten menos agresivas con el ambiente, además de exhibir mayor eficacia (Lastra y Gómez, 2006).

2.2.5 Control biológico de *Diatraea*

La reducción de los porcentajes de infestación de la plaga de *Diatraea* en el campo se lleva a cabo por medio de diferentes estrategias entre las que destacan la liberación de variedades tolerantes, rotación de cultivos, el control químico y el control biológico el cual emplea a los enemigos naturales de las especies plaga misma que comprende a los depredadores, parasitoides y entomopatógenos (Vejar, 2004; Campos *et al.*, 2006; Vejar *et al.*, 2009).

Por definición el control biológico es el uso de parasitoides, depredadores y entomopatógenos para reducir la densidad de la población de otro organismo plaga. Dentro de esta disciplina se encuentran dos vertientes: el control macrobiológico con el uso de depredadores y parasitoides y el microbiológico el cual emplea entomopatógenos en los que incluyen bacterias, hongos y virus (Rodríguez del Bosque *et al.*, 2012).

En este sentido el control biológico demanda una gran cantidad de organismos sanos para poder probar la efectividad de estos agentes infectivos de insectos, por lo anteriormente mencionado la crianza en laboratorio de insectos es una técnica ventajosa y eficiente utilizada en el control biológico para evaluar organismos que presenten potencial controlador.

2.3 Importancia de la cría de insectos en laboratorio

Hoy por hoy la cría de insectos es una herramienta utilizada para la producción masiva de insectos, los cuales son utilizados en diversas áreas que van desde la alimentación hasta la investigación; mismas que demandan grandes cantidades de estos individuos. Dentro de la investigación en el área agronómica el control biológico depende en gran medida del establecimiento de crías de insectos plaga. Gran parte de las colonias establecidas en el mundo son parte del orden Lepidóptera las cuales tiene como objetivo evaluar diferentes microorganismos que se utilicen para su control (Gupta *et al.*, 2005).

Las grandes ventajas que ofrece la cría de insectos es que proporciona grandes cantidades de individuos, producción en lote, calidad e inocuidad, para la evaluación de los organismos con potencial para el control de esos insectos (Vejar, 1994: Gupta *et al.*, 2005). Sin embargo, las colonias de insectos no están exceptas de ser atacadas por patógenos, por lo que cuando llega a suceder provocan graves problemas de producción.

2.3.1 Infecciones provocadas por entomopatógenos en colonias de insectos

Al establecerse las colonias de insectos pueden llegar a presentar problemas de producción debido a diferentes factores, los cuales no siempre están relacionados con patógenos. Sino por factores estresantes tales como la temperatura, luz, humedad, requerimientos nutricionales y la reducción del pool genético. Sin embargo, existen reportes de infecciones provocadas por bacterias, nematodos, hongos y virus en colonias de insectos ya establecidas. En el peor de los casos las infecciones crónicas o agudas pueden ocasionar el colapso en la producción de insectos.

Las infecciones crónicas no son fáciles de identificar, pues al no ejercer estrés de cualquier tipo no se manifiestan. Sin embargo, ante condiciones adversas en los insectos, estas se activan y pueden ocasionar epidemias en crías ya establecidas ver tabla 1. (Inglis *et al.*, 2003).

Los efectos son variados dependiendo el patógeno crónico involucrado. Existen virus entomopatógenos del género *Cypovirus* (CPVs) que son un problema mayúsculo pues cuando infectan colonias suelen ser altamente persistentes, debido a que pueden ser transmitidos verticalmente en la población (Sikorowski *et al.*, 1973; Mery y Dulmage, 1975), estas colonias son obsoletas para la investigación pues pueden sesgar los resultados (Allen, 1980).

Tabla 1. Reportes de crías de insectos contaminadas por entomopatógenos.		
Especie del insecto	Entomopatógeno	Referencia
<i>Heliothis zea</i>	<i>Nosema heliothidis</i>	(Lipa, 1968)
<i>H. virescens</i>	<i>Cypovirus</i>	(Simmons and Sikorowski, 1973)
<i>H. zea</i>	<i>N. heliothidis</i>	(Gaugler and Brooks, 1975)
<i>H. virescens</i>	<i>Cypovirus</i>	(Sikorowski and Thompson, 1979)
<i>H. zea</i>	<i>N. heliothidis</i>	(Thompson and Sikorowski, 1979)
<i>H. virescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	(Sikorowski and Lawrence, 1998)
<i>H. virescens</i>	<i>S. marcescens</i>	(Sikorowski <i>et al.</i> , 2001)
<i>H. virescens</i>	<i>S. marcescens</i>	(Inglis and Lawrence, 2001)

2.4 Virus entomopatógenos (VEs)

Los virus son entidades microbiológicas, no celulares que poseen un genoma capaz de replicarse y adaptarse a los cambios del ambiente. Actualmente se cuentan con más de 1600 reportes de virus que infectan artrópodos, principalmente a insectos pertenecientes al orden Lepidóptera (Caballero y Williams, 2008). La clasificación actual de los VEs abarca 15 familias las cuales se muestran en la tabla 2. (Tomada de Caballero y Williams 2008).

Tabla 2. Características de las familias y géneros de los VEs.

Familia (Subfamilia) Género	Ácido nucleico	Forma del virión	Dimensiones del virión (nm)	¿Envuelta en el virión?	¿Viriones ocluidos?	Especie de huéspedes
Ascoviridae Ascovirus	hsDNA	Bacilliforme u ovoide	130 x 200-240	Sí	No	L, Hy (Icneumónidos)
Baculoviridae Nucleopolyhedrovirus Granulovirus	hdDNA hdDNA	Bacilliforme Bacilliforme	40-60 x 200-400 30-60 x 260-360	Sí Sí	Sí Sí	L, Hy, D, Th, Tr L
Birnaviridae Entombirnavirus	hsRNA	Icosahédrica	60	No	No	D
Dicistroviridae Cripavirus	hsRNA	Icosahédrica	30	No	No	He, O, D
Iridoviridae Iridovirus Chloriridovirus	hdDNA hdDNA	Icosahédrica Icosahédrica	120-140 180-200	No No	No No	C, D, HE, L, O, Tr D
Metaviridae Metavirus Errantivirus Semotivirus	hsRNA hsRNA hsRNA	ND Esféricos u ovoides Esféricos u ovoides	ND ND ND	No No/Sí No/Sí	No No No	L, D, C D D
Nodavirus Alphanodavirus	hsRNA	Icosahédrica	30	No	No	C, D, L
Parvoviridae (Densovirinae) Densovirus Iteravirus Brevidensovirus Pefudensovirus	hsDNA hsDNA hsDNA hsDNA	Redondeada Redondeada Redondeada Redondeada	18-22 18-22 18-22 18-22	No No No No	No No No No	L, D, O, Od L L, D Di, L, D, He
Polydnaviridae Ichnovirus Brachovirus	hdDNA hdDNA	Elipsoide Cilíndrica	85 x 330 40 x 30-150	Sí Sí	No No	Hy (Icneumónidos) Hy (Bracónidos)
Poxviridae (Entomopoxvirinae) Alphaentomopoxvirus Betaentomopoxvirus Gammaentomopoxvirus	hdDNA hdDNA hdDNA	Ovoide Ovoide Forma de ladrillo	250 x 450 250 x 450 230 x 320	Sí SÍ SÍ	Sí SÍ SÍ	C O D
Pseudoviridae Hemivirus	hsRNA	Redondeada	50	No	No	D
Reoviridae Cypovirus Idnoreovirus	hdRNA hdRNA	Redondeada Redondeada	55-69 75	Sí No	Sí No	L, Hy
Tetraviridae Betatretavirus Omegatretavirus	hsRNA hsRNA	Redondeada Redondeada	40 40	No No	No No	L L

^a hs – DNA o RNA de hebra simple; hd –DNA o RNA de hebra doble.

^b Órdenes de insectos – C: Coleoptera; D: Diptera; Di: Dictyoptera; He: Hemiptera; Hy: Hymenoptera; L: Lepidoptera; O: Odonata; Th: Thysanoptera; Tr: Trichoptera. ND: no determinado.

El material genético de los VEs puede estar compuesto de ADN o ARN, los cuales se pueden presentar en cadena doble o simple, circular o lineal o incluso fragmentado. En algunas familias, los virus pueden encontrarse envueltos por una bicapa lipídica y formar un virión, mismos que pueden estar o no incluidos en una estructura matriz de naturaleza proteica, denominada cuerpo de oclusión (Caballero y Williams, 2008).

La función primordial de los cuerpos de oclusión es proteger el material genético de los factores ambientales, como la luz UV. La presencia de estas estructuras proteicas facilita que los VEs puedan ser administrados por medio de métodos tradicionales como los que se utilizan para la aplicación de insecticidas químicos. La formación de cuerpos de oclusión es una característica de las familias Baculoviridae, Poxviridae y Reoviridae.

Si alguna de estas familias de virus entomopatógenos infecta un pie de cría, es difícil eliminarlo al no existir agentes antivirales que puedan utilizarse para su control, por lo anterior el constante monitoreo de signos de infección de las principales familias de virus entomopatógenos es esencial. En la tabla 3 se muestran los síntomas de estas familias. (tomado de Evans y Shapiro, (1997) y Caballero y Williams, (2008)).

Tabla 3. Signos de infección por virus entomopatógenos.			
Ves	Sub familias y géneros	Signos externos de los insectos infectados con VEs	Síntomas internos de los insectos infectados con VEs
Baculoviridae	<i>Nucleopolyhedrovirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Cambio de coloración en la cutícula • Gran parte de órganos afectados • Hipodermis frágil • Ocasionalmente intestino de color amarillo blanco • Muerte rápida 	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia de cuerpos de oclusión en forma poliédrica localizados en los núcleos • Células hipertrofiadas
	<i>Granulovirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Cutícula blanca • gran parte de órganos afectados • hipodermis frágil 	
Poxviridae	<i>Entomopox-virus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Cutícula blanca • Gran parte de órganos afectados • Longevidad extendida • Larvas hinchadas 	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia de cuerpos de oclusión con formas ovales y esféricas refringentes • Replicación de material genético en el citoplasma
Reoviridae	<i>Cypovirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Cutícula blanca • Desarrollo prolongado • Cese de la alimentación • Pupas y adultos pequeños 	<ul style="list-style-type: none"> • Cuerpos de oclusión refringentes • Replicación de material genético en el citoplasma • Intestino lechoso

2.5 Familia Reoviridae

La familia Reoviridae, representa un grupo amplio y diverso de virus patógenos para diferentes reinos, los cuales infectan principalmente el sistema respiratorio y digestivo de sus hospederos, su genoma está compuesto de RNA de doble cadena fraccionado, el cual es replicado en el citoplasma celular, cada segmento codifica para una proteína esencial en la replicación y ensamblaje viral, los viriones generados pueden o no estar envueltos en estructuras proteicas (Mertens *et al.*, 2002). Los 15 géneros incluidos se dividen en dos subfamilias: Sedoreovirinae envuelve virus que presentan superficies lisas y con forma esférica y Spinareovirinae se incluyen a aquellos virus con forma de icosaedros que presenten proyecciones proteicas en los vértices, los 9 géneros agrupados en esta categoría son *Orthoreovirus*, *Aquareovirus*, *Oryzavirus*, *Fijivirus*, *Mycoreovirus*, *Idnoreovirus*, *Dinovernavirus*, *Coltivirus* y *Cypovirus* (Murphy *et al.*, 2012).

2.6 *Cypovirus* o Virus de la poliedrosis citoplasmática

El género *Cypovirus* producen viriones de RNA bicatenario de polaridad positiva y negativa que se encuentran arrestados en cuerpos de oclusión compuestos principalmente por polihedrina; gracias al estudio de la estructura del su ARN, se identificó el CAP un nucleótido modificado, el cual es esencial en el proceso de transcripción (Furuichi *et al.*, 1975). Infectan a gran número de insectos en los que se incluye el orden Lepidóptera, los cuales son colonizados por medio de ingesta de alimento contaminado o pueden ser transmitidos verticalmente (Belloncik *et al.*, 1996b; Nagata *et al.*, 2003).

Atacan el intestino de larvas ocasionado que se tornen de apariencia lechosa (ver figura 1), signo típico de infección por *Cypovirus*; aunque se han encontrado en hemolinfa no invaden otros tejidos; La constante muda del intestino ocasiona que sean arrojados en el excremento para ser dispersados (Miyajima y Kawase, 1968; Sikorowski *et al.*, 1971b).

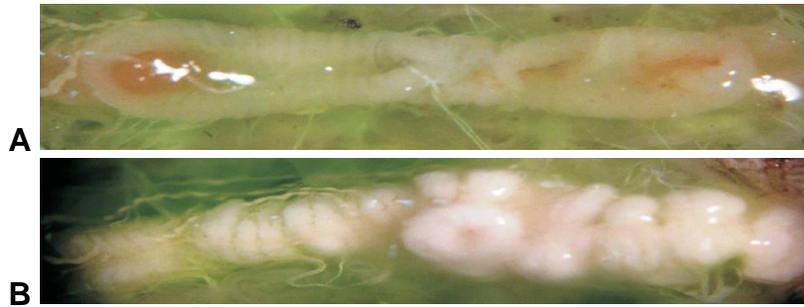


Figura 1. Intestinos de larvas de *Helicoverpa armigera*. A) Intestino sano, B) Intestino infectado con HaCPV donde se observa el síndrome del intestino lechoso.

Las infecciones por *Cypovirus* no provocan infecciones fatales para los hospederos, tienden a ser patologías crónicas. Algunos signos observados en larvas infectadas son el cese de la ingesta, deformidades en pupas y disminución de tamaño, problemas al emerger los adultos, además de deformaciones en adultos principalmente en alas (Figura 2) (Neilson, 1964; Vail *et al.*, 1969; Magnoler, 1974; Allen, 1980; Belloncik, 1996a).

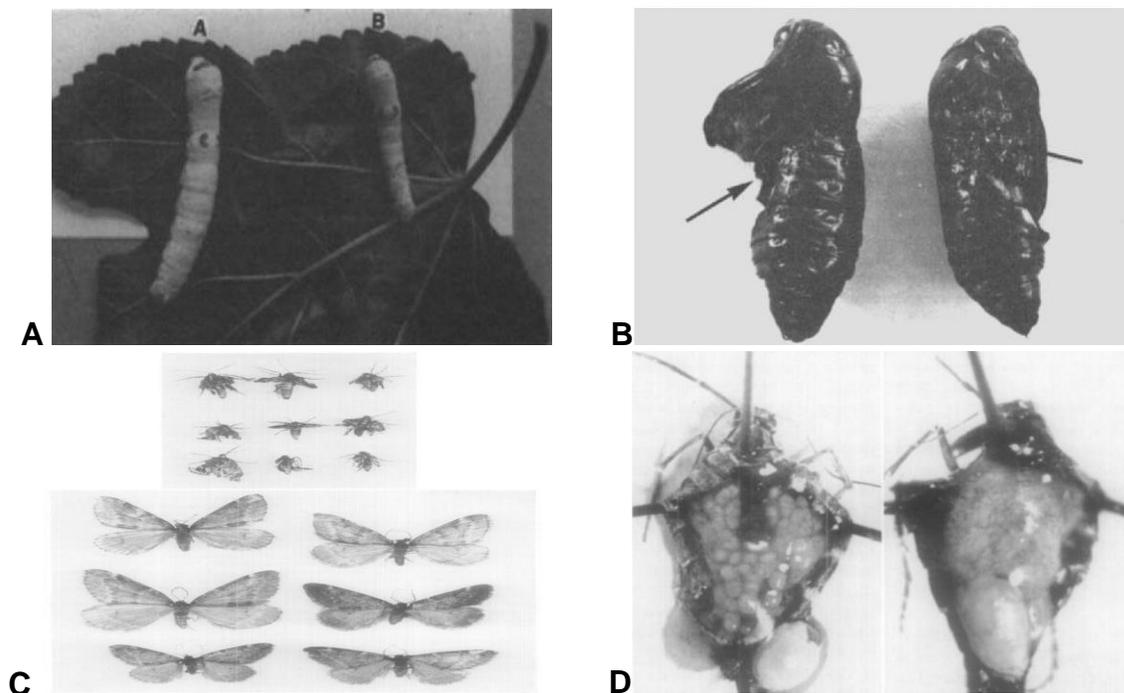


Figura 2. Signos de infección por *Cypovirus* en el ciclo de vida de Lepidópteros. A) disminución del tamaño de en larvas de *Bombix mori*. a: larva sana, b: larva infectada; B) Deformaciones en pupas de *Bombix mori*; C) Adultos macho de *Alsophila pometaria* mostrando deformaciones ocasionadas por una infección con CPVs. D) Hembras de *A. pometaria*. Izquierda: hembra sana. Derecha: hembra infectada con CPVs que presenta disminución en el tamaño de los oocitos. (Tomado de Belloncik, S. (1996a)

2.7 Hallazgo de un *Cypovirus* en la colonia de *Diatraea magnifactella*

La colonia de *Diatraea magnifactella* se estableció en el 2009 a partir de colectas de especímenes provenientes de varios cultivos de caña del estado de Morelos. El material colectado fue transportado al laboratorio y desinfectados superficialmente y enseguida se sometieron a una cuarentena (durante una generación) con la finalidad de identificar individuos que presentaran síntomas característicos de una infección por patógenos. Sin embargo, algunos patógenos como *Nosema sp.*, y *Cypovirus*, ocasionan infecciones crónicas y la patología gruesa es difícil de identificar. Adicionalmente, cuando se establece un pie de cría algunos autores recomiendan realizar parejas de reproducción a partir de adultos provenientes de la cuarentena y analizar la meconia de ambos miembros de cada pareja con la finalidad de identificar patógenos crónicos como *Nosema sp.*, y *Cypovirus*. En caso de detectar parejas infectadas, las oviposturas deben eliminarse. Cabe resaltar que, debido a la imposibilidad de tener material suficiente, en el pie de cría establecido en el 2009 no fue posible realizar este protocolo.

En las primeras generaciones de la colonia establecida en el Laboratorio de Control Biológico (CEIB-UAEM), se observó la presencia de larvas más pequeñas. Sin embargo, este fenómeno se atribuyó a la posibilidad de no tener una dieta meridica estandarizada. En la generación 22^a, al infectar larvas de tercer instar de *D. magnifactella* con un granulovirus (GV) y realizar una disección de una de las larvas, que presentaba un menor tamaño que el resto (Figura 3-A), para corroborar la infección por el GV, se obtuvo completo el intestino, el cual presentó una coloración blanca, característica distintiva de una infección por *Cypovirus*. Posteriormente se realizó una preparación en fresco del intestino y se corroboraron los síntomas microscópicos de una infección por *Cypovirus*, tales como células hipertrofiadas y CO's refringentes de forma hexagonal en el citoplasma de las células (Figura 3 B y C). Cabe resaltar que estos no son síntomas de infección por GVs.

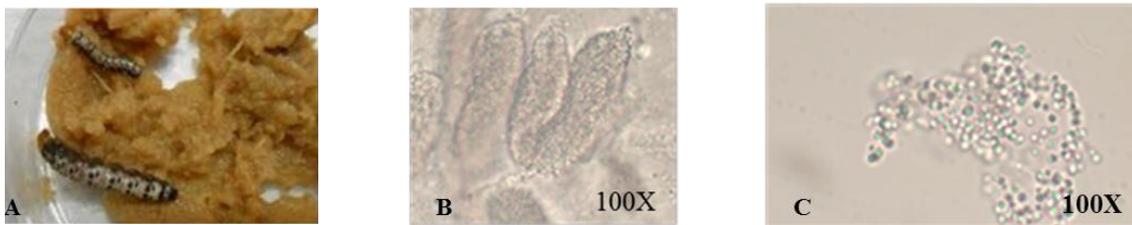


Figura 3. A) Larva pequeña de *Diatraea magnifactella* que presentó CO's. Muestra en fresco de un intestino blanco en contraste de fases) Células hipertrofiadas llenas de CO's refringentes. C) Célula en proceso de lisis liberando CO's refringentes en forma hexagonal (Tomado de Rosas-Herrera, 2015).

Debido a que el inóculo administrado no estaba contaminado con *Cypovirus*, se sospechó que el pie de cría podría presentar este virus. Por lo cual en el trabajo realizado por Rosas Herrera (2015), se procedió a identificar la presencia de este virus, corroborándose contundentemente la presencia de este entomopatógeno (Figura 4 y 5). Como se mencionó anteriormente, cuando un pie de cría presenta *Cypovirus*, la alternativa más viable es eliminar el material e iniciar una nueva colonia. Sin embargo, debido a la dificultad de establecer una nueva colonia, se procedió a realizar un proceso de selección no invasivo mediante la formación de parejas de reproducción y la tinción de la meconia arrojada por ambos progenitores. Se utilizó una tinción con Buffalo Black, un colorante que tiñe las proteínas del CO's de color negro o azul y que permite la identificación aquellos adultos que está infectados.

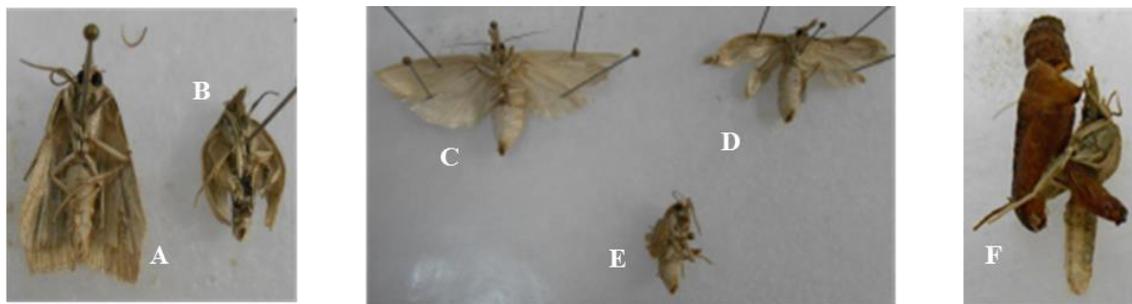


Figura 4. Adultos de *D. magnifactella*. A) Hembra de tamaño normal. B) Micro-hembra. C) Adulto normal. D y E) Adultos deformes. F) Adulto que no logra emerger. (Tomado de Rosas-Herrera, 2015).

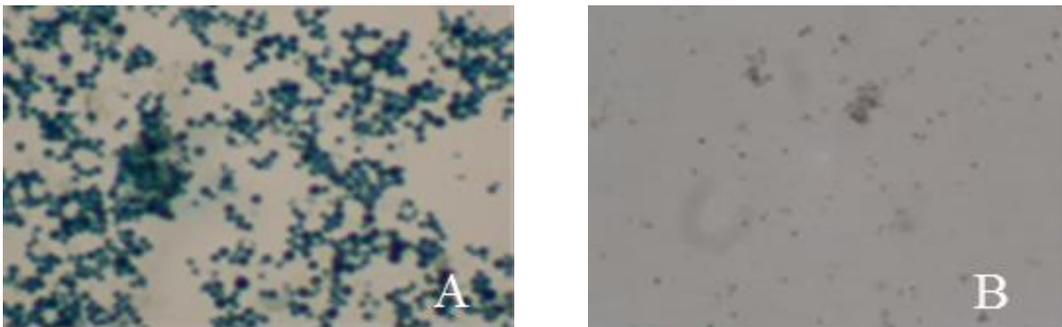


Figura 5. Meconias observadas en 100x teñidas con Buffalo Black. Se observan CO's característicos de CPVs. (Tomado de Rosas-Herrera, 2015).

El proceso de selección se realizó durante tres generaciones consecutivas, eliminando las oviposturas de las parejas positivas al *Cypovirus*. En la tabla 4, se resumen los resultados obtenidos en el trabajo de Rosas Herrera (2015).

Tabla 4. Seguimiento de parejas de reproducción durante 3 generaciones		
Generación	Parejas de reproducción formadas	Meconias positivas a la tinción con Buffalo Black
23 ^a	22	10
24 ^a	34	1
25 ^a	37	0

Sin embargo, a pesar del anterior proceso de selección realizado por Rosas Herrera (2015), en generaciones posteriores, nuevamente se han observado la patología gruesa ocasionada por *Cypovirus* y se ha corroborado la presencia de CO's en meconias y en preparaciones de muestras de intestino de larvas. Esto podría ser debido a que la técnica de Buffalo Black no es muy sensible o que de alguna manera no permite detectar aquellos individuos donde el virus no está activo.

Por otro lado, la importancia de conocer la posible fuente de contaminación de la cría de *D. magnifactella* es crucial para evitar contaminaciones futuras, esto será logrado por medio de la revisión de la ecología de los virus entomopatógenos poniendo énfasis en los principales reservorios y su dinámica ambiental.

2.8 ECOLOGÍA DE VIRUS ENTOMOPATÓGENOS

Los estudios realizados sobre la ecología de los VEs, describen que el suelo es el principal hábitat de los CO's (Cory *et al.*, 1997), en donde permanecen largos periodos de tiempo particularmente llegan persistir más cuando están salvaguardados de la radiación ultravioleta. Aunque en el suelo se enfrentan a factores como el pH, variación de temperatura y degradación por microorganismos. Por otro lado, su distribución puede variar en razón del ecosistema, además de las posibles interacciones virus-huésped y de interacciones planta-insecto. Se han descrito 2 posibles mecanismos de transmisión VEs: propagación horizontal y vertical (Fuxa *et al.*, 2004).

2.8.1 Propagación Horizontal de *Cypovirus*

Este mecanismo de transmisión es utilizado por los *Cypovirus* en dos posibles situaciones, la primera de ellas reside en la liberación de los CO's en las deposiciones de los insectos. Debido a que las células intestinales infectadas por *Cypovirus* suelen desintegrarse y son arrastradas en las heces. La segunda manera es ocasionar la muerte del hospedero, lo que conllevará a la desintegración del anfitrión y su posterior liberación al ambiente, una vez fuera el principal destino de los CO's es el suelo (Hukuhara., 1972 citado en Belloncik *et al.*, 1996a).

La dispersión de los CO's es a menudo hecha por el viento, lluvia, aves y fitoparásitos. Al ser arrastrados por estos factores abióticos propician la generación de nuevos focos de infección (Belloncik *et al.*, 1996a). Los *Cypovirus* necesitan ser ingeridos para colonizar a nuevos hospederos, por lo que la contaminación del follaje es una estrategia que utilizan para colonizar a sus anfitriones en los estadios más susceptibles.

Si bien los estudios sobre la ecología de dispersión de *Cypovirus* desde el suelo son limitados (Hukuhara *et al.*, 1972), nos podemos valer de los estudios basados en baculovirus, debido a que al igual que los *Cypovirus* el suelo es su principal reservorio. Los CO's de los VE's al encontrarse en el suelo tienen que valerse de diferentes estrategias para encontrar a sus huéspedes, se han propuesto varias teorías que utilizan para lograr su cometido (Fuxa *et al.*, 2007). Una de ellas es poder ser transportados por depredadores del huésped ya que estos se mueven constantemente en búsqueda de alimento; incluso por medio de este transporte pueden viajar grandes distancias para lograr llegar a otras poblaciones generando nuevos focos de infección (Fuxa *et al.*, 2004).

Otra hipótesis que se ha propuesto es el transporte de CO's por organismos que habitan en el suelo, pero eventualmente suben al follaje propiciando la contaminación del follaje (estos organismos son utilizados como un vehículo para encontrar a su huésped). Y, por último, el canibalismo es una conducta habitual en los insectos por este medio los CO's de los VE's pueden infectar organismos sanos al ingerir tejidos contaminados.

2.8.2 Propagación Vertical de *Cypovirus*

La propagación vertical también conocida como transmisión de padres a hijos. Se cree que surgió como una alternativa a la propagación horizontal en respuesta a disminuciones drásticas en las poblaciones de insectos (Belloncik *et al.*, 1996a). Este modo de infección ha llamado la atención por los mecanismos utilizados por los virus para alojarse dentro del hospedero, existen 2 maneras por las cuales se puede dar este fenómeno.

Una de ellas es la denominada transmisión transovum, la cual se caracteriza por contener los CO's en la superficie de los huevos, su objetivo es contaminar a los neonatos al emerger. Son contaminados debido a que los neonatos al liberarse del huevo consumen el coreon, lo que propicia su infección. Los tratamientos que se han utilizado son la desinfección superficial de los huevos con hipoclorito de sodio y formalina (Mery *et al.*, 1975).

Por otro lado, la transmisión transovárica tiene la particularidad de contener a los virus dentro de los huevos de los hospederos, este tipo de transmisión es especialmente persistente y difícil de eliminar particularmente dentro de una cría de insectos. Este tipo de transmisión se ha relacionado con infecciones encubiertas en insectos también conocidas como infecciones inaparentes, subletales, silenciosas u ocultas. Esta condición implica no generar patología aparente dentro del hospedero (Williams *et al.*, 2017).

Existen dos tipos de infecciones encubiertas infecciones persistentes y latentes. Cada una de ellas difiere en la estrategia de replicación y su patología. La persistencia viral genera bajos niveles de replicación del virus, amplia expresión de genes y producción de viriones. Por otra parte, la latencia no genera viriones y la expresión de genes virales es limitada solo se expresan aquellos que sean clave para el mantenimiento de la latencia (Williams *et al.*, 2017).

Tanto la latencia como la persistencia pueden ser evidenciadas o descubiertas por estrés. El factor más estresante observado en *Cypovirus* es la baja temperatura. Este factor desencadena una infección oculta. Se piensa que al disminuir la temperatura se propicia la disminución del sistema inmunológico del insecto, además de que a menor temperatura cesa la alimentación del hospedero y el intestino es más susceptible a la replicación y colonización de virus (Williams *et al.*, 2017).

A la fecha existen datos con algunas especies de virus entomopatógenos donde se ha demostrado ambos tipos de transmisión vertical; se ha propuesto que este mecanismo combinado de transmisión solo se da en periodos en donde los huéspedes tienen una caída en la tasa de población, en respuesta se genera esta conducta en los baculovirus como medida de persistencia en el ambiente (Fuxa *et al.*, 1999; 2002).

Por lo anteriormente mencionado las infecciones cubiertas pueden ser un problema en el establecimiento de un pie de cría dicho esto el ambiente puede ser fuente de virus entomopatógenos, más aún cuando se trata de infecciones cubiertas.

Otra estrategia ecológica que utilizan los *Cypovirus* es no ser específicos en los hospederos que infectan, ya que al tener un amplio rango de hospederos es más probable encontrar un anfitrión. Esta conducta es una ventaja en el momento de la propagación y dispersión viral. Dentro de los virus entomopatógenos los únicos que son degenerados son los *Cypovirus*. Esta cualidad en parte es conferida que a diferencia de los baculovirus y los entomopoxvirus no cuentan con una cubierta membranosa que se tiene que reconocer por las células para poder infectarlas.

2.9 El ambiente como fuente de entomopatógenos

Los entomopatógenos están altamente distribuidos en el ambiente, se han logrado aislar de diversos lugares. Algunos sitios en los que se ha concentrado la búsqueda de estos organismos son a partir del suelo, cadáveres u organismos enfermos que presenten signos de infección además de plantas.

Conforme a esto en las plantas y sus derivados como cereales y granos pueden contener o transportar entomopatógenos. Debido a esta interrogante se ha buscado aislar a partir de estos insumos entomopatógenos. Existen reportes en los que ha logrado detectar la presencia *Bacillus thuringiensis* dentro de harinas y granos almacenados lo que los convierte en agentes potenciales de contaminación dentro de un pie de cría (Hongyu *et al.*, 2000).

La harina de trigo y el germen de trigo son utilizados como fuente de carbono en la elaboración de la dieta meridica de *D. magnificella*, aunque son utilizados sin esterilizar para conservar sus propiedades nutricionales; debido a esto existe la interrogante si estos ingredientes pueden transportar virus entomopatógenos particularmente *Cypovirus*, como en el caso anteriormente mencionado de *Bacillus thuringiensis* esta correlación es abordada dentro de esta tesis.

Retomando las ideas plasmadas con anterioridad en esta tesis se pretende determinar si la técnica de tinción con Buffalo Black es certera en la selección de parejas libres de infección por *Cypovirus* con la ayuda de técnicas moleculares, por otro lado, el volver a observar la patología gruesa dentro de individuos de la colonia, pese al proceso de selección realizado por Rosas Herrera (2015) apunta a que pueda tratarse de un infección cubierta o latente; cabe señalar que en los ciclos de producción de la colonia siempre se observa un marcado aumento en las deformidades y la disminución de la tasa de oviposuras en las generaciones que coinciden con la época invernal.

Puesto que la baja temperatura es un factor que desencadena o potencia una infección por *Cypovirus* es un punto a considerar. Otro aspecto importante a determinar si, el campo de cultivo Morelos es fuente de virus esto es abordado desde 2 posibles opciones.

Una de ellas es que los CO's de *Cypovirus* se encuentren en los insumos de la dieta y se esté re-contaminando la cría de *D. magnifactella* con los granos y harinas no estériles utilizadas en la elaboración de la dieta meridica.

La siguiente opción, radica en la posibilidad que la infección por *Cypovirus* en la colonia de *D. magnifactella* sea exportada desde el campo como infección latente o persistente. Para poder tener un indicio de esta posibilidad se recolectaron larvas de *D. magnifactella* en municipios cañeros en el estado de Morelos que se encuentren aislados geográficamente; con el fin de detectar patología gruesa en los individuos colectados. Sin embargo, para poder cubrir todas las posibilidades un grupo de larvas se sometió a estrés a baja temperatura con el fin de propiciar infecciones cubiertas.

3. JUSTIFICACIÓN

En el 2015 se reportó la presencia de un *Cypovirus* en el pie de cría establecido en el Laboratorio de Control Biológico (CEIB-UAEM). Puesto que se asume que en una población no todos los individuos están infectados por un patógeno, se realizó un protocolo con la finalidad de seleccionar individuos sanos a partir de esa misma cría. A pesar del esfuerzo realizado, el *Cypovirus* se detectó nuevamente un año después. Debido a la importancia del pie de cría de *D. magnifactella*, para la continuidad de la investigación que se lleva a cabo, principalmente, en el Laboratorio de Control Biológico del CEIB-UAEM, la eliminación del pie de cría no fue una opción válida.

Existen varias posibilidades que explicarían la presencia del *Cypovirus* nuevamente. Sin embargo, en este proyecto abordamos la siguiente opción: que el *Cypovirus* pudo estar latente o inactivo en los insectos a partir de los cuales se obtuvo el nuevo pie de cría y que posteriormente se activó bajo alguna condición de estrés, en cuyo caso la técnica de tinción de la méconia con Buffalo Black no permitió identificarlos. Debido a que esta técnica es relativamente económica y se recomienda para determinar la presencia de entomopatógenos crónicos al establecer un pie de cría, es de suma importancia su validación mediante técnicas moleculares, lo cual también permitirá contestar a la interrogante de si el *Cypovirus* aislado de *D. magnifactella* persiste en forma inactiva o latente en esta población de insectos. Manteniendo la tesis de que en el pie de cría de *D. magnifactella*, no todos los individuos están infectados con el *Cypovirus*, es importante volver a aplicar el protocolo de selección de parejas reproductivas, tinción de las meconias y validar esta técnica molecularmente, de esta manera podremos ratificar esta técnica de tinción o descartarla en el futuro

En caso de no obtener individuos libres de *Cypovirus*, es de suma importancia determinar la fuente este patógeno, que puede ser debido a la contaminación de la dieta merídica con los CO's o bien que las poblaciones de *D. magnifactella* en campo, están naturalmente infectadas con este entomopatógeno. En caso de identificar sitios de cultivo de caña de azúcar, en los cuales los insectos no presenten la infección, podríamos establecer un nuevo pie de cría de *D. magnifactella* libre de *Cypovirus*.

4. HIPÓTESIS

H1: el escrutinio de un gen específico de *Cypovirus*, mediante RT-PCR, a partir de ARNm obtenido de parejas de reproducción del pie de cría de *D. magnifactella*, permitirá validar molecularmente la técnica de tinción de la meconia con Buffalo Black.

H2: El campo de Morelos podría ser fuente nativa de *Cypovirus* infectivos a *D. magnifactella*.

H3: Los componentes no estériles de la dieta merídica podrían transportar cuerpos de oclusión de *Cypovirus*.

H4: El *Cypovirus* aislado a partir de la cría de *D. magnifactella* puede no ser específico a este insecto.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Obtener un pie de cría de libre de *Cypovirus* elucidando la fuente de infección identificada en especímenes de *Diatraea magnifactella*, obtenidos a partir del escrutinio realizado con la técnica de tinción con Buffalo Black y determinar el rango de hospederos de aislado encontrado en la colonia.

5.2 Objetivos particulares

- Validar la sensibilidad de la técnica de tinción de la meconia con Buffalo Black.
- Determinar si la fuente de la infección por *Cypovirus* en el pie de cría de *D. magnifactella* fue ocasionada por contaminación cruzada.
- Determinar el Rango de hospederos del aislado del *Cypovirus* obtenido a partir del pie de Cría de *D. magnifactella*.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cría de *Diatraea magnifactella*

El material de *D. magnifactella* que se utilizó, fue obtenido a partir del pie de cría establecido en el Laboratorio de Control Biológico (CEIB-UAEM). Los huevos fueron desinfectados superficialmente con formaldehído al 15% (de acuerdo al protocolo descrito por Evans & Shapiro (1997). Al terminar el tren de desinfección, los huevos fueron secados sobre papel secante estéril y almacenados en cajas de Petri con tres divisiones a las cuales se les colocó un algodón humedecido con agua destilada estéril, las cajas fueron selladas con parafilm y finalmente se monitorearon hasta su eclosión.

Posterior a la eclosión las larvas neonatas fueron transferidas de manera individual con ayuda de un pincel desinfectado del número cero, a cajas de Petri de 50 mm de diámetro, donde previamente se colocó un trozo de dieta merídica de un tamaño aproximado de 1 cm³, a continuación, se sellaron con parafilm. Aproximadamente dos semanas después, las larvas de tercer instar se transfirieron individualmente (debido a sus hábitos caníbales) a dieta fresca, la cual es cambiada semanalmente hasta que alcanzan la etapa de pupa.

Las pupas fueron transferidas a cajas de Petri de 150 mm de diámetro, en donde previamente se colocó otra caja de Petri de 50 mm de diámetro con un trozo de algodón húmedo con agua destilada estéril y se mantuvieron en condiciones de insectario (temperatura de 27 ± 2°C, 70 ± 10% de humedad relativa y un foto-período de 12:12 L:O) por un periodo de tres días. Posterior a esto, determino el sexo a las pupas utilizando el método sugerido por Rincón y López-Ávila 2004 (Figura 6). Este método consiste en observar bajo el microscopio estereoscópico los últimos segmentos abdominales, para identificar la posición de la abertura genital.

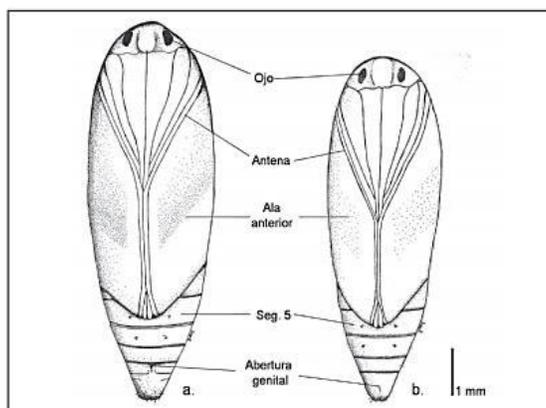


Figura 6. Pupas de *Tecia solanivora*, a) hembra, b) macho (Tomado de Rincón y López-Ávila, 2004).

A continuación, las 200 pupas (100 machos y 100 hembras) se lavaron con cloro al 0.15% durante 10 minutos y se lavaron 3 veces con agua destilada estéril por 5 minutos, posteriormente fueron secados con un papel absorbente estéril (Evans & Shapiro 1997). Consecutivamente, se colocaron de manera individual en recipientes de emergencia (botes de plástico transparentes con capacidad de 207 cm³, en donde se colocó con anterioridad un trozo de algodón humedecido con agua destilada estéril, para prevenir la deshidratación de las pupas, los recipientes fueron tapados con tela tipo organza de 10 x 10 cm sujetadas con ligas de plástico.

Los adultos se seleccionaron y se colocaron en parejas teniendo cuidado que el periodo de emergencia entre hembras y machos no fuese mayor a 24 horas. Cada pareja se colocó dentro de un bote de plástico transparente de un litro de capacidad, el cual se forró en el interior con hojas de papel bond, en donde previamente se depositaron dos recipientes pequeños con algodón, uno de ellos humedecido con agua estéril y el otro con una solución de miel al 15%. Posteriormente se cubrieron con una tela tipo organza sujeta con una liga plástica. Las masas de huevos de las parejas se recolectaron diariamente.

Posteriormente los machos se depositaron en recipientes individuales, debido a que los machos arrojan la meconia inmediatamente al emerger. En cambio, las hembras tardan en promedio 4 días en eliminar la meconia, por lo cual las pupas hembras una vez desinfectadas, se colocaron en botes de emergencia.

Una vez que emergieron las palomillas se formaron las parejas con individuos que no tuvieran más de 24 horas de emergencia. Cada pareja se colocó en un recipiente de reproducción con capacidad de un litro; en cada bote se colocaron dos recipientes conteniendo algodón estéril humedecido con agua y con miel al 15%. Se dejaron copular durante 48 horas una vez transcurrido el tiempo se recolectó el macho y se congeló a -80, la hembra se mantuvo durante 4 días con el propósito de obtener las oviposuras en el día 4 se capturó y se congeló a -80, la meconia depositada en el recipiente se recolectó y almacenó hasta su utilización en la técnica de tinción, las oviposuras resultantes se mantuvieron en condiciones normales de insectario.

6.2 Amplificación del gen de polihedrina de *Cypovirus* en adultos

La idea de realizar esta técnica era validar la tinción de la meconia con el colorante Buffalo Black, debido a que es un protocolo sugerido para la detección de entomopatógenos que ocasionan infecciones crónicas en los pies de cría de insectos. Adicionalmente esta técnica es muy económica, comparada con técnicas moleculares sugeridas para identificar genes específicos de VEs, por ejemplo, a partir de la obtención de DNA o RNA total de insectos, que si se realiza en larvas constituye un proceso invasivo, a diferencia de la técnica de tinción de la meconia.

En el proceso de selección de parejas reproductivas realizado por Rosas-Herrera (2015) aplicando la tinción de la meconia, se observó que, en la tercera generación de realizar la selección de las parejas reproductivas, de 37 parejas formadas ninguna dio positivo a la tinción, es decir no se observaron CO's teñidos de azul o negro en las meconias evaluadas (tabla 4). Con lo que se concluyó que los huevos con los que se continuó el pie de cría estaban libres del *Cypovirus*. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, un año después se volvió a detectar. Puesto que la técnica de tinción de la meconia se basa en que el colorante Buffalo Black se une a proteínas tiñéndolas de azul o negro, hemos considerado que una posibilidad es que, si el *Cypovirus* está inactivo o latente, podría ocasionar una infección inaparente de tal manera que no habría formación de CO's en el insecto hospedero

Si esto fuera el caso, la técnica de tinción de la meconia no es el protocolo adecuado para seleccionar individuos libres de *Cypovirus*. La idea era contestar ambos resultados esperando obtener una proyección como la siguiente:

Tabla 4. Proyección de la contrastación de los posibles resultados obtenidos con las técnicas de tinción de la meconia con Buffalo Black y amplificación de un gen específico a <i>Cypovirus</i> en las parejas reproductivas formadas.			
Número de pareja reproductiva	Resultado de la tinción		Posible amplificación del gen que codifica para la polihedrina <i>Cypovirus</i> por pareja
	Hembra	Macho	
P-1	+	+	Positivo
P-2	-	-	Negativo
P-3	+	-	Positivo
P-4	-	+	Positivo
P-5	-	-	Positivo

Para la amplificación del gen de la polihedrina, se obtiene RNA total siguiendo el protocolo del kid TRIzol (Ambion) utilizado por Carissimo *et al.*, 2016. El RNA total se obtiene por pareja de reproducción para optimizar los recursos. Posteriormente se sintetiza el cDNA por medio de transcriptasa reversa utilizando el kid ThermoScript reverse transcriptase (Invitrogen) utilizado por (Carissimo *et al.*, 2016). Posteriormente se realiza la técnica de PCR con oligos degenerados diseñados a partir de las secuencias de la polihedrina reportadas para *Cypovirus*. En la siguiente tabla se muestran las secuencias del segmento 10 reportadas de genes que codifican para la polihedrina.

Tabla 5. Secuencias de genes que codifican para la proteína polihedrina de <i>Cypovirus</i> secuenciados completamente.		
Especie	Especie hospedera	Ubicación
<i>Cypovirus 1</i>	<i>Lymantria dispar</i>	NC_003025.1 (42..788)
<i>Cypovirus 2</i>	<i>Inachis io</i>	NC_023495.1 (35..973)
<i>Cypovirus 5</i>	<i>Heliothis armigera</i>	NC_010661.1 (35..796)
<i>Cypovirus 14</i>	<i>Lymantria dispar</i>	NC_003015.1 (53..802)
<i>Cypovirus 15</i>	<i>Trichoplusia ni</i>	NC_002565.1 (31..777)
<i>Cypovirus 22</i>	<i>Dendrolimus punctatus</i>	NC_025841.1 (30..797)
	<i>Trichomonas vaginalis</i>	NW_001581531.1

6.3 Método de tinción de cuerpos de oclusión en meconias por medio del colorante Buffalo Black.

La técnica de tinción del colorante Buffalo Black está basada en la tinción de proteínas particularmente en aminoácidos básicos. El colorante es disuelto en ácido acético el cual lo solubiliza. Además de ayudar a disolver cristales y ácido úrico presentes en la meconia, esta técnica se ha utilizado por otros autores para identificar *Cypovirus* en meconias de adultos *Heliothis spp.* y *Helicoverpa zea* (Sikorowski *et al.*, 1971; Inglis *et al.*, 2003).

Se colocaron 10 µL de agua en un portaobjetos y se hizo un frotis de las meconias de las parejas, se distribuyó homogéneamente la alícuota y se dejó secar a temperatura ambiente. Enseguida se procedió a sumergir en una solución de Buffalo Black que contiene 1.5% de ácido acético glacial al 40% a temperatura de 40-45 °C por un lapso de 5 minutos. Posteriormente se dejó secar y se observó bajo el microscopio. Este protocolo se realizó de acuerdo a lo descrito por Evans & Shapiro (1997).

6.4 Búsqueda de *Cypovirus* en especímenes de *D. magnifactella* colectados en el estado de Morelos

Para determinar si el campo de Morelos, específicamente los cultivos de caña de azúcar, es la fuente del *Cypovirus* en el pie de cría de *D. magnifactella*, se realizaron colectas en diferentes zonas cañeras del estado de Morelos (Xochitepec, Tlaquiltenango, Coatlán del Rio, Ayala). La selección de los municipios se realizó de acuerdo a su distancia geográfica buscando que se encontraran lo más lejano posible entre municipios cañeros. Las larvas de *D. magnifactella* colectadas se transportaron al Laboratorio de Control Biológico. Primeramente, se realizó un procedimiento de desinfección superficial siguiendo el protocolo descrito por Cuevas Molina (2015).

Una vez desinfectadas se procedió a contarlas y dividir las equitativamente en tres grupos. Al primer grupo se le realizó la disección inmediata, su propósito fue observar poliedrosis inmediata en los especímenes recolectados para determinar la presencia de *Cypovirus* en el campo de Morelos.

El grupo dos se alimentó con dieta meridica elaborada con suministros propios del Laboratorio de Control Biológico durante 5 días. Las larvas del grupo tres fueron alimentadas durante 5 días con caña de azúcar desinfectada superficialmente con hipoclorito de sodio al 0.15%; traída desde el lugar en que se recolectaron los especímenes. Ambos grupos fueron mantenidos durante los 5 días a 18 °C y un fotoperiodo de 12:12 L:O. El objetivo de formar estos grupos fue elucidar si la dieta podría ser la fuente de contaminación con *Cypovirus*. Debido a que este patógeno ocasiona infecciones crónicas que se desarrollan lentamente, se incubaron a 18 °C porque está reportado que una disminución de la temperatura óptima de crecimiento, de al menos 5 °C durante un día, puede activar un *Cypovirus* en el hospedero.

En los grupos 2 y 3, la disección de los intestinos se realizó trascurridos los 5 días de incubación. Una vez recolectados los intestinos se registró la apariencia de poliedrosis evidente a continuación se tomó una porción intestinal y se realizó una preparación en fresco y se observó al microscopio óptico para determinar la presencia de signos de infección por *Cypovirus* (Buscando principalmente células hipertrofiadas con cuerpos proteicos refringentes y con movimiento browniano). El resto del intestino se colocó en un tubo Eppendorf estéril con 100 uL de agua destilada estéril, los cuales se almacenaron en refrigeración hasta procesamiento. Una vez sometidos al tratamiento de purificación que se describió anteriormente, se tomó una alícuota de 10 uL y se realizó un frotis al estar seco completamente se tiñó mediante la técnica de Buffalo Black.

La proyección de los posibles resultados de este experimento son las siguientes:

1. Intestinos lechosos y/o presencia de células del intestino hipertrofiadas con presencia de CO's refringentes, en larvas del grupo 1. Explicación: las poblaciones de *D. magnifactella* presentan de manera natural infecciones por *Cypovirus*.
2. Intestinos lechosos y/o presencia de células del intestino hipertrofiadas con presencia de CO's refringentes en larvas del grupo 2, pero no en larvas del grupo 3. Explicación: la dieta es fuente de contaminación del *Cypovirus*.
3. Intestinos lechosos y/o presencia de células del intestino hipertrofiadas con presencia de CO's refringentes en larvas del grupo 2 y 3, pero no en larvas del grupo 1. Explicación: las poblaciones de campo de *D. magnifactella* presentan *Cypovirus* de forma natural, pero los individuos colectados pueden presentar infecciones no aparentes, que son evidenciadas cuando el virus se activa por bajas temperaturas.

6.5 Amplificación del *Cypovirus* en larvas de *Diatraea magnifactella*

6.5.1 Pre-amplificación

El inóculo inicial para la contaminación de larvas requeridas para la pre-amplificación del *Cypovirus*, se obtuvo de un individuo, el cual presentaba los signos típicos de poliedrosis detectado en la generación 23, al que se le disectó el intestino, se trituró y purificó (tratado con SDS al 0.5 y posteriores lavados con agua destilada y centrifugados de 14 000 entre cada intervalo) de acuerdo a Obregón Barboza (2006).

La infección de larvas se realizó sobre 20 individuos en el tercer estadio, a los cuales se les retiró el alimento 24 horas antes de la infección, la contaminación se realizó tomando 10 µL del inóculo inicial, los cuales fueron depositados en la dieta merídica sin formalina de un 1 cm³ aproximadamente a la cual anteriormente se le realizó un orificio en donde se colocó la suspensión y se dejó reposar durante una hora, a continuación se colocaron las larvas en donde se mantuvieron durante 30 días.

Una vez transcurrido este tiempo se colectaron los individuos y se les disectó el intestino. Primeramente, se seccionaron de la parte posterior y anterior del cuerpo de la larva de tal manera que se separaron la cabeza y el ano. A continuación, con ayuda de un palillo estéril se sujetó la parte posterior desde la cutícula tratando de no sujetar el intestino. Consecutivamente con una pinza de disección de punta fina estéril se sujetó el intestino de la parte anterior y con un solo movimiento suave y con fuerza constante se separó el intestino del resto del cuerpo larval.

El intestino fue depositado en un tubo eppendorf de 1.5 mL con 100 μ L de agua estéril y almacenado a 4 °C y aislado de la luz. A continuación, a cada uno de los viales obtenidos se les añadieron 400 μ L de SDS estéril al 50% y con ayuda de un pistilo estéril se trituraron suavemente, manteniéndolos en una cama de hielo por un periodo de 15 minutos. Posteriormente los viales fueron centrifugados a 10 000 rpm por 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se aforó 500 μ L y se centrifugó en las condiciones anteriormente descritas, este procedimiento se realizó dos veces más. La suspensión de cuerpos de oclusión obtenida se guardó a 4 °C aislándola de la luz.

6.5.2 Amplificación

Se seleccionaron y tomaron 2 de los tubos eppendorf con la muestra de la pre-amplificación que contenía el total de CO's de un solo intestino por tubo (Equivalente larval), se cuantificó la cantidad de cuerpos de oclusión con ayuda de una cama de Neubauer y el tubo 1 tuvo presentó una concentración de 1.9×10^7 y el tubo de 2.53×10^7 . De esta suspensión de cuerpos de oclusión se tomaron 10 μ L, se inocularon independientemente y se contaminaron y mantuvieron 80 larvas en el tercer estadio. Los cuerpos de oclusión se purificaron con las mismas condiciones anteriormente descritas.

6.6 Método de inoculación en hospederos para determinar el rango de hospederos del *Cypovirus* aislado en pie de cría de *D. magnifactella* CEIB-UAEM

Para determinar si el *Cypovirus* aislado en la colonia de *D. magnifactella* es específico a este hospedero, se decidió inocular a otros 3 Lepidópteros (*Manduca sexta*, *Spodoptera frugiperda* y *Galleria mellonella*). A los insectos utilizados se les retiró el alimento 12 horas antes de administrarles el virus. El método de inoculación se realizó de la siguiente forma; se tomaron de la solución stock 15 μ L con la concentración de 1×10^7 CO's de *Cypovirus* la gota de la suspensión viral se colocó sobre Parafilm. A continuación, se succionó la suspensión con ayuda de una jeringa para insulina de 15 μ L a la que con anterioridad se eliminó el filo de la punta; para evitar el daño intestinal al introducirla.

Posteriormente, los insectos se tomaron y colocaron en un microscopio estereoscópico enfocando principalmente el aparato bucal, con extremo cuidado se introdujo la punta de la jeringa al aparato bucal del insecto y se inyectó la solución viral. Al finalizar los insectos fueron colocados en recipientes individuales y se mantuvieron durante 5 días en condiciones de insectario hasta su disección y procesamiento de los intestinos o la meconia según sea el caso del Lepidóptero.

Este procedimiento de inoculación fue intentado sobre *Tenebrio molitor*, pero debido al aparato bucal de estos insectos no fue posible. Se optó por contaminar el alimento, para ello, a los granos de avena estéril se le añadieron 750 μL , se colocaron individualmente en un recipiente y mantuvieron durante 10 días. Dentro del recipiente también se colocó un algodón húmedo, al que se le añadió agua cuando fuera necesario.

7. Resultados

7.1 Formación de parejas de reproducción de *D. magnifactella*

Tras el proceso de selección de pupas se recolectaron 100 pupas machos y 100 hembras de la cría de *D. magnifactella*. Como los tiempos de las pupas no son iguales, ya que emergían en diferentes días, y tomando en cuenta que las deformaciones aún siguen presentes en la colonia, se observaron adultos deformes, los cuales fueron excluidos. Las deformaciones estaban focalizadas en las alas y esto les impide volar.

Al no volar no podrán copular y esto resultará en una pareja que no tendrá descendencia. No obstante, se lograron formar 69 parejas de reproducción pese a las dificultades. Sin embargo, los adultos copulaban, pero no obtuvimos descendencia fértil solo en pocos casos aislados ver tabla 6.

Pareja de reproducción	Masas de huevos	Cantidad de larvas recuperadas
1	Inviabiles	0
2	Inviabiles	0
3	Inviabiles	0
4	Inviabiles	0
5	Inviabiles	0
6	Inviabiles	0
7	Viabiles	2
8	Inviabiles	0
9	Viabiles	108
10	Inviabiles	0
11	Viabiles	6
12	Viabiles	18
13	Inviabiles	0
14	Viabiles	6
15	Viabiles	89
16	Inviabiles	0
17	Inviabiles	0
18	Inviabiles	0
19	Inviabiles	0
20	Inviabiles	0
21	Viabiles	4
22	Sin masas	0
23	Inviabiles	0
24	Inviabiles	0
25	Inviabiles	0
26	Sin masas	0
27	Sin masas	0
28	Sin masas	0
29	Inviabiles	0
30	Inviabiles	0
31	Inviabiles	0
32	Inviabiles	0
33	Viabiles	31
34	Inviabiles	0

35	Sin masas	0
36	Sin masas	0
37	Sin masas	0
38	Sin masas	0
39	Inviabiles	0
40	Inviabiles	0
41	Inviabiles	0
42	Inviabiles	0
43	Inviabiles	0
44	Inviabiles	0
45	Viables	15
46	Inviabiles	0
47	Inviabiles	0
48	Inviabiles	0
49	Inviabiles	0
50	Sin masas	0
51	Inviabiles	0
52	Inviabiles	0
53	Inviabiles	0
54	Inviabiles	0
55	Sin masas	0
56	Inviabiles	0
57	Inviabiles	0
58	Inviabiles	0
59	Inviabiles	0
60	Inviabiles	0
61	Inviabiles	0
62	Sin masas	0
63	Sin masas	0
64	Sin masas	0
65	Sin masas	0
66	Inviabiles	0
67	Inviabiles	0
68	Inviabiles	0
69	Inviabiles	0

Viables: Lotes de huevos que presentaron un porcentaje ≥ 90 de huevos con presencia de cápsula cefálica. **Inviabiles:** lotes de huevos que presentaron un porcentaje ≥ 10 de huevos de color café-rojizo.

7.2 Tinción de Meconia de parejas de reproducción de *D. magnifactella* con descendencia fértil.

Las tinciones con Buffalo Black se realizaron sólo de las parejas de reproducción que tuvieron descendencia fértil ya que el principal propósito fue encontrar parejas de reproducción que tuvieran descendencia para poder continuar con las consecuentes pruebas moleculares. Aunque, de acuerdo a los resultados obtenidos de la cantidad de progenie registrada se decidió solo realizar prueba de tinción de meconia a las siguientes parejas que se muestran en la tabla 7. El fin de este experimento fue identificar parejas con reproducción negativa para evaluar la viabilidad de la técnica para que el de este proceso de selección partiera la nueva colonia.

Tabla 7. Resultado de tinciones de meconias de parejas de reproducción de *D. magnifactella* con progenie.

Rotulo de pareja de reproduction	Masas de huevos	Cantidad de larvas recuperadas	Tinción de meconia (macho)	Tinción de meconia (hembra)
7	Viabiles	2	Positivo	Positivo
9	Viabiles	108	Positivo	Positivo
11	Viabiles	6	Positivo	Positivo
12	Viabiles	18	Positivo	Positivo
14	Viabiles	6	Negativo	Positivo
15	Viabiles	89	Negativo	Positivo
21	Viabiles	4	Positivo	Negativo
33	Viabiles	31	Positivo	Positivo
45	Viabiles	15	Negativo	Positivo
Restates	Inviabiles	0	***	***

7.3 Determinación de portadores de la infección por *Cypovirus* en *D. magnifactella*

Se contaminaron 10 larvas de *D. magnifactella* (5 machos y 10 hembras) con 5×10^7 CO's del *Cypovirus* aislado en *D. magnifactella* se expusieron durante 3 días y posteriormente fueron mantenidos en condiciones de insectario. Hasta que puparan y emergieran, una vez emergidas se recolectó la meconia y se tiño. De acuerdo a lo obtenido se observó que ambos adultos son portadores de la infección (ver tabla 8), aunque no sabemos cuál de los dos contagie a los descendientes. Sin embargo, esto es un indicio muy importante en la elucidación de la transición horizontal de *Cypovirus* (ver figura 7).

Tabla 8. Tinción de meconias de adultos de *D. magnifactella* contaminados con *Cypovirus* para determinar portadores.

Macho de <i>D. magnifactella</i>	Tinción de con Bufallo Black
1	Positivo
2	Positivo
3	Positivo
4	Positivo
5	Positivo
Hembra de <i>D. magnifactella</i>	
1	Positivo
2	Positivo
3	Positivo
4	Positivo
5	Positivo

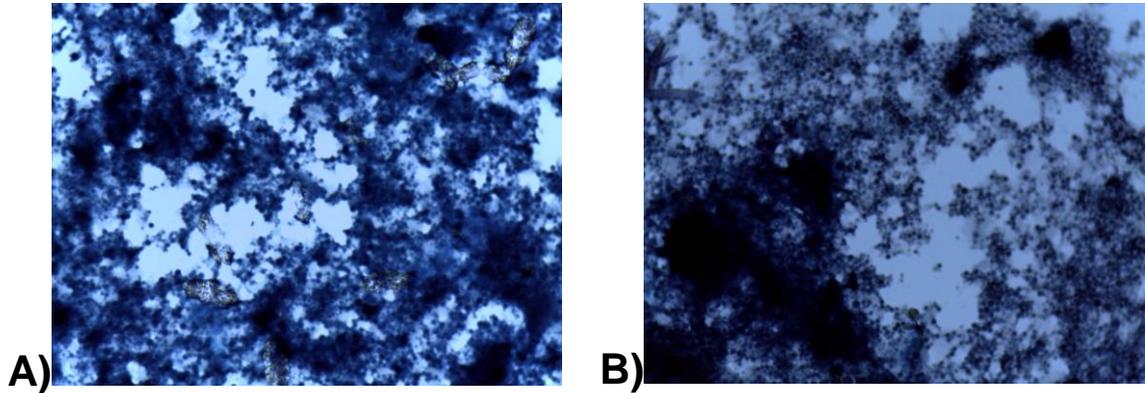


Figura 7. A) Meconia teñida de hembra de *D. magnifactella*, B) Meconia de macho de *D. magnifactella*.

7.4 Colecta en campo de larvas de *D. magnifactella* en el estado de Morelos

7.4.1 Municipio de Tlaquiltenango

Se realizó la colecta de lavas en el municipio de Tlaquiltenango, en donde se lograron recolectar un total de 21 larvas (15 vivas y 6 muertas). Las larvas se desinfectaron superficialmente de acuerdo al protocolo descrito anteriormente y las larvas vivas se dividieron en tres grupos. El grupo 1: se sometieron a los tratamientos de disección inmediata, grupo 2: las larvas fueron transferidas a dieta meridica (18 °C) y el grupo 3: fueron alimentadas con caña de azúcar desinfectada, descrito previamente en la metodología. Las larvas del grupo 2 y 3 se mantuvieron a 18 °C por 5 días, con un fotoperiodo de 12:12 L:O. Transcurrido el tiempo se obtuvo el intestino y se observó en el microscopio con la intención de encontrar células hipertrofiadas (Figura 8). A los intestinos se les realizó el protocolo de extracción de cuerpos de oclusión (SDS) y la tinción con colorante Buffalo Black. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 9.



Figura 8. Muestra al fresco de intestino de larva de *D. magnifactella* colectada en Tlaquiltenango. Donde se observa la presencia de células hipertrofiadas con cuerpos de oclusión refringentes y células en proceso de desintegración liberando los CO's.

Tabla 9. Datos obtenidos a partir de las larvas de *D. magnifactella* colectadas en el municipio de Tlaquiltenango.

Tratamientos	Larva	Parámetros observados	
		Apariencia del intestino	Tinción con colorante Buffalo Black
Disección inmediata	1	Normal	Positivo
	2	Normal	Positivo
	3	Normal	Positivo
	4	Normal	Positivo
	5	Normal	Positivo
Dieta meridica (18 °C)	1	Normal	Positivo
	2	Normal	Negativo
	3	Normal	Positivo
	4	Normal	Negativo
	5	Normal	Negativo
Caña de azúcar (18 °C)	1	Normal	Positivo
	2	Normal	Negativo
	3	Normal	Positivo

De acuerdo a los datos obtenidos se demuestra la existencia de *Cypovirus* infectivos a larvas de *D. magnifactella* en este sitio del estado de Morelos, cabe señalar que no todas las larvas recolectadas estaban infectadas, además de que el grado de infección no es tan fuerte pues la apariencia del intestino es normal, aunque al revisar los signos de infección celular se lograron observar muestras positivas Figura 8. No obstante la confirmación final fue la tinción con Buffalo Black (ver figura 9).

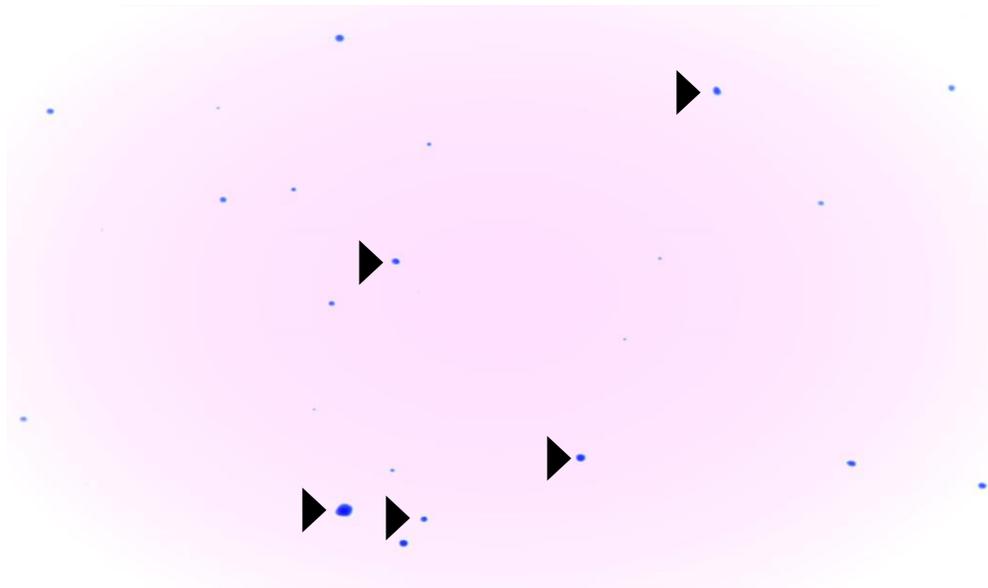


Figura 9. Tinción de cuerpos de oclusión de *Cypovirus* colectados en el municipio de Tlaquiltenango. Las flechas indican CO's de *Cypovirus* teñidos.

7.4.2 Municipio de Xochitepec

Al realizar la colecta en el municipio de Xochitepec se obtuvieron 32 larvas (9 muertas y 23 vivas), solo a las vivas se les sometió a los tratamientos anteriormente descritos, de igual manera se observaron al microscopio muestras de intestinos (ver figura 10). Se les extrajeron los cuerpos de oclusión para posteriormente ser teñidos (Figura 11). Los resultados arrojados se muestran en la tabla 10.



Figura 10. Muestra al fresco de intestino de larva de *D. magnifactella* colectada en Xochitepec. En el círculo se observa la presencia de CO's refringentes característicos de *Cypovirus*.

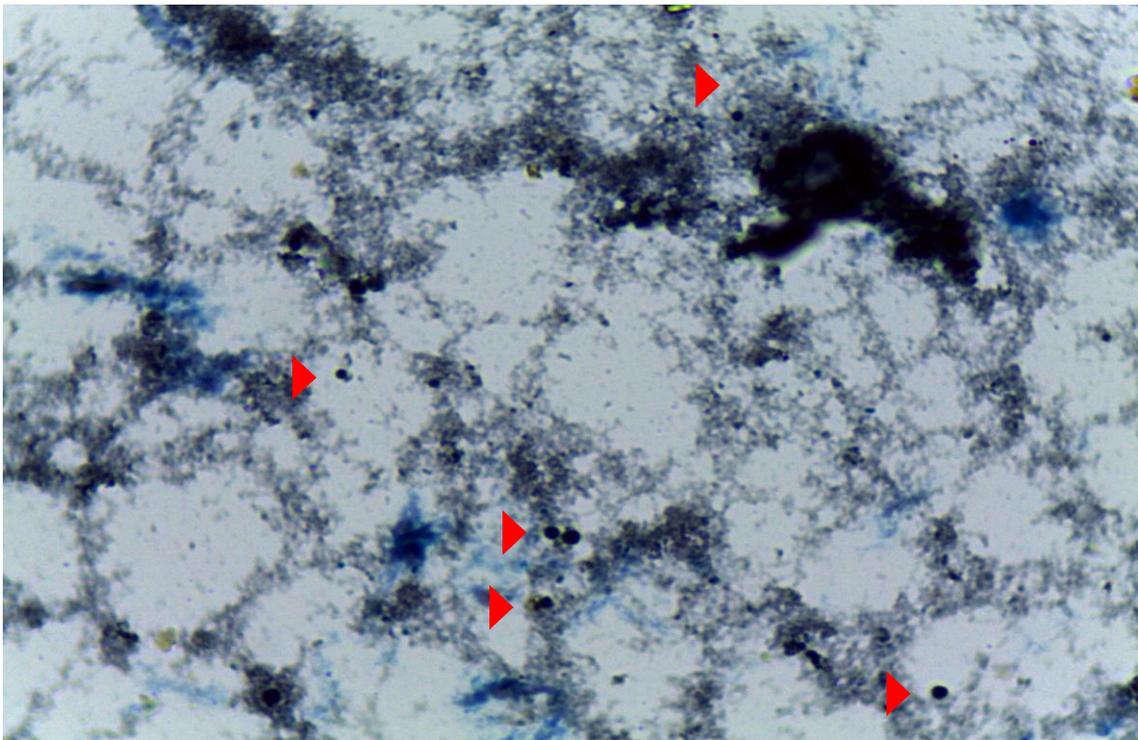


Figura 11. Tinción de cuerpos de oclusión colectados en el municipio de Xochitepec. Las flechas señalan CO's de *Cypovirus* tenidos.

Tabla 10. Datos obtenidos a partir de las larvas de <i>D. magnifactella</i> colectadas en el municipio de Xochitepec.			
Tratamientos	Larva	Parámetros observados	
		Apariencia del intestino	Tinción con colorante Buffalo Black
Disección inmediata	1	Normal	Positivo
	2	Normal	Positivo
	3	Normal	Negativo
	4	Normal	Positivo
	5	Normal	Positivo
	6	Normal	Negativo
	7	Normal	Negativo
	8	Normal	Positivo
Dieta meridica (18 °C)	1	Normal	Positivo
	2	Normal	Negativo
	3	Normal	Positivo
	4	Normal	Negativo
	5	Normal	Negativo
Caña de azúcar (18 °C)	1	Normal	Positivo
	2	Normal	Negativo
	3	Normal	Negativo
	4	Normal	Negativo
	5	Normal	Positivo

Los datos obtenidos reflejan que al igual que Tlaquiltenango, Xochitepec es positivo para la presencia de *Cypovirus* infectivos de larvas de *D. magnifactella*, al tiempo que se observa no todos los organismos colectados presentaron infección en el intestino. Al ser aislados de diferente lugar cabe la posibilidad de tratarse de diferentes virus a los ya encontrados en el municipio de Tlaquiltenango, por esta razón serán tratados por separado.

7.4.3 Municipio de Coatlán del Río

Al culminar la colecta en el municipio de Coatlán del río, se obtuvieron una total de 46 (Muertas 20 y 26 vivas) se procesaron con las condiciones anteriormente descritas en los demás municipios. Los intestinos de estas larvas no presentaban signos típicos de infección por *Cypovirus* (células intestinales hipertrofiadas), de igual manera en la tinción con el colorante Buffalo Black no se edificaron estructuras con forma de *Cypovirus* (ver tabla 11). Sin embargo, se logró colectar una larva dentro de un tallo de caña de azúcar con signos típicos de infección por baculovirus (Figura 12), cutícula flácida, apariencia lechosa y órganos internos licuado.

La infección estaba tan avanzada que se trató de coleccionar el intestino, pero no fue posible, la larva infectada se resuspendió en diferentes tubos eppendorf para observar si la suspensión obtenida es de color blanco característica de los cuerpos de oclusión conglomerados ver figura 13.



Figura 12. Larva de *D. magnifactella* colectada en Coatlán de Río con signos típicos de infección por baculovirus encontrada dentro del tallo de una planta de caña de azúcar.



Figura 13. Cuerpos de oclusión obtenidos de larva de *D. magnifactella* colectada en la comunidad San Andrés perteneciente al municipio de Coatlán del Río.

Tabla 11. Datos obtenidos a partir de las larvas de <i>D. magnifactella</i> colectadas en el municipio de Coatlán del Río.			
Tratamientos	Larva	Parámetros observados	
		Apariencia del intestino	Tinción con colorante Buffallo Black
Disección inmediata	1	Normal	Negativo
	2	Normal	Negativo
	3	Normal	Negativo
	4	Normal	Negativo
	5	Normal	Negativo
	6	Sin recolectar	Positivo (granulovirus) Negativo <i>Cypovirus</i>
	7	Normal	Positivo (granulovirus) Negativo <i>Cypovirus</i>
	8	Normal	Negativo
	9	Normal	Negativo
	10	Normal	Negativo
Dieta meridica (18 °C)	1	Normal	Negativo
	2	Normal	Negativo
	3	Normal	Positivo (granulovirus) Negativo <i>Cypovirus</i>
	4	Normal	Negativo
	5	Normal	Negativo
	6	Normal	Negativo
	7	Normal	Negativo
	8	Normal	Negativo
	9	Normal	Negativo
	10	Normal	Negativo
	11	Normal	Negativo
Caña de azúcar (18 °C)	1	Normal	Negativo
	2	Normal	Negativo
	3	Normal	Negativo
	4	Normal	Negativo
	5	Normal	Negativo

Para determinar si se trataban de granulovirus o nucleopolihedrovirus se procedió a observarlos bajo el microscopio (Figura 14). Por el tamaño y la forma se logró determinar preliminarmente que se trata de un granulovirus la confirmación final fue bajo la tinción de cuerpos de oclusión (Figura 15). Al observarlos ciertamente se consiguió identificar un granulovirus, aunque en las tinciones se observan estructuras con tamaños diferentes y con forma de tetraedros esta es una forma observada en nucleopolihedrovirus (Figura 16).

Posteriormente se amplificó este aislado procedente de campo en larvas de *D. magnifactella* con las condiciones señaladas anteriormente. Se contaminaron un total de 20 larvas a las cuales se les extrajeron los cuerpos de oclusión. El procedimiento fue diferente al de extracción de cuerpos de oclusión de *Cypovirus* este se describe enseguida.

Las larvas se sometieron a desinfección superficial, posteriormente se secaron y se tomaron con unas pinzas estériles para poder hacerles un pinchazo en la propata esto se realizó con el objetivo de obtener hemolinfa pura, posteriormente se realizó la disección del intestino para eliminar los posibles *Cypovirus* presentes. El resto del cuerpo se colocó por separado debido a que en este se encuentra el tejido graso uno de los principales lugares de replicación de baculovirus. Los viales obtenidos de la amplificación fueron almacenados a 4 grados y aislados de la luz hasta su utilización en las diferentes caracterizaciones.



Figura 14. Muestra al fresco de tejido de larva de *D. magnifactella* colectada en Coatlán del Río infectada con granulovirus. En el círculo central se observa una célula hipertrofiada por granulovirus.

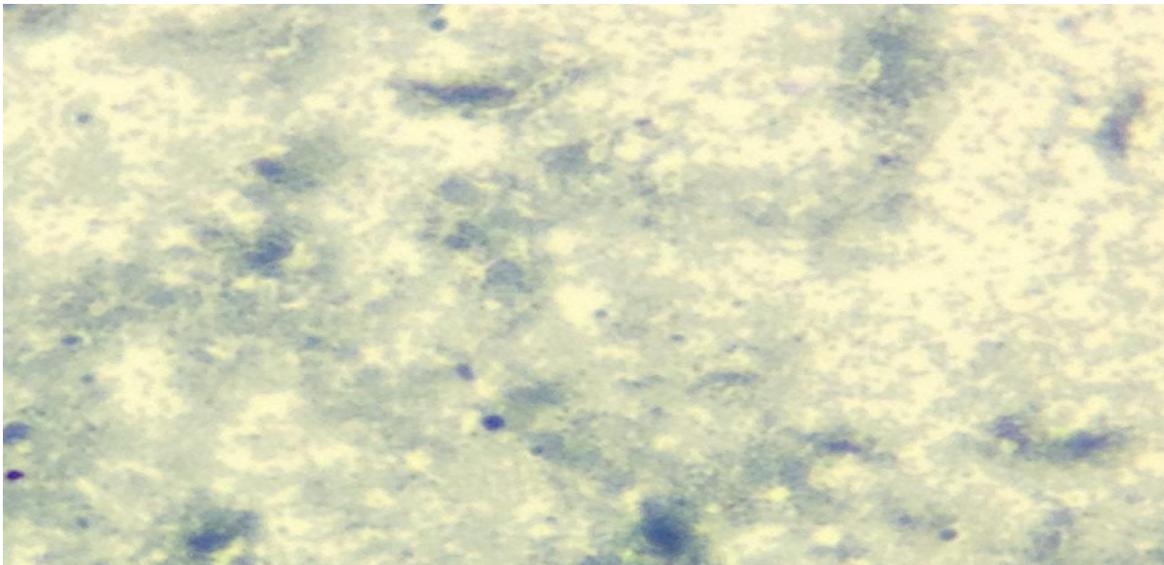


Figura 15. Tinción de cuerpos de oclusión de granulovirus (Mancha azul del fondo de la imagen) obtenidos larva de *D. magnifactella* colectada en el municipio de Coatlán del Río.

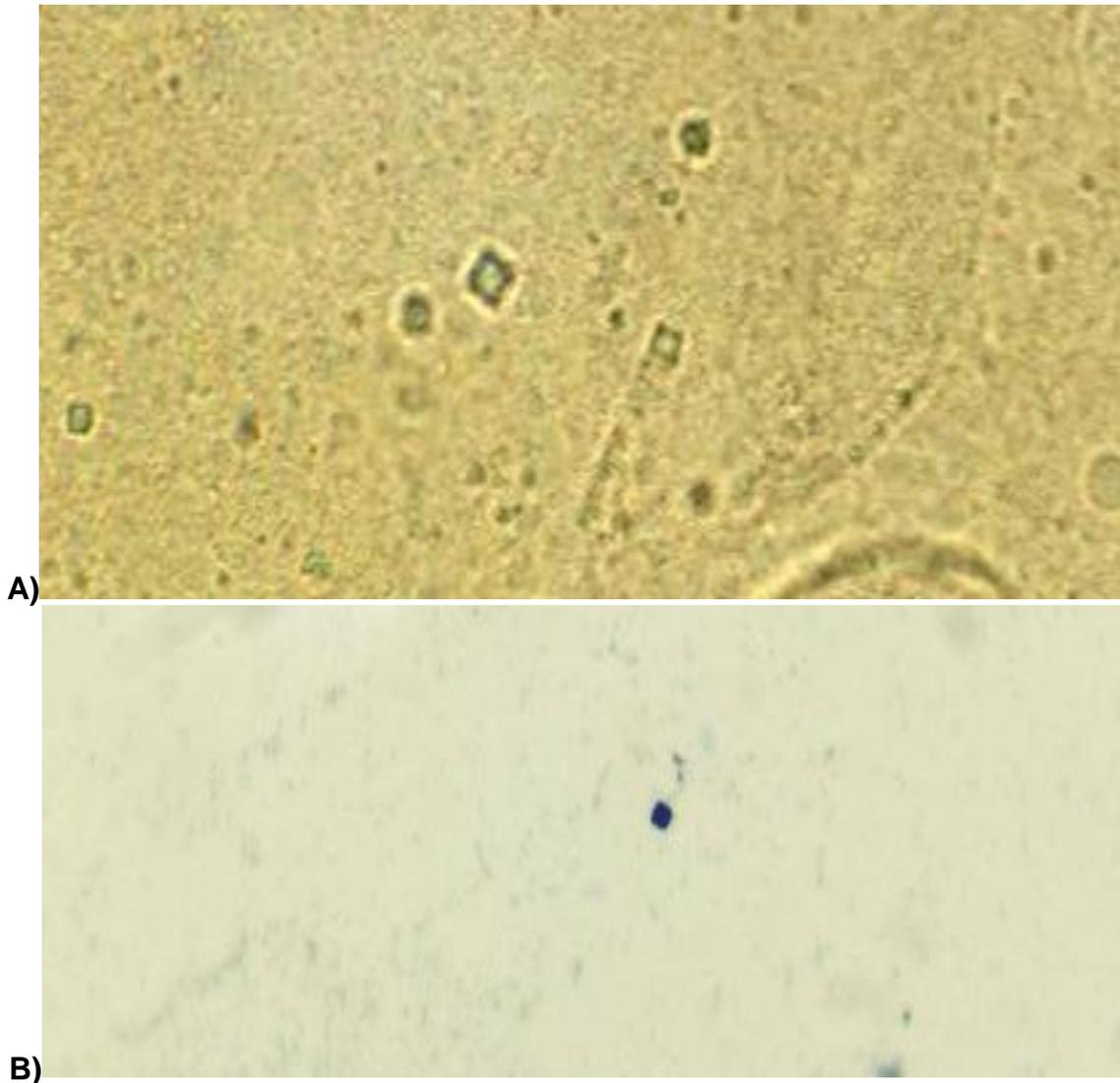


Figura 16. A) Muestra al fresco de tejido de larvas con infección de granulovirus en donde se observan estructuras tetraédricas estructura típica de nucleopolihedrovirus. B) Tinción con Buffalo Black de amplificación de granulovirus de estructuras tetraédricas encontradas en el municipio de Coatlán del Río.

Los poliedros encontrados en las larvas colectas en campo se volvieron a observar en las larvas infectadas esto es un indicio de que se trata de virus entomopatógenos, aunque no explicamos cómo estos dos virus estén infectando al mismo tiempo un hospedero, cabe señalar que el granulovirus se encuentra en mayor número en todos los casos. Por otro lado, las larvas colectadas en el municipio de Coatlán del río resultaron ser negativas a la presencia de *Cypovirus*; pero positivos a la infección por granulovirus en todo caso este es el primer municipio sin presencia de *Cypovirus*. Esto lo coloca como el lugar en donde se podrán colectar larvas para iniciar una cría nueva o refrescar el pool genético de la colonia establecida en el Laboratorio de control biológico.

7.4.4 Municipio de Ayala

Al concluir la colecta realizada en el municipio de Ayala se obtuvieron un número total de 60 larvas. Se dividieron en los tratamientos anteriormente descritos, de igual manera se observaron al microscopio muestras de intestinos, ver figura 17. De igual forma se les extrajeron los cuerpos de oclusión para posteriormente ser teñidos (Figura 18). Los resultados arrojados se muestran en la tabla 12.

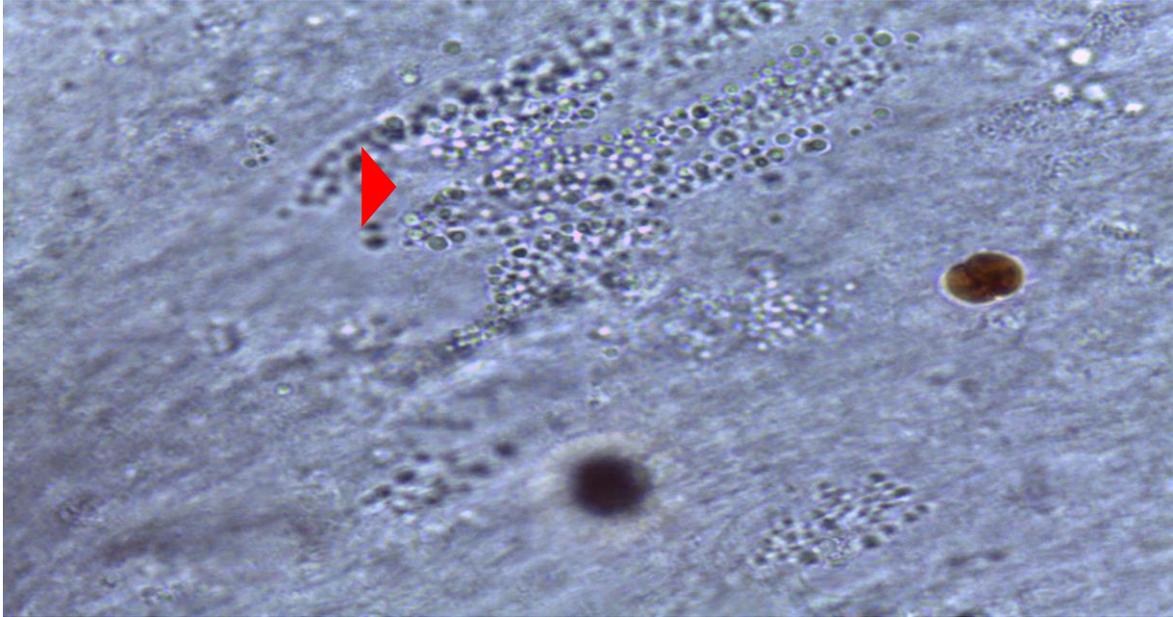


Figura 17. Muestra al fresco de intestino de larva de *D. magnifactella* colectada en Ayala. La flecha indica células hipertrofiadas y presencia de CO's refringentes característicos de *Cypovirus*

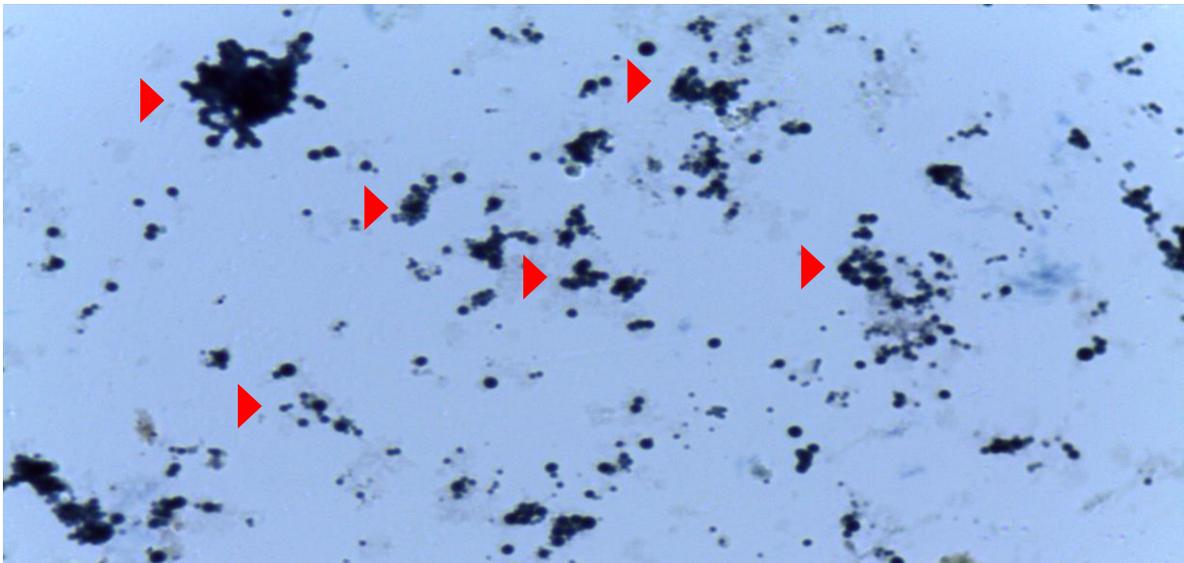


Figura 18. Tinción de cuerpos de oclusión colectados en el municipio de Ayala. Las flechas indican CO's de *Cypovirus* teñidos.

Tabla 12. Datos obtenidos a partir de las larvas de *D. magnifactella* colectadas en el municipio de Ayala.

Tratamientos	Larva	Parámetros observados	
		Apariencia del intestino	Tinción con colorante Buffalo Black
Disección inmediata	1	Normal	Negativo
	2	Normal	Negativo
	3	Normal	Negativo
	4	Normal	Negativo
	5	Normal	Negativo
	6	Normal	Negativo
	7	Normal	Positivo
	8	Normal	Negativo
	9	Normal	Negativo
	10	Normal	Negativo
	11	Normal	Negativo
	12	Normal	Negativo
	13	Normal	Positivo
	14	Normal	Negativo
	15	Normal	Negativo
	16	Normal	Negativo
	17	Normal	Negativo
	18	Normal	Positivo
	19	Normal	Positivo
	20	Normal	Negativo
Dieta meridica (18 °C)	1	Normal	Negativo
	2	Normal	Positivo
	3	Normal	Positivo
	4	Normal	Negativo
	5	Normal	Negativo
	6	Normal	Negativo
	7	Normal	Negativo
	8	Normal	Negativo
	9	Normal	Negativo
	10	Normal	Negativo
	11	Normal	Negativo
	12	Normal	Negativo
	13	Normal	Negativo
	14	Normal	Negativo
	15	Normal	Negativo
	16	Normal	Positivo
	17	Normal	Negativo
	18	Normal	Negativo
	19	Normal	Negativo
	20	Normal	Negativo
Caña de azúcar (18 °C)	1	Normal	Negativo
	2	Normal	Negativo
	3	Normal	Negativo
	4	Normal	Negativo
	5	Normal	Positivo
	6	Normal	Positivo

	7	Normal	Positivo
	8	Normal	Positivo
	9	Normal	Positivo
	10	Normal	Negativo
	11	Normal	Negativo
	12	Normal	Positivo
	13	Normal	Negativo
	14	Normal	Negativo
	15	Normal	Negativo
	16	Normal	Negativo
	17	Normal	Negativo
	18	Normal	Negativo
	19	Normal	Negativo
	20	Normal	Negativo

7.5 Revisión del inóculo original y amplificación en larva del *Cypovirus*

Antes de realizar las infecciones se procedió a observar la suspensión de virus inicial (Figura 19). Esto con el fin de corroborar que se encontrara en óptimas condiciones y no existiera degradación de cuerpos de oclusión. Posteriormente se realizó la pre-amplificación del *Cypovirus* la cual resultó exitosa. 7 días posteriores a la contaminación, se obtuvieron los intestinos de 2 larvas para determinar si existía infección (Figura 20). Se lograron observar intestinos con apariencia lechosa signo típico de poliedrosis, la confirmación final se realizó tomando un frotis de los intestinos y observándolos al microscopio, ver Figura 21.

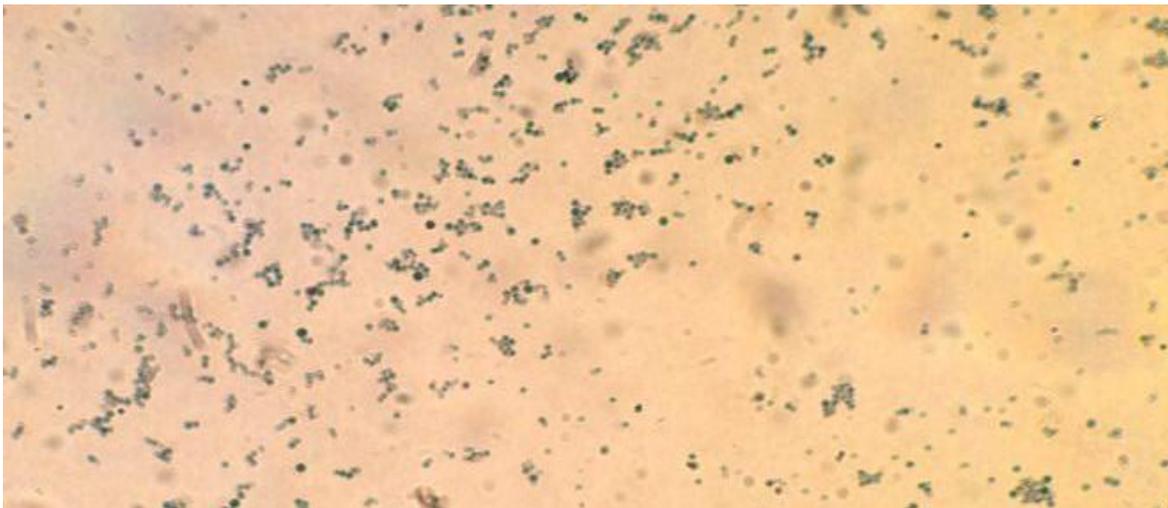
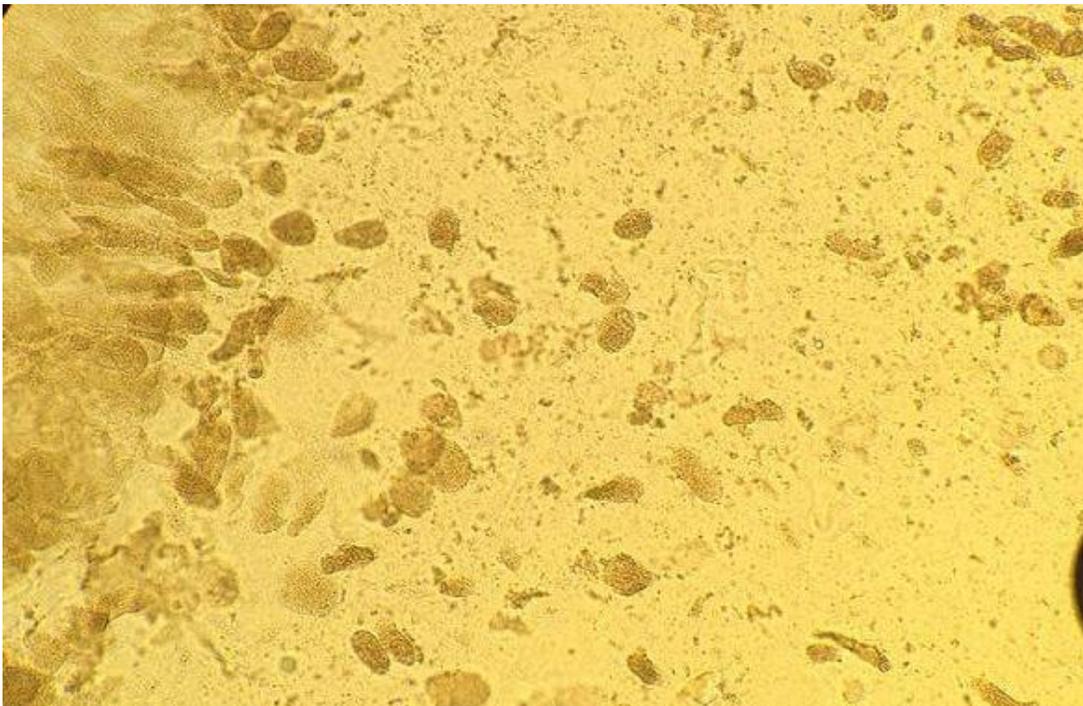


Figura 19. Tinción de cuerpos de oclusión del *Cypovirus* con Buffalo Black del inóculo inicial (100x).



Figura 20. Disección de larvas de *D. magnifactella* contaminadas mostrando síndrome de intestino lechoso (poliedrosis).



A)

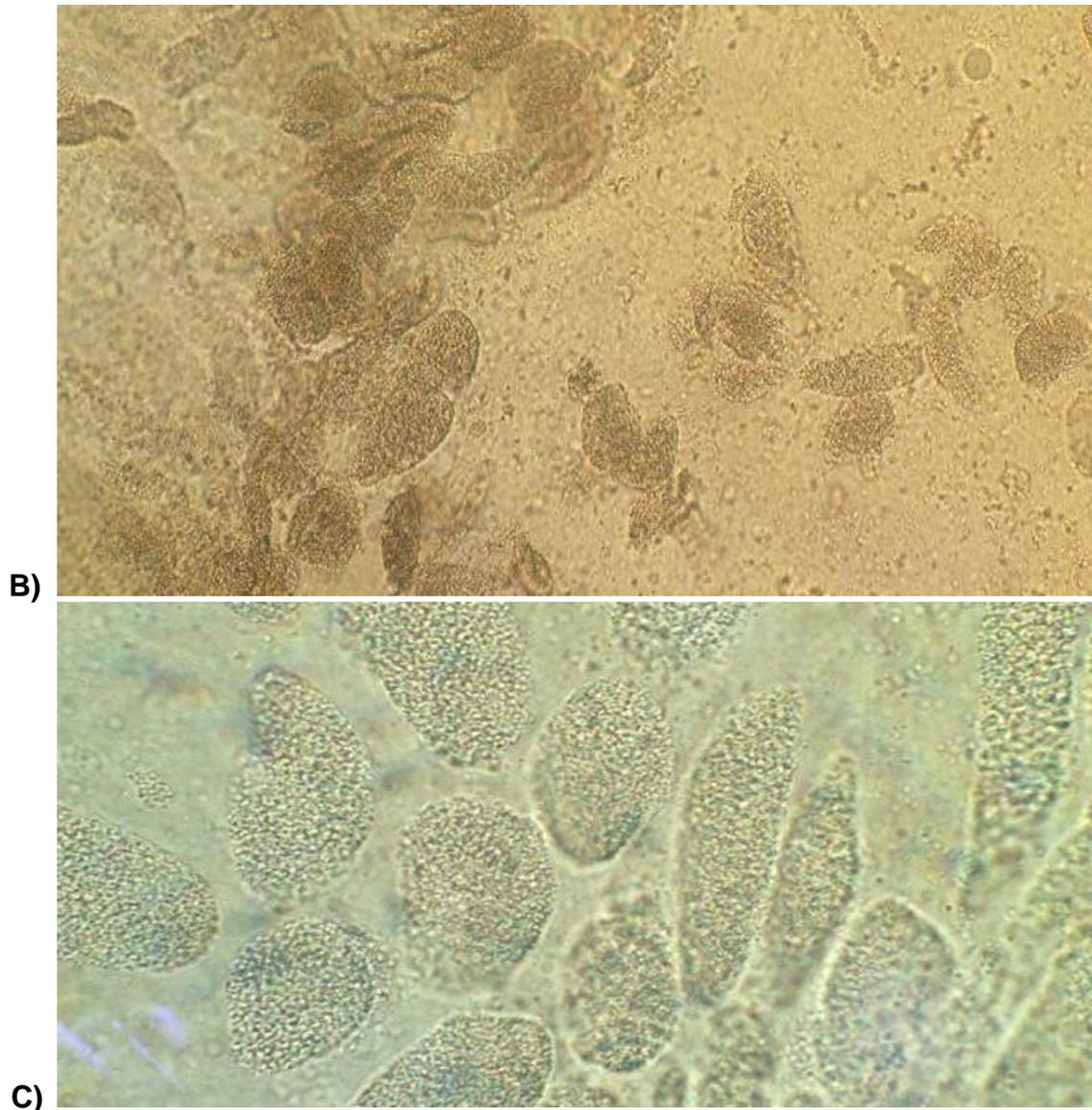


Figura 21. Muestras al fresco de intestino de larvas de *D. magnifactella* contaminadas con *Cypovirus*. A) 20x, B) 40x y C) 100x. en las tres imágenes se observan células hipertrofiadas por CO's de *Cypovirus*.

Sólo se lograron obtener 15 intestinos completos a los cuales se les extrajeron los cuerpos de oclusión, las suspensiones resultantes se mantienen en oscuridad a 4 °C.

Una vez obtenidos los cuerpos de oclusión de la pre-amplificación se cuantificaron y se inocularon 100 larvas con una concentración de 1×10^7 cuerpos de CO's/mL, de igual manera se confirmó la infección de este lote después de 15 días (ver figura 22) en las imágenes se logra apreciar células hipertrofiadas con CO's refringentes característicos por infección por *Cypovirus*. A continuación, se realizó la disección de 50 larvas y las restantes se dejaron pupar para determinar si los dos progenitores son portadores del *Cypovirus*.

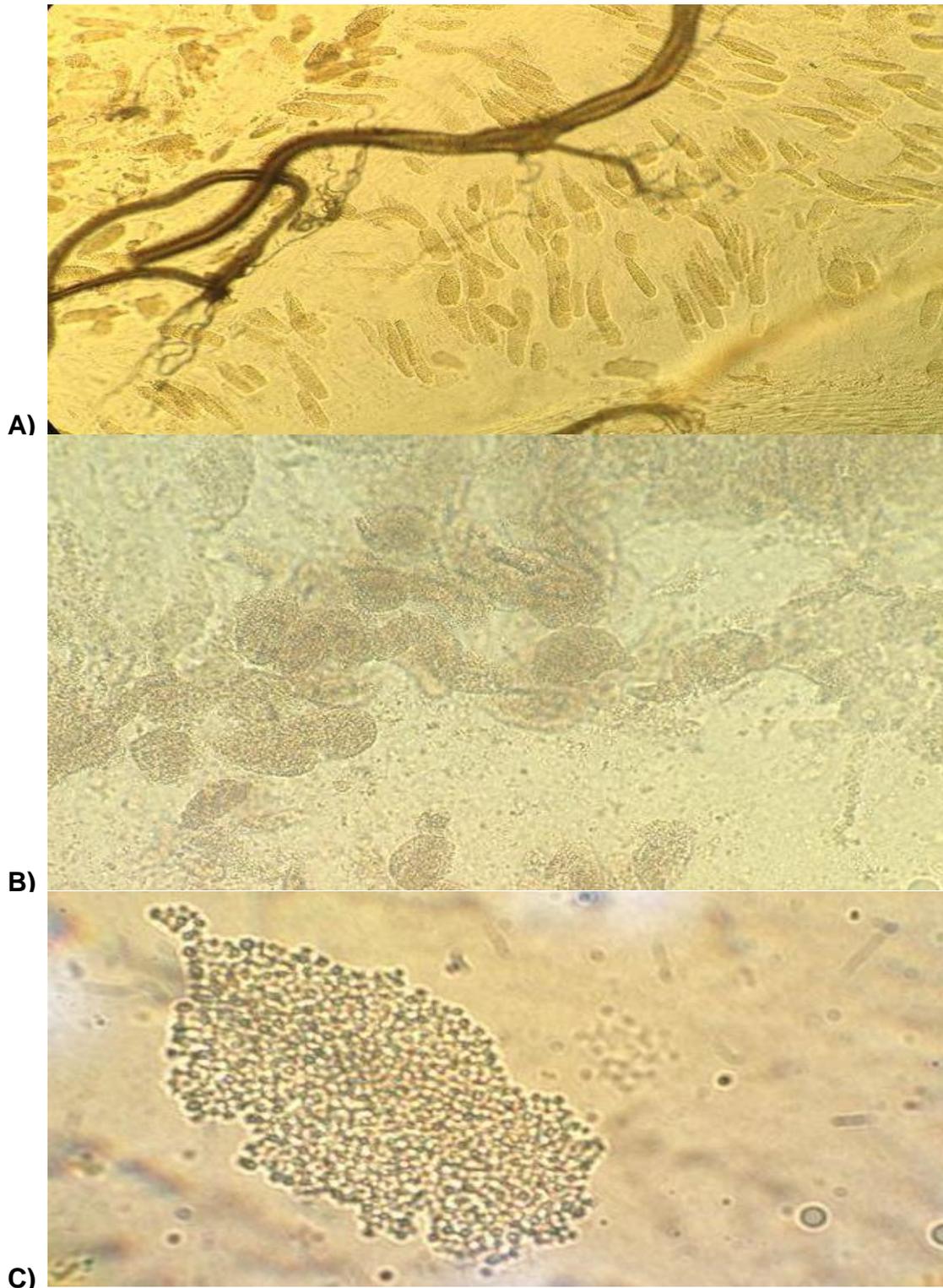


Figura 22. Muestras al fresco de intestinos de larvas de *D. magnifactella* de la amplificación del Cypovirus. A) 20x, B) 40x y C) 100x.

7.6 Determinación del Rango de hospederos del *Cypovirus*

7.6.1 *Spodoptera frugiperda*

En este ensayo se contaminó un lote de 45 larvas de *Spodoptera frugiperda* más el control de 15 larvas con una concentración de 1×10^7 CO's de *Cypovirus* se mantuvieron durante 10 días. Una vez transcurrido el tiempo se les extrajo el intestino y se observó al microscopio con el propósito de identificar células hipertrofiadas. Sin embargo, no se lograron identificar en las muestras al fresco ni en el protocolo de extracción de CO's, ni en las tinciones realizadas, por lo tanto, se decidió montar el mismo procedimiento con disminución de la temperatura a 18 °C y se observaron los mismos resultados.

7.6.2 *Galleria mellonella*

En esta prueba de especificidad del *Cypovirus* aislado de la colonia de *D. magnifactella* se utilizaron 45 larvas de *Galleria mellonella* del 4 estadio aproximadamente más 15 de control, a estos especímenes se les mantuvo durante 10 días, con dieta meridica y a temperatura de 18 °C. Al disecarlos no mostraron patología gruesa ni células hipertrofiadas, de igual manera al teñirlos no se observaron CO's. En consecuencia, se concluye que este hospedero no mostro susceptibilidad al aislado probado.

7.6.3 *Tenebrio molitor*

Se utilizaron 45 especímenes de este lepidóptero en este ensayo de susceptibilidad de les contaminó la dieta (Avena estéril) y se mantuvieron durante 15 días. Posteriormente se extrajeron los intestinos. Al revisarlos no se logró observar patología gruesa al igual que en las muestras al fresco. Al observar lo recuperado en el protocolo de extracción tampoco se logró observar CO's de *Cypovirus*. Por lo que este anfitrión tampoco es apto para la propagación de *Cypovirus*.

7.6.4 *Manduca sexta*

En el ensayo de este lepidóptero se realizó preliminarmente, debido a que las larvas de este insecto fueron obsequio de otro laboratorio. Al tenerlas se decidió probar si eran susceptibles a el *Cypovirus* aislado en la colonia de *D. magnifactella* se contaminaron solo 10 larvas y una de control (agua estéril). Se mantuvieron durante 5 días.

Al revisarlas se observó, la muerte de 3 especímenes al parecer por diarrea aguda, una característica de muerte por poliedrosis, aunque no podemos atribuir la muerte por *Cypovirus*; debido a que el control de igual manera murió, aunque sin presencia de diarrea.

A continuación, se procedió a coleccionar el excremento y tratar de recuperar el intestino del insecto y se montaron muestras al fresco ver figura 23. Enseguida se realizó el protocolo de extracción de CO's y tiñeron las muestras. Ver figura 24 en ellas se parecía CO's de *Cypovirus* por lo que este hospedero es susceptible a la infección por *Cypovirus*

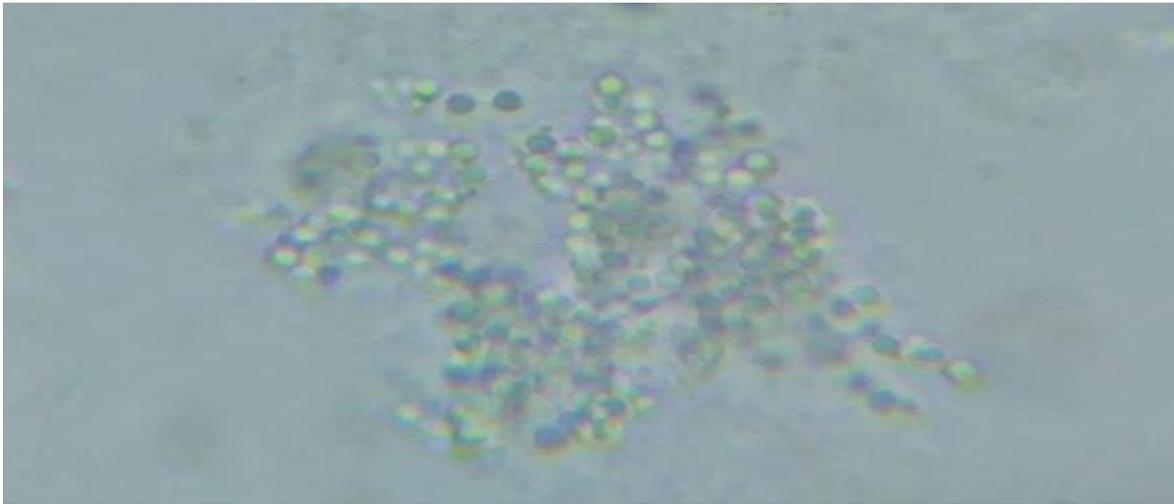


Figura 23. Cuerpos de oclusión obtenidos de la infección *Manduca sexta* con el *Cypovirus* obtenido en el pie de cría de *D. magnifactella*. En la imagen se muestran cuerpos proteicos refringentes con tamaño característico de *Cypovirus*, la foto fue obtenida de la disección intestinal de las larvas de *Manduca sexta*.

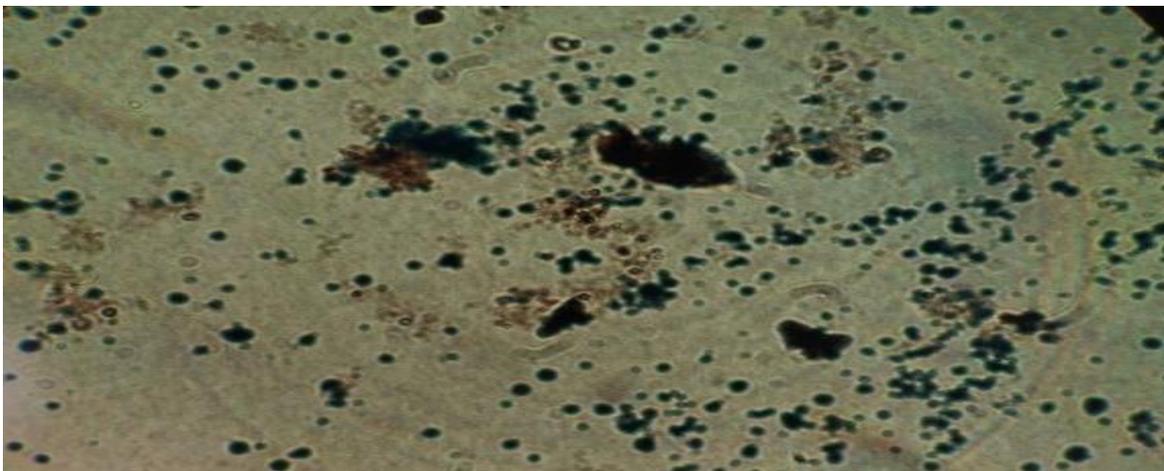


Figura 24. Cuerpos de oclusión que fueron obtenidos en *Manduca sexta* tenidos con el colorante Buffalo Black. En la imagen se muestra la tinción de las muestras ya purificadas de los intestinos de las larvas muertas de *Manduca sexta*. Se logra apreciar un gran número de CO's aunque es evidente el mayor tamaño de las estructuras proteicas.

8. DISCUSIÓN

Las opciones que contemplábamos para el origen de contaminación por *Cypovirus* en la cría de *D. magnifactella* son 2, el campo de Morelos y la dieta merídica; de acuerdo a los resultados obtenidos a partir de las colectas realizadas en donde se logró obtener aislados virales con patología típica de *Cypovirus* en los municipios de Tlaquiltenango y Xochitepec se demuestra que una de las causas posibles de la infección del pie de cría podría ser el campo de Morelos. Por otro lado, se descarta la posibilidad de contaminación en los componentes de la dieta merídica por los resultados obtenidos en el municipio de Coatlán del Rio referente al bloque que se mantuvo con dieta merídica a 18 °C el cual no presentó infección por *Cypovirus* durante el ensayo realizado. Otro aspecto que se logró con esta tesis es el primer reporte de presencia de *Cypovirus* infectando un espécimen *D. magnifactella* colectado en el campo de Morelos. Al ser los primeros reportes que se han obtenido de *Cypovirus* infectando a *D. magnifactella* es de suma importancia caracterizarlos para determinar si se tratan de especies nuevas aun no reportadas.

Lo mencionado anteriormente es reforzado por el estudio de Sikorowski *et al.*, 1992. En donde se probó la capacidad infectiva *Cypovirus* aislado de *Heliothis virescens* (CYPHV) sobre *Diatraea grandiosella*, se determinó la incapacidad del *Cypovirus* evaluado para generar infección en este hospedero. Dado que esta hasta el momento es el único reporte encontrado, esto representa un indicio para poder aventurarnos a decir que se trata de un nuevo virus al no existir reportes de *Cypovirus* infectando al género *Diatraea*.

Con lo relacionado a la formación de parejas de reproducción, es importante resaltar la cantidad de deformaciones encontradas en los adultos monitoreados; en total se encontraron 62 individuos con deformaciones focalizadas en alas lo que equivale al 31% del total de adultos. Debido a esto solo se lograron formar 68 parejas de reproducción de las cuales solo el 1.3 % logró dejar descendencia fértil aunado a esto en ninguna de ellas se logró alcanzar el promedio de 517 larvas eclosionadas por hembra registrado por Cruz en el 2015; esto refleja que la colonia de *D. magnifactella* está a punto de colapsar de acuerdo a sus niveles de producción obtenidos en el ensayo realizado en esta tesis.

En lo relacionado a la tinción de meconias de las parejas de reproducción de *D. magnifactella* que no generaron descendencia complicó y perjudicó la realización de los experimentos moleculares que estaban ligados. Cabe señalar que el fin principal de esta tesis siempre fue obtener la colonia libre de *Cypovirus* esto debía ser logrado por una combinación metodologías que, aunque ligadas perseguían la misma meta. Sin embargo, cada paso nos debía contestar una interrogante.

El fin de realizar las cruces de las parejas de reproducción y sus posteriores tinciones era corroborarlas con las técnicas moleculares y tener una colonia libre de *Cypovirus*, aunque por otro lado se proporcionaría evidencia de la certeza que ofrece la técnica de tinción con Buffalo Black. Sin embargo, la técnica de tinción detecta solo CO's completos por lo que es limitada y no asegura una detección total.

Las opciones que podemos utilizar es la detección de viriones con microscopia en la superficie de los huevos o en micro cortes; además de las técnicas de fijación de tejidos en los intestinos de los adultos buscando visualizar viriones. Sin embargo, la manera de replicación de los *Cypovirus* nos puede ayudar a entender la presencia o ausencia de CO's en la meconia. Tomando en cuenta que el ensamblaje de los viriones es llevado a cabo dentro de estructuras intracelulares llamadas viroplasmos (Xeros *et al.*, 1966), en estas fábricas virales se encuentra el material genético y toda la maquinaria de replicación y transcripción viral una vez ensamblados los viriones son liberados únicamente para el empaquetamiento de CO's en el citoplasma. El armado de los CO's suele ser desordenado, por esa razón se observan diferentes tamaños de CO's al cristalizar de esta manera. Al tener en claro el mecanismo de replicación viral es evidente la posibilidad de falsos negativos en la tinción con Buffalo Black al solo detectar CO's maduros y no viriones o material genético. Para nuestro grupo de investigación es prioridad la validación de la técnica de tinción con Buffalo Black con el fin de establecer un pie de cría libre de virus. Aunque existe la posibilidad que la técnica no sea efectiva para seleccionar parejas de reproducción libres de *Cypovirus*, esto nos diría que estamos tratando con un virus persistente.

Por otra parte, el objetivo principal de este trabajo de tesis fue la obtención de una colonia de *D. magnificella* libre de *Cypovirus*, Al perseguir esta meta se lograrían conocer muchas cosas en relación a la conducta de persistencia del virus dentro del hospedero. Sin embargo, la contundencia de la técnica de tinción con Buffalo black no depende de este proceso, con solo un espécimen de *D. magnificella* que resulte negativo se podrían llevar acabo las técnicas moleculares para detectar material genético viral dentro del hospedero, esto en parte aclararía si la técnica de tinción es una opción viable para seleccionar individuos sanos.

Sin embargo, nuestro planteamiento tenía más vertientes, queríamos saber si los *Cypovirus* eran capaces de burlar las técnicas moleculares y reaparecer en generaciones posteriores, al someter a la progenie a estrés por bajas temperaturas. Desafortunadamente no pudimos continuar con las consecuentes pruebas, pero dejamos plasmadas las demás posibilidades que se pueden utilizar para poder responder el cuestionamiento planteado.

Por otro lado, nuestro grupo de investigación apostaba a la veracidad de la técnica de tinción de Buffalo Black por dos sencillas razones, primero por su bajo costo y segundo su fácil realización. Aunado a esto, la propuesta metodológica plasmada en esta tesis es original, pues nadie la ha sugerido. De probarse se estaría proponiendo una nueva metodología para controlar un *Cypovirus* infectivo en un pie de cría de producción de insectos.

Al igual que nosotros, otros grupos de investigación en el mundo están en búsqueda de alternativas para contener infecciones por *Cypovirus*. Estos estudios se concentran principalmente sobre la infección de *Cypovirus* en el gusano productor de la seda (*Bombyx mori*). Al complicar la producción de seda en Japón y en otras partes del mundo ha tomado fuerza la investigación principalmente desde un enfoque molecular.

Un ejemplo de estos estudios es el realizado por Wu *et al.*, 2013, en esta investigación se logró detectar la presencia de segmentos cortos RNAs producidos por las células infectadas que hibridan con el RNA viral, lo que propicia la disminución de la replicación y traducción Cypoviral. Otro estudio realizado por el mismo autor, pero publicado más tarde (Wu *et al.*, 2016), analiza la respuesta epigenética ante infección de *Cypovirus*, en los resultados obtenidos se observó regulación diferencial por metilación de genes involucrados con las rutas de transporte y degradación de ARN en tejido intestinal, en comparación con tejido graso. Con lo anteriormente mencionado se evidencia que los esfuerzos para eliminar infecciones Cypovirales dentro de insectos de interés industrial es amplia y vigente esperamos que con la información que se genera día con día, cada vez estemos más cerca de eliminar estas infecciones que aniquilan la producción de insectos cuando infectan una colonia.

Cambiando de tema abruptamente, dentro del cultivo de la caña de azúcar la dinámica de propagación de los virus entomopatógenos es complicada, ya que, para la cosecha de esta gramínea se incendian los cultivos, lo que provoca que la temperatura del suelo se eleve hasta 300 °C, a tan altas temperaturas los virus entomopatógenos no suelen resistir y son degradados o inactivados. Esta fue una de las causas por las que en la tesis Burgos-Dueñas, 2015. No se logrará aislar entomopatógenos a partir del suelo. Suponemos que tal vez el efecto de la temperatura influye directamente en la inactivación viral del suelo, ya que nosotros a diferencia del estudio realizado por Burgos-Dueñas, 2015; en nuestros experimentos realizados logramos aislar virus entomopatógenos (*Cypovirus* y *Granulovirus*) pero a diferencia de Burgos-Dueñas, 2015, nosotros los encontramos dentro de especímenes de *D. magnifactella* colectados en campo. Esto nos podría hablar sobre cómo se han adaptados los virus entomopatógenos dentro del cultivo de caña de la azúcar, al no ser viable la opción de propagación horizontal ya que pueden ser afectados fuertemente por las altas temperatura estén prefiriendo por la propagación horizontal principalmente por la persistencia dentro de su hospedero.

Por otro lado, la capacidad del *Cypovirus* para infectar machos o hembras de *D. magnifactella* es similar, no obstante que, para la transmisión horizontal del virus, sea más importante infectar a hembras que generan progenie. Debido a este cuestionamiento Grace en 1962, realizó estudios para saber si el epitelio ovárico de *Antheraea eucalypti* es susceptible a la infección *Cypovirus* (BmCYP).

Al finalizar se evidenció la capacidad infectiva BmCYP sobre células en cultivo de epitelio ovárico. Al ser capaces de inyectar el epitelio ovárico es muy probable que la descendencia este comprometida en dos escenarios. Primero al estar en contacto con un epitelio susceptible se contaminen las superficies de los huevos y segundo la posibilidad que los óvulos de igual manera sean aptos de replicación. Por otro lado, hasta la fecha no se han realizado pruebas sobre células germinales y su susceptibilidad de infección por *Cypovirus*. Sin embargo, la poliedrosis dentro de células germinales resultaría fatal para la población del insecto contaminado. Aunque, infecciones ocultas serían transmitidas fácilmente.

Con lo relacionado al rango de hospederos se realizó primeramente al *Cypovirus* aislado en la colonia, por la inquietud de saber si las demás colonias del laboratorio pudieran ser blanco de este virus y su producción fuese afectada. Con lo observado en los resultados la colonia de *Spodoptera frugiperda*, *Tenebrio molitor* y *Galleria mellonella* no son infectadas por el *Cypovirus* aislado a partir del pie de cría de *D. magnifactella*, con base a esto el *Cypovirus* encontrado en la cría de *D. magnifactella* es poco degenerado, aunque en los resultados en *Manduca sexta* se observó infección, pero estos resultados aún no son concluyentes.

9. CONCLUSIONES

- Los municipios de Tlaquiltenango, Xochitepec y Ayala son positivos en la presencia de *Cypovirus* y no son candidatos para realizar colectas para establecer un pie de cría de *D. magnifactella*.
- El municipio de Coatlán del Río es positivo a la presencia de baculovirus, aunque negativo para la presencia de *Cypovirus*, este municipio es ideal para coleccionar larvas de *D. magnifactella* para establecer un pie de cría en el Laboratorio de Control Biológico al ser el único sin presencia de *Cypovirus*.
- La colonia de *D. magnifactella* se encuentra en estado crítico de producción ya que ninguna pareja de reproducción llegó al promedio de 512 larvas recuperadas.
- No se logró validar molecularmente la técnica de tinción con Bufallo Black, debido a que todas las parejas reproductivas evaluadas fueron positivas a la presencia del *Cypovirus*.
- El *Cypovirus* aislado en la cría de *D. magnifactella* no es específico de *D. magnifactella* al también infectar a *Manduca sexta*.
- Ambos adultos, machos y hembras, de *D. magnifactella* son portadores de la infección por *Cypovirus*

10. PERSPECTIVAS

- Validar molecularmente la técnica de tinción con Buffalo Black con la metodología propuesta en esta tesis.
- Determinar si los aislados virales de *Cypovirus* procedentes de campo del estado de Morelos son la misma especie a la encontrada en el pie de cría de *D. magnifactella*.
- Caracterizar el *Baculovirus* y los *Cypovirus* aislados en el campo de Morelos.
- Realizar mayor número de colectas de larvas de *D. magnifactella* en el estado de Morelos para poder encontrar nuevos aislados virales infectivos a este hospedero.
- Identificar nuevos sitios en el estado de Morelos en donde no exista la presencia de *Cypovirus* para poder recolectar larvas de *D. magnifactella* para establecer un pie de cría libre de *Cypovirus*, además de que estos sitios puedan servir para refrescar el pool genético de la colonia ya establecida.

LITERATURA CITADA

- Álvarez, M. C. y Pérez, J. F. D. (2004).** Resultados del monitoreo para diagnóstico y control de poblaciones de barrenadores del tallo en caña de azúcar de los municipios: el Grullo–Autlán–El Limón en Jalisco. Primer año. Documento 1. INIFAP-CESAVEJAL-Asociación de agricultores del Valle el Grullo-Autlán. Jalisco, México. (2): 2.
- Allen, G.E. (1980).** Impact of diseases on insects and procedures for detecting and eliminating them from cultures prior to release for biological control. Proc. V Int. Symp. Biol. Contr. Weeds, Brisbane, Australia. pp 221-232.
- Burgos-Dueñas, A (2015).** Búsqueda de virus patógenos al barrenador de los tallos *Diatraea magnifactella* (DYAR) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) en suelos provenientes de cultivos de caña de azúcar. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas. Universidad del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México.
- Belloncik, S. (1996a).** Interactions of cytoplasmic polyhedrosis viruses with insects. In *Advances in Insect Physiology*. Vol. 26. Academic Press. pp 233-296.
- Belloncik, S., Lui, J., Su, D. & Arella, M. (1996b).** Identification and characterization of a new cyovirus type 14, isolated from *Heliothis armigera*. *Journal Invertebrate Pathology*. 67.
- Bong, C. F. J., & Sikorowski, P. P. (1991).** Presence of polyhedra in the midgut cell nuclei of *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) infected with cytoplasmic polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57(2), 294-295.
- Caballero, P. y Williams, T. (2008).** Virus Entomopatógenos. En: A. Jacas y A. Urbaneja (Ed), *Control Biológico de Plagas Agrícolas* (pp 121-135) edición, España, España.
- Cory, J., Green, B., Paul, R. y Hunter-Fujita, F. (2005).** Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89, 101-111.
- Campos, H. A., -Romero, P. J., Cervantes, A. R. y Díaz, C. L. (2006).** Manejo integrado para el control de Gusano Barrenador en Caña de Azúcar en el Estado de Morelos. Folleto para el productor N° 44. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Centro Campo Experimental “Zacatepec”. Zacatepec, Morelos, México. Pp 12.

- Carissimo**, G., Eiglmeier, K., Reveillaud, J., Holm, I., Diallo, M., Diallo, D. & Belda, E. (2016). Identification and characterization of two novel RNA viruses from *anopheles gambiae* species complex mosquitoes. *PloS one*, 11(5), e0153881.
- Campos**, H. A., Cruz y C. E. Canul k. J. (2012). Tecnología para el manejo y control de plagas y enfermedades en caña de azúcar en el estado de Morelos. Folleto para el productor 50 N° 62. N° 62 Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación., Morelos, México.
- Coulibaly**, F., Chiu, E., Ikeda, K., Gutmann, S., Haebel, P. W., Schulze-Briese, C., ... & Metcalf, P. (2007). The molecular organization of cypovirus polyhedra. *Nature*, 446(7131), 97-101.
- Cuevas-Molina**, J (2015). Modificaciones del método de cría de *Diatraea magnifactella* DYAR 1911 (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) en condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos., México
- Dolores-Marcelo**, H. y Aldana-Diestra, A. M. (2011). Manejo Integrado del Cultivo Caña de Azúcar. Jornada de capacitación UNALM-AGROBANCO. Paijan-Ascope, Perú.
- Evans**, H. & Shapiro M. (1997). Manual of the techniques in insect pathology. Lawrence Lacey. Viruses. pp 17-53.
- Fuxa**, J. R., Sun, J. Z., Weidner, E. H., & LaMotte, L. R. (1999). Stressors and rearing diseases of *Trichoplusia ni*: evidence of vertical transmission of NPV and CPV. *Journal of invertebrate pathology*, 74(2), 149-155.
- Furuichi**, Y., & Miura, K. I. (1975). A blocked structure at the 5' terminus of mRNA from cytoplasmic polyhedrosis virus. *Nature*, 253(5490), 374.
- Grace**, T. D. C. (1962). The development of a cytoplasmic polyhedrosis in insect cells grown in vitro. *Virology*, 18(1), 33-42.
- Gupta**, G. P., Rani, J., Birah, A. y Raghuraman, M. (2005). Improved artificial diet for mass rearing of the tobacco Caterpillar, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *International Journal of Tropical Insect Science*. 25(1): 55-58.
- Green**, T. B., Shapiro, A., White, S., Rao, S., Mertens, P. P., Carner, G., & Becnel, J. J. (2006). Molecular and biological characterization of a *Cypovirus* from the mosquito *Culex restuans*. *Journal of invertebrate pathology*, 91(1), 27-34.
- Green**, T. B., White, S., Rao, S., Mertens, P. P., Adler, P. H., & Becnel, J. J. (2007). Biological and molecular studies of a *Cypovirus* from the black fly *Simulium ubiquitum* (Diptera: Simuliidae). *Journal of invertebrate pathology*, 95(1), 26-32.

- Gaugler, R. R., & Brooks, W. M. (1975).** Sublethal effects of infection by *Nosema heliothidis* in the corn earworm, *Heliothis zea*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 26(1), 57-63.
- Hongyu, Z., Ziniu, Y., & Wangxi, D. (2000).** Isolation, distribution and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from warehouses in China. *Crop Protection*, 19(7), 449-454.
- Hukuhara, T. (1972).** Demonstration of polyhedra and capsules in soil with scanning electron microscope. *J Invertebrate Pathol.*
- Jiang, L., Peng, Z., Guo, Y., Cheng, T., Guo, H., Sun, Q., ... & Xia, Q. (2016).** Transcriptome analysis of interactions between silkworm and cytoplasmic polyhedrosis virus. *Scientific Reports*, 6, 24894.
- Ikeda, M., Hamajima, R. y Kobayashi, M. (2015).** Review article Baculoviruses: diversity, evolution and manipulation of insect. *Entomological Science of Japan*, 18, 1-20.
- Inglis, G.D., Lawrence A.M. & Sikorowski P.P. (2003).** The use of meconia to nondestructively detect sublethal infections in Heliothines (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal Econ. Entomology* 96 (2): pp. 272-279.
- Jehle, J.A., G.W. Blissard, B.C. Bonning, J.S. Cory, E.A. Herniou, G.F. Rohrmann, D.A. Theilmann, S.M. Thiem y J.M. Vlak. (2006).** On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Archives of Virology*, 151, 1257-1266.
- Rao, S., Carner, G. R., Scott, S. W., Omura, T., & Hagiwara, K. (2003).** Comparison of the amino acid sequences of RNA-dependent RNA polymerases of cypoviruses in the family Reoviridae. *Archives of virology*, 148(2), 209-219.
- Rodríguez del Bosque L. A. y Vejar-Cota, G. (2008).** Barrenadores del tallo (Lepidoptera: Crambidae) del Maíz y Caña de Azúcar, p 9-22 *En Arredondo, B. H. C. y Rodríguez del Bosque L. A. [eds.], Casos de Control Biológico en México. DF. México.*
- Rodríguez-del-Bosque, L. A., Loredó, P. R., Mata, V. H. y Ávila, V. J. (2012).** Manejo integrado de barrenadores en caña de azúcar en el sur de Tamaulipas. Folleto Técnico No. MX-0-310304-04-03-13-09-53. Centro de Investigación Regional del Noreste. Campo Experimental Río Bravo. Río Bravo, Tamaulipas. México. 1-18 Pp.
- Rodríguez del bosque, L. A. (2012).** Bases ecológicas del control biológico. En: Ibarra, R J y Martínez, O. P. XXII Curso nacional de control biológico del 5-7 de noviembre Puebla, México.

- Rosas- Herrera, M** (2015). Hallazgo de un *Cypovirus* en una colonia de *Diatraea magnifactella* Dyar (Lepidóptera: Crambidae) y establecimiento de un método para eliminar la infección. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México.
- Payne, C. C.** (1981). Cytoplasmic polyhedrosis viruses. In "Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases" (Ed. E. W. Davidson), pp. 61-100. Allanheld, Osmun, Totowa, N.J.
- Lipa, J. J.** (1968). *Nosema leptinotarsae* sp. n., a microsporidian parasite of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Journal of Invertebrate Pathology*, 10(1), 111-115.
- Lacey, L. A.** (Ed.). (2012). Manual of techniques in invertebrate pathology. Academic Press.
- Lastra, L. A. B. y Gómez, L. A. L.** (2006). La cría de *Diatraea saccharalis* (F.) para la producción masiva de sus enemigos naturales. Serie técnica 36. CENICAÑA. Cali, Colombia.
- Lobo de Souza, M., Batista de Castro, M. E., William, S., Krol, E. y Szewezyk, B.** (2007). Baculoviruses: A Safe Alternative in Pest Control? *Pest Technology*, 1(1): 53-60. International Journal of Zoology.
- Obregón-Barboza, V** (2006). Obtención de baculovirus recombinantes mediante bombardeo de microproyectiles en larvas de *Trichoplusia ni*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional. Irapuato, Gto., México.
- Magnoler, A.** (1974). Effects of a cytoplasmic polyhedrosis on larval and postlarval stages of the gypsy moth *Porthetria dispai*. *Journal of Invertebrate Pathology* (23). pp. 263-274.
- Mery, C.R. & Dulmage, H.T.** (1975). Trasmisión, diagnosis and control of cytoplasmic polyhedrosis virus in colonies of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal Insect Pathology*. 26. pp. 75-79.
- Mertens, P. P., & Sutton, G.** (2002). Cypovirus. In the Springer Index of Viruses (pp. 944-951). Springer Berlin Heidelberg.
- Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H., Ghabrial, S. A., Jarvis, A., Martelli, G. P., ... & Summers, M. D.** (Eds.). (2012). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses* (Vol. 10). Springer Science & Business Media.
- Miyajima, S. & Kawase, S.** (1968). Changes in virus-infectivity titer in the hemolymph and midgut during the course of a cytoplasmic polyhedrosis in the silkworm. *Journal Invertebrate Pathology*. 12. pp. 329-334.

- Neilson**, M.M. (1964). Effects of a cytoplasmic polyhedrosis on adult Lepidoptera. *Journal of Invertebrate Pathology*. (7). 306-314.
- Nagata**, M., Ohta, M., Kambara, M., & Aoki, F. (2003). Infection of *Bombyx mori* cypovirus 1 in the BmN cell line. *Journal Insect Biotechnology, Sericol.* 72.
- Simmons**, C. L., & Sikorowski, P. P. (1973). A laboratory study of the effects of cytoplasmic polyhedrosis virus on *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 22(3), 369-371.
- Sikorowski**, P.P., Broome J.R. & Andrews G.L. (1971a). Simple methods for detection of cytoplasmic polyhedrosis virus in *Heliothis virescens*. *Journal of Invertebrate Pathology* 17. pp. 451-452.
- Sikorowski**, P.P., Broome J.R. & Andrews G.L. (1971b). Presence of cytoplasmic polyhedrosis virus in the hemolymph of *Heliothis virescens* larvae and adults. *Journal of Invertebrate Pathology* 18. pp. 167-168.
- Sikorowski**, P. P., Andrews, G. L. & Broome, J. R. (1973). Trans-ovum transmission of a cytoplasmic polyhedrosis virus of *Heliothis virescens* (Lepidoptera:Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 21. pp. 41-45.
- Sikorowski**, P. P. & Simmons, C. L. (1972). A laboratory study of the effects of cytoplasmic polyhedrosis virus on *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 66(1). pp. 93-97.
- Sikorowski**, P. P., Luttrell, R. G., & Lawrence, A. M. (1992). Inapparent infection of *Diatraea grandiosella* by *Heliothis virescens* cytoplasmic polyhedrosis virus. *BioControl*, 37(3), 347-351.
- Tan**, L., Zhang, J., Li, Y., Li, Y., Jiang, H., Cao, X., & Hu, Y. (2008). The complete nucleotide sequence of the type 5 *Helicoverpa armigera* cytoplasmic polyhedrosis virus genome. *Virus genes*, 36(3), 587-593
- Xeros**, N. (1966). Light microscopy of the virogenic stromata of cytopolyhedroses. *Journal of invertebrate pathology*, 8(1), 79-87.
- Yang**, C., Ji, G., Liu, H., Zhang, K., Liu, G., Sun, F., ... & Cheng, L. (2012). Cryo-EM structure of a transcribing cypovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6118-6123.
- Vail**, P.V., Hall I.M. & Gough D. (1969). Influence of a cytoplasmic polyhedrosis on various developmental stages of the cabbage looper. *Journal of Invertebrate Pathology*. 14. pp. 263-274.
- Williams**, T., Virto, C., Murillo, R., & Caballero, P. (2017). Covert Infection of Insects by Baculoviruses. *Frontiers in microbiology*, 8, 1337.

- Wu, P., Jie, W., Shang, Q., Annan, E., Jiang, X., Hou, C., ... & Guo, X. (2017).** DNA methylation in silkworm genome may provide insights into epigenetic regulation of response to *Bombyx mori* cypovirus infection. *Scientific reports*, 7(1), 16013.
- Wu, P., Han, S., Chen, T., Qin, G., Li, L., & Guo, X. (2013).** Involvement of microRNAs in infection of silkworm with *bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV). *PloS one*, 8(7), e68209.
- Zeddám, J. L., Arroyo Cruzado, J., Luna Rodríguez, J., Ravallec, M., & Candiotti Subilete, E. (2003).** A *cypovirus* from the South American oil-palm pest *Norape argyrrhorea* and its potential as a microbial control agent. *BioControl*, 48(1), 101-112.
- Zhou, Y., Qin, T., Xiao, Y., Qin, F., Lei, C., & Sun, X. (2014).** Genomic and biological characterization of a new *cypovirus* isolated from *Dendrolimus punctatus*. *PloS one*, 9(11), e113201.
- SE. (2014)** secretaria de Economía. Consultado en enero del 2015 http://www.economia.gob.mx/files/transparencia/informe_APF/memorias/21_memorias_azucar_sic.pdf.
- SIAP. (2014).** Secretaria de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consultado en febrero 2015 (<http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>). [http://www.siap.gob.mx/siaprendes/contenidos/2/03-maiz/contexto-2.html\(2014\)](http://www.siap.gob.mx/siaprendes/contenidos/2/03-maiz/contexto-2.html(2014)).
- Vejar, C. G. (1994).** Importancia de la cría de insectos. (Sec.)1. En: Generalidades de la cría de insectos. Bautista, M. N., Vejar, C. G. y Carrillo, S. J. (eds.) Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados.
- Ficha técnica de barrenador *Diatraea saccharalis***
http://www.sipove.gob.mx/Doc_SIPOVE/SVegetal/Publica/barrenador/Fichas/FT_Barrenador.pdf.