



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DEL BARRENADOR DE LA COL, *Hellula phidilealis* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

OMAR HERNÁNDEZ ROMERO

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

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2022



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DEL BARRENADOR DE LA COL, *Hellula phidilealis* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)**, realizada por el estudiante: **Omar Hernández Romero**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO


DR. NÉSTOR BAUTISTA MARTÍNEZ

ASESOR


DR. ÁNGEL LAGUNES TEJEDA

ASESOR


DR. JESÚS ROMERO NAPOLES

ASESOR


DR. CLEMENTE DE JESÚS GARCÍA AVILA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, noviembre de 2022

BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DEL BARRENADOR DE LA COL, *Hellula phidilealis*
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

Omar Hernández Romero, D.C.
Colegio de Postgraduados, 2022

RESUMEN

Debido a los hábitos crípticos de la plaga, en el manejo de *H. phidilealis*, se deben considerar varias tácticas basadas en los resultados del muestreo, las aplicaciones deben estar dirigidas a las larvas de primer estadio. Los instares larvales de *H. phidilealis*, estudiados en el presente trabajo, se ajustaron a la Regla de Dyar ($R^2=0.9639$), la cual indica que la anchura de la cabeza de una larva, en sus sucesivas etapas, sigue una progresión geométrica regular en su crecimiento lo que contribuye a establecer la cantidad de instares de una especie dada; en ese sentido, *H. phidilealis* presentó una tasa de cambio de 0.50, 0.58, 0.92 y 0.54 para los instares L2, L3, L4 y L5, respectivamente. En el manejo de la cría de *H. phidilealis*, se detectaron larvas infectadas por *Beauveria bassiana*, lo que se determinó mediante caracterización cultural de las colonias en medio de cultivo, caracterización morfológica de las estructuras del hongo y la identificación molecular, utilizando los primers B22U y B822L para la amplificación de la región Block; se realizaron bioensayos y curvas de supervivencia con aislamientos de la cría en mención y se compararon con otras cepas de *B. bassiana*; resultando una diferencia entre los tratamientos con las distintas cepas de *B. bassiana* con una de suspensión de 1×10^8 conidios/mL, comparado con el testigo. En relación a su potencial distribución, en el presente trabajo se modeló el algoritmo de máxima entropía para determinar las áreas potenciales de riesgo de establecimiento de *H. phidilealis*, considerando 19 variables climáticas; los modelos obtenidos infieren que *H. phidilealis* puede tener una distribución potencial alta en el país, y con interacciones geográficas que podrían involucrar áreas productoras de brócoli y coliflor en los estados de Sonora y Sinaloa; así como potencial medio en los estados de Aguascalientes, Guanajuato, Jalisco, Michoacán y Zacatecas. Nuestra aportación puede contribuir a la prevención y manejo de este pirálido en zonas productoras de crucíferas, así como la dirección correcta de muestreos.

Palabras clave: Manejo Integrado de Plagas, Tácticas, Producción, Prevención.

BIOLOGY AND ECOLOGY OF THE CABBAGE BORER, *Hellula phidilealis*
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

Omar Hernández Romero, D.C.
Colegio de Postgraduados, 2022

ABSTRACT

Due to the cryptic feeding habits of the pest, in the management of *H. phidilealis*, several tactics should be considered based on the results of the demonstration, the applications should be directed to the first instar larvae. The larval instars of *H. phidilealis*, studied in the present work, were adjusted to Dyar's Rule ($R^2=0.9639$), which indicates that the width of the head of a larva, in its successive stages, follows a regular geometric progression in its growth, which contributes to establishing the number of instars of a given species; in this sense, *H. phidilealis* presented a rate of change of 0.50, 0.58, 0.92 and 0.54 for instars L2, L3, L4 and L5, respectively. In the management of the breeding of *H. phidilealis*, larvae infected by *Beauveria bassiana* are detected, which is prolonged by cultural characterization of the colonies in culture medium, morphological characterization of the structures of the fungus and molecular identification, using the B22U and B822L primers for Block region amplification; bioassays and survival curves were performed with isolates from the offspring in question and they were compared with other strains of *B. bassiana*; resulting in a difference between the treatments with the different strains of *B. bassiana* with a suspension of 1×10^8 conidia/mL, compared to the control. In relation to its potential distribution, in the present work the maximum entropy algorithm was modeled to determine the potential areas of risk of establishment of *H. phidilealis*, considering 19 climatic variables; those obtained infer that *H. phidilealis* may have a high potential distribution in the country, and with geographic interactions that could involve broccoli and cauliflower producing areas in the states of Sonora and Sinaloa; as well as medium potential in the states of Aguascalientes, Guanajuato, Jalisco, Michoacán and Zacatecas. Our contribution can contribute to the prevention and management of this pyralid in cruciferous producing areas, as well as the correct direction of the screens.

Keywords: Integrated Pest Management, Tactics, Production, Prevention.

AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México que por medio de sus contribuciones al erario, hicieron posible mi sustento en este periodo a través de la beca de CONACYT y el presupuesto otorgado al Colegio de Postgraduados. Sin sus impuestos no hubiese logrado este sueño. Así como al Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, así como al Posgrado en entomología y Acarología.

Al Dr. Néstor Bautista Martínez por su invaluable amistad, por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su tutoría y sobretodo ser mi MAESTRO, en toda la extensión de la palabra; le estaré agradecido de por vida amigo mío.

A mi consejo particular, al Dr. Ángel Lagunes Tejeda, al Dr. Jesús Romero Nápoles y al Dr. Clemente de Jesús García Ávila; por sus tan valiosas y acertadas aportaciones en esta investigación.

A las personas que siempre estuvieron ahí, apoyándome, asesorándome y aconsejándome para concluir este proyecto de vida: Dra. Raquel Alatorre Rosas, M.C. Jorge Valdez Carrasco, Dr. Lauro Soto Rojas, Dr. Ariel Guzmán Franco, Dr. Ricardo Meraz Álvarez, Ing. Sandra Berenice Rositas Tristán y C. Martha Segundo Ireta.

Al cuerpo docente y administrativo del Colegio de Postgraduados que directa o indirectamente hicieron posible mi formación en esta prestigiada casa de estudios; sin duda alguna no hubiese llegado hasta aquí sin sus conocimientos y consejos.

A todas las personas que se me estén olvidando y hayan contribuido directa o indirectamente en la realización de mi meta.

¡Muchas gracias a todas y todos y que Dios los bendiga!

DEDICATORIA

A ti, mi Creador, Dios Padre Eterno, por darme la vida, por la oportunidad de llegar a mi meta y por ponerme en el momento y sitio precisos para conocer a todas las personas que están a mí alrededor.

A ti, Gabriela, ¡Mi linda esposa y mi mayor orgullo!; gracias por estar ahí siempre apoyándome y dando lo mejor de ti para nuestra hermosa familia. ¡TE AMO !

A ustedes, Blanca Jased y Aylín Zoe, ¡Mis más hermosas bendiciones y mis recaditos de Dios! Ustedes y su mama, han sido y serán, mis ÚNICOS motivos para seguir adelante, prueba de ello, este Proyecto. ¡LAS AMO INCONDICIONALMENTE !

A ustedes, Blanca y Cruz Juvenal, mis amados padres; ruego a Dios ser al menos la mitad de lo buenos padres que fueron y son conmigo. Gracias a sus enseñanzas, ejemplo y amor, hoy soy lo que soy. ¡LOS AMO !

A mis queridos sobrinos: Cruz Ángel, María de Jesús, Jade Guadalupe, Ariadna Esmeralda, Lía Isabella y Francisco Guillermo. Hagan lo que hagan en su vida, procuren ser los mejores. Espero este trabajo les sea motivacional y que siempre den un buen ejemplo a sus primitas. Nunca olviden que LOS AMO.

A mi demás familia, mis abuelitas, mis tíos (as), mis primos (as) y especialmente a mis hermanos Reynaldo y Víctor Martín. Gracias a Dios por la familia que me dio.

“Dios está en el principio de la reflexión de un creyente y al final de las investigaciones de un científico”

MAX PLANCK, PREMIO NOBEL DE FÍSICA

“Porque el Señor da la sabiduría; conocimiento y ciencia brotan de sus labios”

PROVERBIOS 2:6

“El aumento de mi Fe en Dios es directamente proporcional al aumento de mis conocimientos”

UN SERVIDOR, OTOÑO 2022

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
LISTAS DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN DE INSTARES LARVALES EN <i>Hellula phidilealis</i> (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE), APLICANDO LA REGLA DE DYAR	6
1.1 RESUMEN	6
1.2 ABSTRACT	7
1.3 INTRODUCCIÓN	8
1.4 MATERIALES Y MÉTODOS	10
1.5 RESULTADOS	12
1.6 DISCUSIÓN	15
1.7 AGRADECIMIENTOS	16
CAPÍTULO II. DETECCIÓN Y CURVAS DE SUPERVIVENCIA DE <i>Beauveria bassiana</i> EN LA CRÍA DE <i>Hellula phidilealis</i> (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)	17
2.1 RESUMEN	17
2.3 INTRODUCCIÓN	19
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.5 RESULTADOS	26
2.6 DISCUSIÓN	31
2.7 AGRADECIMIENTOS	32

CAPÍTULO III. DISTRIBUCIÓN POTENCIAL UTILIZANDO DISPONIBILIDAD

AMBIENTAL DE <i>Hellula phidilealis</i> (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)	33
3.1 RESUMEN	33
3.2 ABSTRACT	34
3.3 INTRODUCCIÓN	35
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.5 RESULTADOS	41
3.6 DISCUSIÓN	44
3.7 AGRADECIMIENTOS	45
CONCLUSIONES GENERALES	46
LITERATURA CITADA	48

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.1. Límites de clase (μm) de la distribución de frecuencias de las medidas de anchura de las cápsulas cefálicas de larvas de <i>Hellula phidilealis</i> , obtenidos mediante el análisis gráfico ($p=0.05$).....	14
Cuadro 1.2. Valores observados (media de cada intervalo) y esperados (calculados con la Regla de Dyar) para la anchura (μm) de las cápsulas cefálicas de <i>Hellula phidilealis</i>	14
Cuadro 2.1. Mediciones de la longitud de la fiálide y de los diámetros ecuatoriales y polares de los aislamientos de hongos entomopatógenos obtenidos de <i>Helulla philidialis</i>	27
Cuadro 3.1. Análisis de la contribución de 19 variables bioclimáticas y 1 topográfica al modelo de aptitud ambiental de <i>Hellula phidilealis</i> (Lepidoptera: Pyralidae).	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Distribución Normal de las mediciones de la cápsula cefálica de los instares larvales de <i>Hellula phidilealis</i>	13
Figura 1.2. Regresión lineal de los valores promedio de la anchura de la cápsula cefálica para los instares larvales de <i>Hellula phidilealis</i>	15
Figura 2.1. Dendrograma obtenido de las secuencias de 10 aislamientos de <i>Hellua phidilealis</i> comparadas con aislamientos de <i>Beauveria bassiana</i> obtenidas de larvas de <i>Galleria mellonella</i> (V, W) y de otros aislamientos del género <i>Beauveria</i>	28
Figura 2.2. Curvas de supervivencia de <i>Hellua phidilealis</i> expuestos a diferentes aislamientos de <i>Beauveria bassiana</i> sometidos a análisis de supervivencia utilizando la prueba de rango logarítmico de los estimadores de Kaplan-Meier. A) (log-rank $\chi^2= 422$; $df = 5$; $P < 0.001$); y B) (log-rank $\chi^2= 25.6$; $df = 4$; $P < 0.001$).	30
Figura 3.1. Distribución de los datos colectados en bases de datos con presencia de <i>Hellula phidilealis</i> (Lepidoptera: Pyralidae).	38
Figura 3.2. Distribución de municipios productores de crucíferas en México, según el SIAP, 2022.....	40
Figura 3.3. Cartografía de Idoneidad Ambiental para <i>Hellula phidilealis</i> (Lepidoptera: Pyralidae) en distintas provincias biogeográficas de México. A) Provincia de Sonora, B) Provincia del Desierto de Chihuahuense, C) Provincia de Tamaulipas, D) Provincia Veracruzana, E) Provincia de Tierras Bajas del Pacífico.	42

Figura 3.4. Cartografía de Idoneidad Ambiental Media para *Hellula phdilealis* (Lepidoptera: Pyralidae) en las provincias biogeográficas de Tierras Bajas el Pacífico, Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental, Sonora, Tamaulipas, Veracruzana y Tierras Altas de Chiapas. 43

INTRODUCCIÓN GENERAL

En México, el cultivo de especies de la familia Brassicaceae cultivadas, es una actividad económica importante, de acuerdo a las estadísticas que reporta el SIAP (2022), para el año 2020, la producción nacional de brócoli y coliflor, fue de 584 mil y 103 mil toneladas, respectivamente, la superficie sembrada fue de 34 mil y 4 mil hectáreas respectivamente, generando un valor de la producción respectiva de 3, 860 y 499 millones de pesos; en cuanto al valor de las exportaciones en este mismo periodo, fueron de 554 y 78.2 millones de dólares respectivamente. El barrenador del tallo de la col, *Hellula phidilealis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Pyralidae), es una especie económicamente importante en cultivos de esta familia; al igual que otras especies de este género, *Hellula*, su importancia a llevado a agricultores a aplicar distintas tácticas para su manejo; por ejemplo, en La India, para sostener la producción de coliflor, los agricultores recurren a 10-12 aplicaciones de plaguicidas durante un período de cuatro meses para prevenir los daños de plagas y enfermedades, destacando a *H. undalis*, esto en la época de lluvias de junio a noviembre (Ahuja et al. 2012); por otra parte, según lo reportaron Boopathi y Pathak (2012), *H. undalis* causa del 5 al 10% de daño en etapa vegetativa y de formación de la cabeza en brócoli en La India. Es estacionalmente la plaga más nociva de la col y la coliflor en Trinidad y Tobago (Alam, 1989). En Barbados, las poblaciones de *H. phidileaiis* aumentaron de manera constante entre 1976 y 1980, posiblemente debido a una mayor dependencia de la permetrina y otros insecticidas no sistémicos para el control de *Plutella xylostella* (L). Estos productos químicos no controlan las larvas de *Hellula* sp., que ya se introducen en los tejidos de las plantas y esto también reducen la eficacia de los enemigos naturales. A principios de la década de 1980, *H. phidilealis* se convirtió repentinamente en una plaga en Barbados, aunque su población en *Brassica oleracea* var. capitata

era de naturaleza cíclica. Fue más prevalente entre mayo y julio, cuando del 44% al 73% de las plantas fueron atacadas, y el número de larvas por planta varió de 1 a 13 (Alam, 1989).

El principal daño *H. phidilealis* lo ocasiona la larva al alimentarse de los puntos de crecimiento de la planta, y es severo cuando se presenta durante la etapa del trasplante y hasta los 60 días después; larvas de primer ínstar tienen un comportamiento de minador, al emerger del huevo, penetran entre los tejidos (parénquima) de la hoja para cubrirse durante el primer y/o segundo ínstar, después se dirigen a los brotes de las plantas jóvenes (de 15 a 30 días después del trasplante). Cuando llegan al brote, lo barrenan por completo en su interior, para después ingresar al tallo con dirección a la raíz, pero sin llegar a ella. En el caso de los tres últimos instares larvales, muestran preferencia por los tallos y las hojas en la axila y peciolo (Razuri e Hinostroza, 1974; Sivapragasam y Aziz, 1990). En plantas jóvenes, *H. rogatalis* perfora el tallo principal y puede causar marchitamiento y muerte de la planta. Cuando el daño comienza por la hoja, la larva enrolla la orilla para formar un túnel cubierto con excremento y seda (Razuri e Hinostroza, 1974; Shrestha y Webb, 2016), en otras ocasiones penetra en la nervadura central para pupar. Al alimentarse del brote principal, causan la producción de brotes secundarios lo que evita la formación de cabezas. Las larvas que se alimentan de cabezas de brócoli en formación, producen una extensa red que deforma la cabeza y provoca que el cultivo no sea comercializable (Shrestha y Webb, 2016; Reiter et al. 2008).

La estrategia de manejo integrado de plagas (MIP), requiere del conocimiento de la biología y la ecología de la plaga; por lo anterior, es de importancia conocer los instares de esta especie para diseñar tácticas específicas de manejo, ya que, dependiendo del ínstar en el que se encuentre, va a depender el tipo de daño que ocasionará y el sitio de alimentación dentro de la planta. En ese sentido, es importante determinar los instares de la plaga, una vez que se detectan

adultos en el cultivo; por lo que la Ley de Dyar, es una técnica con la que se puede calcular el instar de las larvas, el cual indica que la anchura de la cabeza de una larva, en sus sucesivas etapas, sigue una progresión geométrica regular en su crecimiento (Dyar, 1890), de esta manera se puede estimar el número de instares de lepidópteros, como el caso de *H. phidilealis*, y compararlo con el número de instares reales (Chapman, 1998) con ello, será una herramienta básica para conocer el instar en un momento dado con la medición de la anchura de la capsula cefálica.

En el mismo tenor de un MIP aplicado a este insecto, Herting (1965) y Thompson (1946) encontraron a *Bracon hellulae*, *B. hebetor*, *Chelonus* sp. (Braconidae) y *Nemorilla* sp. (Tachinidae) como parasitoides de *H. phidilealis*, entre otros. Por su parte Mewis et al. (2003) detectaron que en promedio el 16% de las larvas obtenidas de campos de crucíferas presentaron infecciones por microsporidios (*Vairimorpha* sp.) y que el 75% de *H. undalis* infectadas morían durante el desarrollo larval. Sivapragasam y Chua (1997) detectaron a los parasitoides *Bassus* sp., *Chelonus* sp. y *Phanerotoma* sp. (Braconidae) y *Trathala flavoorbitalis* (Cam.) (Ichneumonidae); no observaron parasitoides de huevos o pupas; el principal depredador fue la hormiga de fuego, *Solenopsis geminata* (F.), que se alimentaba de prepupas y pupas. Por otro lado, se han evaluado bioinsecticidas a base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) y azadiractinas del neem, las cuales han logrado controles efectivos (Reiter et al. 2008).

La búsqueda de nuevas alternativas en el manejo de esta especie, se ha vuelto imperativo debido a la sustentabilidad y sostenibilidad que se debe tener actualmente con el control de las plagas agrícolas. El uso de hongos entomopatógenos se ha visto que es una buena opción frente al uso de insecticidas de síntesis química. Si estos hongos se aíslan directamente de la plaga objetivo, el efecto del manejo será mayor si estos se manejan con las debidas medidas correspondientes de aplicación.

De igual manera, el hecho de conocer la posible distribución de esta u otra plaga con base en sus requerimientos climáticos, puede servir como una herramienta preventiva para su manejo en grandes áreas de cultivos hospedantes. Por ello, los métodos y herramientas de modelado que integran datos de distribución y variables climáticas se usan ampliamente para predecir, a escala global, nacional o local, la distribución real y potencial de plagas de insectos (Guisan y Thuiller, 2005). El resultado final es la integración de mapas en los que se predice la presencia o ausencia de una determinada especie (Gevrey y Worner, 2006). Estas predicciones pueden servir como base para planificar futuras estrategias de seguimiento, gestión y control. Los mapas de idoneidad ambiental podrían ser una herramienta importante para apoyar las decisiones técnicas y políticas relacionadas con el manejo de este insecto.

Retomando la importancia que conlleva conocer los aspectos básicos sobre ecología y biología de cualquier plaga; se ha estudiado que la biología de especies del género *Hellula* depende tanto de factores abióticos como bióticos, por ejemplo: temperatura, humedad relativa y el hospedante (Ravan y Sahebzadeh, 2015); de ahí la trascendencia de estudiar este último factor como pieza clave para entender la interacción de insectos plaga con sus hospedantes. Estudios de los componentes químicos de plantas de la familia Capparaceae, indicaron que contiene sustancias vegetales secundarias específicas, como aceites de mostaza o glucosinolatos; dichos compuestos atraen adultos del género *Hellula* (Redovnikovi et al. 2008). Mewis et al. (2002) demostraron que las hembras de *H. undalis*, para la oviposición, diferenciaron entre las plantas hospedantes con respecto al contenido de glucosinolatos de diferentes plantas de las familias Brassicaceae y Capparidaceae. Mewis et al. (2001) estudiaron diferentes hospedantes en laboratorio y campo para determinar la preferencia de oviposición de *H. undalis*; las hembras preferían ovipositar en *Sinapis alba* (L.) Selinda, seguida de *Brassica juncea* (L.) Czern et Coss, y variedades de *Brassica*

campestris L. subsp. *chinensis*. Los experimentos realizados en laboratorio y jaulas por Ebenebe et al. (2011) sugirieron que *Cleome viscosa* fue la planta hospedante más atractiva para la alimentación de larvas de *H. undalis* en comparación con *Brassica* spp. Sin embargo, la indicación general de este estudio es que el papel principal de *C. viscosa*, en condiciones de campo, es como fuente de atracción de *H. undalis* en hospedantes cultivados; por lo que estos autores recomiendan el manejo de *C. viscosa* en parcelas de crucíferas.

En el presente trabajo, se presentan los resultados obtenidos sobre la biología básica de *H. phidilealis*, que aportan a determinar las acciones de manejo de esta especie, que podrían ser integradas a un esquema de MIP. Para lo cual es importante reconocer los instares de una plaga, identificar sus enemigos naturales, así como la estimación de áreas potenciales de establecimiento, entre otros; deben ser elementos prioritarios para una plaga de reciente impacto. Asimismo, se sugiere seguir estudiando más aspectos de la ecología de este pirálido como enemigos naturales nativos, tablas de vida y fecundidad y grados días de desarrollo, así como validar la información aquí generada.

CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN DE INSTARES LARVALES EN *Hellula phidilealis* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE), APLICANDO LA REGLA DE DYAR

1.1 RESUMEN

Hellula phidilealis (Lepidoptera: Pyralidae) es una especie asociada con el cultivo de crucíferas, el daño que produce depende de la etapa fenológica de las plantas, la densidad poblacional y del instar en el que se encuentre. Por lo anterior, es importante identificar los instares presentes de esta especie en cada unidad de producción, ello coadyuvará a definir las tácticas de manejo enfocadas para su control en hospedantes de importancia económica. La Ley de Dyar establece que la anchura de las cápsulas cefálica de las larvas, se incrementa de acuerdo con una progresión geométrica regular por lo que se puede determinar los instares de ciertas especies, sobretodo lepidópteras. El objetivo de este trabajo fue determinar las tasas de incremento en el tamaño de las cápsulas cefálicas, y con ello conocer el número de instares larvales de *H. phidilealis*. Al ser una especie que recientemente ha adquirido importancia en México, es necesario desarrollar investigación básica que permita conocer la biología de la plaga para implementar las tácticas de manejo pertinentes para cada instar. Para la obtención de imágenes, se utilizó un microscopio Carl Zeiss® (SteREO Discovery V.20) acondicionado con una cámara Canon® (EOS 50D); se capturaron imágenes JPEG de cada espécimen para su posterior medición con el programa Image J (v. 1.53e); para calibrar las mediciones, se tomaron imágenes del micrómetro. La medición se realizó considerando los bordes externos de las genas de cada cápsula cefálica. Los instares larvales de *H. phidilealis*, se ajustaron a la Regla de Dyar ($R^2=0.9639$) con una tasa de cambio de 0.50, 0.58, 0.92 y 0.54 para los instares L2, L3, L4 y L5, respectivamente, el promedio de las tasas fue de 0.63.

Palabras Clave: Tasa de cambio, capsula cefálica, manejo en crucíferas.

1.2 ABSTRACT

Hellula phidilealis (Lepidoptera: Pyralidae) is a species associated with crucifer crops. The damage it produces depends on the phenological stage of the plant host, population density, and the instar in which it is found. For this reason, it is important to identify the instars of this species present in each production unit. This would contribute to defining management tactics directed to their control in economically important hosts. The Dyar Rule establishes that the width of larval cephalic capsules increases at a regular geometric progression. This relation is used in studies to estimate the number of instars in lepidopteran species of economic importance. The objective of this study was to determine the rate of increase in the size of the cephalic capsules to determine the number of *H. phidilealis* larval instars. Because it is a species that only recently has acquired importance in Mexico, it is necessary to carry out basic research on the pest's biology to implement pertinent management tactics for each instar. To obtain the images, we used a Carl Zeiss® (SteREO Discovery V.20) microscope conditioned with a Canon® (EOS 50D) camera. JPEG images of each specimen were captured for later measurement with the program Image J (v. 1.53e). To calibrate the measurements, images were taken of the micrometer. Measurement was carried out considering the external edges of the gena of each cephalic capsule. The *H. phidilealis* larval instars were fit to the Dyar Rule ($R^2=0.9639$) with a change rate of 0.50, 0.58, 0.92 and 0.54 for instars L2, L3, L4 and L5, respectively; the average rate was 0.63.

Key words: Change rate, cephalic capsule, management in crucifers.

1.3 INTRODUCCIÓN

Hellula phidilealis (Lepidoptera: Pyralidae) es una especie que ha adquirido importancia por los daños ocasionados en cultivos de crucíferas; en la India, por ejemplo, en la producción de coliflor, los agricultores hacen de 10 a 12 aplicaciones de plaguicidas para reducir los daños de plagas y enfermedades, la mayor parte están dirigidas al combate de *H. undalis*, sobre todo en la época de mayor precipitación (Ahuja et al. 2012); por otra parte, Boopathi y Pathak (2012) reportaron que *H. undalis* causa del 5 al 10% de daño en etapa vegetativa y en la formación del florete en brócoli. En Trinidad y Tobago, se han registrado altos niveles poblacionales en algunas estaciones del año, su nivel de infestación ha permitido que se consolide como la plaga más dañina en agroecosistemas para producción de col y coliflor (Alam, 1989).

El principal daño lo ocasiona la larva al alimentarse de los puntos de crecimiento de la planta. Las mayores pérdidas se registran cuando el insecto se alimenta de plantas recién trasplantadas en campo, aunque el periodo crítico se extiende hasta los 60 días después del trasplante. Las larvas de primer ínstar tienen un hábito minador; recién emergidas del huevo penetran entre el parénquima de la hoja para protegerse durante el primer y segundo ínstar, después se dirigen al brote de las plantas jóvenes. Cuando llegan al brote, lo barrenan por completo en su interior, posteriormente ingresan al tallo con dirección a la raíz, pero sin llegar a ella. En el caso de los tres últimos instares, muestran preferencia por los tallos y las hojas en la axila y peciolo (Razuri e Hinostroza, 1974; Sivapragasam y Aziz 1990). En plantas jóvenes perforan el tallo principal y pueden causar el marchitamiento y la muerte de la planta. Cuando el daño comienza por la hoja, la larva enrolla la orilla para formar un túnel cubierto con excremento y seda (Razuri e Hinostroza, 1974; Shrestha y Webb, 2016), en otras ocasiones penetran en la nervadura central para pupar. Si se alimentan del brote principal, causan la producción de brotes secundarios lo que

evita la formación de cabezas. Las larvas que se alimentan del florete en formación, genera una extensa red con la producción de seda que deforma la cabeza y provoca que el producto no sea comercializable (Shrestha y Webb, 2016; Reiter et al. 2008).

En México, *Hellula phidilealis* está adquiriendo la importancia de plaga primaria, dado que ha ocasionado pérdidas considerables en el estado de Puebla y en el Bajío. En países como Barbados, en la década de 1970, *H. phidilealis* se convirtió en una plaga primaria; esto posiblemente se originó por un uso reiterativo de piretroides y otros insecticidas no selectivos para el combate de *Plutella xylostella* (L). Este tipo de plaguicidas de contacto no alcanza a las larvas de *Hellula* sp. sobre todo cuando ya se han introducido en los tejidos de la planta; sin embargo, si se afecta a los enemigos naturales (Alam, 1989).

El manejo de *H. phidilealis*, es complicado por su biología y hábitos de alimentación, derivado de que la mayor parte de su ciclo biológico está dentro de los tejidos de la planta; para realizar un manejo integrado de plagas (MIP) para esta especie, se requiere del conocimiento de la biología y la ecología de la plaga; por lo anterior, es necesario determinar los instares de esta especie, con la finalidad de diseñar tácticas específicas de manejo para este pirálido.

La Ley de Dyar, establece que la anchura de la cabeza de una larva, en sus sucesivas etapas, sigue una progresión geométrica regular en su crecimiento (Dyar, 1890), de esta manera se puede estimar el número de instares de lepidópteros, como el caso de *H. phidilealis* y compararlo con el número de instares reales (Chapman, 1998). Hernández-Livera et al. (2005) obtuvieron mediante esta regla, siete subpoblaciones, que representaron a cada uno de los instares larvales de *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: Cossidae); su coeficiente de incremento tuvo un valor promedio de 0.712 mm, con un crecimiento regular en los subsiguientes instares. *Dendrolimus*

pini L. (Lepidoptera: Lasiocampidae) se ajustó a esa regla, obteniendo un total de ocho instares (Sukovata, 2019). Además, del orden Lepidoptera, también se ha sido útil para determinar instares en Heteroptera, como en *Sigara mathesoni*, donde se modeló con precisión el crecimiento de la especie, y en las dos últimas etapas de crecimiento, el ancho de la cabeza y la longitud del cuerpo fueron sexualmente dimórficos, ya que el ancho de la cabeza de la hembra era mayor que el ancho de la cabeza del macho (Shull et al. 2010).

El objetivo del presente estudio fue conocer el número de instares larvales de *H. phidilealis* mediante la medición de la anchura de las cápsulas cefálicas. La estrategia MIP se basa en el conocimiento de la biología, la ecología y la dinámica poblacional de la plaga; por lo anterior, es conveniente determinar que instares de esta especie están presentes en el cultivo, para diseñar tácticas apropiadas para su combate, ya que el daño ocasionado va a estar relacionado con el instar.

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1 Material Entomológico

Se colectaron larvas de *H. phidilealis* en Atlixco, Puebla (coordenadas: 18.866647°, - 98.427983° y 1760 msnm), las cuales estaban colonizando cultivos comerciales de coliflor (*Brassica oleracea* var. botrytis). El material biológico se transportó a la cámara de cría de Entomología Agrícola del Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados; los especímenes se mantuvieron a 24 °C ± 2 °C, con un periodo de 12:12 h L:D y una humedad relativa de 55 ± 5%. De esta colecta, se generó un pie de cría con las mismas condiciones hasta llegar a la tercera generación, aproximadamente después de 3.5 meses; de cual se extrajeron, para el presente experimento, un total de 215 larvas de distintos instares, determinados de forma visual, por la

presencia de la exuvia cefálica en los contendedores individuales. Durante el estudio, las larvas se alimentaron con hojas de col (*Brassica oleracea* var. capitata).

1.4.2 Medición de las Capsulas Cefálicas

Una vez que se determinaron visualmente los distintos instares, las larvas se mantuvieron en alcohol al 70% (previo hervor) y se colocaron en una caja Petri en vista frontal, fijadas con gel al fondo del contenedor. Se utilizó un microscopio marca Carl Zeiss modelo SteREO Discovery V.20[®] con una cámara montada de la marca Canon modelo EOS 50D[®].

Se tomaron imágenes de cada uno de los especímenes y se guardaron en formato JPEG para su posterior medición utilizando el Programa Image J (v. 1.53e) (Rueden et al. 2017). Para calibrar las mediciones, se tomaron imágenes del micrómetro. La medición se realizó considerando los bordes externos de las genas de cada cápsula cefálica.

1.4.3 Análisis Estadístico

Las mediciones de las capsulas cefálicas obtenidas con el Programa ImageJ se clasificaron en tablas de frecuencias simples. Para visualizar una aproximación de los grupos de datos de cada ínstar se realizó una gráfica de distribución de frecuencias con las mediciones referidas.

A los datos se les aplicó una prueba de normalidad por ínstar; adicionalmente, se realizó un análisis discriminante para separar los grupos definidos y reducir la probabilidad de clasificaciones erróneas. Se asignó a cada espécimen analizado el valor del promedio ponderado de los valores en el conjunto de variables independientes. Después de determinar este valor, se transformó a una probabilidad a posteriori, que define la probabilidad de que un espécimen pertenezca a cada uno de los grupos.

Las probabilidades de traslapo fueron calculadas para definir los límites mínimo y máximo de cada grupo. Las variables que se requieren para una separación óptima de los grupos se calculan con el supuesto de que la distribución de la cápsula cefálica para cada ínstar es normal, y que la distribución observada es la suma de las distribuciones normales individuales (Got, 1988; Logan, 1998). Finalmente se aplicó la regla de Dyar para obtener la tasa promedio de incremento y los valores esperados de los tamaños de cápsula cefálica. El análisis estadístico se realizó mediante el lenguaje de programación R versión 4.0.5.

1.5 RESULTADOS

En la Figura 1.1, se presenta la distribución normal de las mediciones de la capsula cefálica, en la que se pueden observar cinco picos, lo que infiere un total de cinco instares y que cada uno tuvo una distribución normal. La separación de conjuntos permitió obtener los límites de clase y la agrupación de los valores en frecuencias permitió definir los límites de clase ($p=0.05$).

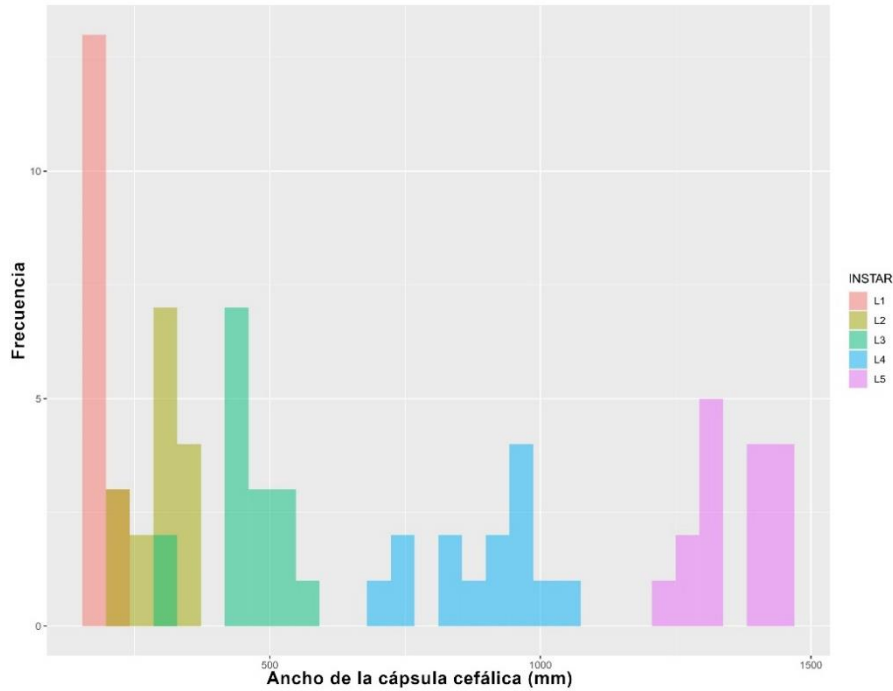


Figura 1.1. Distribución Normal de las mediciones de la cápsula cefálica de los instares larvales de *Hellula phidilealis*.

En el Cuadro 1.1 se presentan los datos utilizados para obtener los límites del análisis discriminante, de un total de 80 individuos, 16 de cada instar. Mediante una prueba de traslapo (Logan, 1998) se obtuvieron los límites de clase (Cuadro 1.2) y para verificar la regla de Dyar se calculó la tasa promedio de incremento del tamaño de cápsula cefálica y, con ella, los valores esperados para cada instar (Figura 1.2). La tasa de cambio fue de 0.50, 0.58, 0.92 y 0.54 para los instares L2, L3, L4 y L5, respectivamente, con un promedio de 0.63.

Cuadro 1.1. Límites de clase (μm) de la distribución de frecuencias de las medidas de anchura de las cápsulas cefálicas de larvas de *Hellula phidilealis*, obtenidos mediante el análisis gráfico ($p=0.05$).

ÍNSTAR	# EJEMPLARES	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
1	16	180	191
2	16	203	290
3	16	292	442
4	16	688	938
5	16	1125	1354

Cuadro 1.2. Valores observados (media de cada intervalo) y esperados (calculados con la Regla de Dyar) para la anchura (μm) de las cápsulas cefálicas de *Hellula phidilealis*.

ÍNSTAR	# EJEMP.	L.I.	L.S.	VALOR OBS	DESVEST	VALOR ESP
1	22	150	241	192	6.04	178
2	37	242	369	288	42.16	295
3	49	370	693	455	71.39	489
4	34	694	1146	874	100	810
5	40	1147	1478	1343	67.51	1344

Hubo una mínima diferencia entre el valor observado y esperado en cada ínstar con su desviación estándar respectiva, esto se corroboró graficando, con escala logarítmica, los valores promedio de anchura de la cápsula cefálica de cada ínstar, ya que se obtuvo una regresión lineal con ajuste adecuado (Figura 1.2).

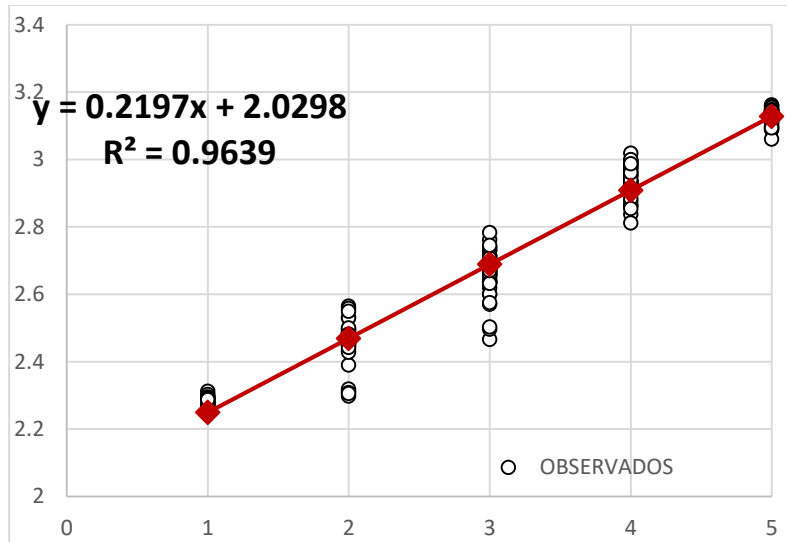


Figura 1.2. Regresión lineal de los valores promedio de la anchura de la cápsula cefálica para los instares larvales de *Hellula phidilealis*.

1.6 DISCUSIÓN

Hernández-Livera et al. (2005) obtuvieron los límites de clase para los instares de *Comadia redtenbacheri* (Hamm) (Lepidoptera: Cossidae) con distintos números de individuos en cada clase, de 4 a 20, a diferencia del presente trabajo que se utilizaron 16 por igual, lo que implicó que tuviera mayor homogeneidad de los datos.

La progresión geométrica obtenida en el presente estudio fue relativamente baja si la comparamos con la obtenida por Pradeepa et al. (2017), quienes determinaron que la progresión geométrica en *Melanitis leda* (Linnaeus, 1758) fue 1.21; y más aún si se compara con una especie de la misma familia que *H. phidilealis* como *Cadra cautella* (Lepidoptera: Pyralidae) la cual registró una tasa de crecimiento media máxima de 1.41 (Husain et al. 2017) y con *Galleria mellonella* (L.) donde el tamaño de la cápsula de la cabeza aumentó en cada muda en un promedio de 1.49 (rango = 1.36-1.66) (Opoosun y Odebiyi 2009). Hay evidencia de factores que pueden afectar el tamaño de la cápsula cefálica como lo obtenido por Irigaray et al. (2006) que encontraron

que la temperatura afectó significativamente el tamaño de la cápsula cefálica de *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae); Frouzd et al. (2002) detectaron que las hembras de *Chironomus crassicaudatus* (Diptera: Chironomidae) tenían cápsulas cefálicas más anchas que los machos al experimentar con diversas temperaturas de desarrollo.

El hospedante puede tener efecto en el tamaño de la cápsula cefálica, por ejemplo, las cápsulas del primer ínstar de *Galerucella nymphaeae* L. (Coleoptera: Chrysomelidae) en hospedantes de la familia Nymphaeaceae eran entre un 17% y un 28% más grandes que las de las larvas con hospedantes de la familia Polygonaceae (Pappers et al. 2001).

El presente estudio contribuye al conocimiento de cómo determinar los instares de esta especie barrenadora de crucíferas, información importante para determinar las tácticas de control y / o manejo, ya que dependiendo del ínstar larval presente, la forma de alimentación será distinta, lo que dificulta su control, cuando éste se encuentra barrenando.

1.7 AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo agradecen al M.C. Jorge Manuel Valdez Carrasco, Investigador Titular del Programa de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, por su apoyo en la asesoría de la toma de imágenes con el microscopio y la cámara antes referidos.

CAPÍTULO II. DETECCIÓN Y CURVAS DE SUPERVIVENCIA DE *Beauveria bassiana* EN LA CRÍA DE *Hellula phidilealis* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

2.1 RESUMEN

Debido a los hábitos alimenticios crípticos de la especie, el manejo de *Hellula phidilealis* debe basarse en un manejo preventivo enfocado en el muestreo de la población. Además, se deben considerar varias tácticas de manejo y de ser posible, dar preferencias a aquellas con beneficios a largo plazo y con una visión de manejo integrado de plagas. El uso de hongos entomopatógenos es una herramienta alternativa al uso de plaguicidas con resultados alentadores. En el manejo de una cría de *H. phidilealis*, se detectaron larvas micosadas aparentemente causada por *Beauveria bassiana*, con mortalidad de más de 90% de la cría y probablemente con efectos subletales de esterilidad en los especímenes supervivientes. Una vez aislado el hongo y mediante caracterización cultural y morfológica, utilizando las claves de Humber (2012) y Rehner et al. (2011); además, de la identificación molecular, utilizando los primers B22U y B822L para la amplificación de la región Block, se concluye que el agente causal es *B. bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. Por ello, se realizaron bioensayos y curvas de supervivencia en larvas del tercer ínstar, con aislamientos de la cría en mención y se compararon con otras cepas de *B. bassiana*; dando como resultado una marcada diferencia en la mortalidad entre los tratamientos con las distintas cepas de *B. bassiana* con una suspensión de 1×10^8 conidios/mL, en contraste con el testigo. Estos resultados muestran que *B. bassiana* tiene efectos letales contra la población de *H. phidilealis*, por lo que puede ser considerado en un esquema de manejo integrado de esta plaga.

Palabra clave: Manejo integrado de plagas, plaga de crucíferas, bioensayos, entomopatógenos

2.2 ABSTRACT

Because of its cryptic feeding habits, management of the species *Hellula phidilealis* should be based on preventive actions centered in population sampling. Moreover, several management tactics should be considered and, if possible, preference should be given to those with long-term benefits and a vision of integrated pest management. The use of entomopathogenic fungi is an alternative to the use of pesticides and has had encouraging results. In managing the rearing of *H. phidilealis*, we detected larvae infected by a fungus, apparently *Beauveria bassiana*, causing mortality of more than 90% of the brood, with sterility as a likely sublethal effect. Once the fungus was isolated through cultural and morphological characterization, using the keys of Humber (2012) and Rehner et al. (2011), and molecular identification using the primers B22U and B822L for amplification of the Block region, we concluded that the causal agent was *B. bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. Bioassays and survival curves were carried out on third instar larvae with the isolates from the mentioned brood and compared with other strains of *B. bassiana*. The result was marked differences between the treatments with different strains of *B. bassiana* at a suspension of 1×10^8 conidia / mL in contrast with the control. This finding means that *B. bassiana* had lethal effects against the population of *H. phidilealis*, and thus can be considered in an integrated management scheme for this pest.

Key words: Integrated pest management, crucifer pests, bioassays, entomopathogens.

2.3 INTRODUCCIÓN

Hellula phidilealis (Lepidoptera: Pyralidae) es una especie económicamente importante en cultivos de crucíferas; en la India, por ejemplo, para la producción de coliflor, los agricultores utilizan 10-12 aplicaciones de plaguicidas durante un período de cuatro meses para prevenir los daños de plagas y enfermedades, en particular *H. undalis* (Ahuja et al. 2012); por otro lado, según lo informado por Boopathi y Pathak (2012), *H. undalis* causa del 5 al 10% de daño en etapa vegetativa y de formación de la cabeza en brócoli en ese país. Es estacionalmente la plaga de mayor importancia en col y coliflor en Trinidad y Tobago (Alam, 1989).

Dados los hábitos crípticos el manejo de *H. phidilealis* debe asentarse en un manejo preventivo centrado en el muestreo de la población. Además, se deben considerar varias tácticas de manejo y, de ser posible, dar preferencias a aquellas con beneficios a largo plazo y con una visión de manejo integrado de plagas. El control debe hacerse con base en los resultados del muestreo y monitoreo, por lo que preferentemente las aplicaciones deben estar dirigidas a las larvas de primer ínstar. Los insecticidas utilizados para esta especie son los piretroides, reguladores de crecimiento, así como aquellos con modo de acción relativamente nuevos como indoxacarb, spinosad, spinoteram, clorantaniloprol, entre otros (Reiter et al. 2008).

En relación a los atrayentes utilizados, una mezcla de 5 mg de (E, E) - 11,13-hexadecadienal y 15-500 ng de (Z) -11-hexadecenal mostró la misma actividad de atracción que las hembras no fecundadas de *H. undalis* (Sugie et al. 2003) lo cual pudiera ser una táctica de apoyo con la evaluación de trampeo masivo en el manejo de esta plaga.

En cuanto a los enemigos naturales reportados, Herting (1965) y Thompson (1946) encontraron a *Bracon hellulae*, *B. hebetor*, *Chelonus* sp. (Braconidae) y *Nemorilla* sp. (Tachinidae)

como parasitoides de *H. phidilealis*, entre otros. Por su parte Mewis et al. (2003) detectaron que en promedio el 16% de las larvas obtenidas de campos de crucíferas presentaron infecciones por microsporidios (*Vairimorpha* sp.) y que el 75% de *H. undalis* infectadas morían durante el desarrollo larval. Sivapragasam, y Chua (1997) detectaron a *Bassus* sp. *Chelonus* sp. y *Phanerotoma* sp. (Braconidae) y *Trathala flavoorbitalis* (Cam.) (Ichneumonidae); no registraron parasitoides de huevos o pupas; el principal depredador fue la hormiga de fuego, *Solenopsis geminata* (F.), que se alimentaba de prepupas y pupas. Por otro lado, se han probado bioinsecticidas como *Bacillus thuringiensis* (Bt), así como azadiractinas las cuales han logrado controles efectivos (Reiter et al. 2008).

La búsqueda de nuevas alternativas en el manejo de esta especie, se ha vuelto imperativo debido a la sustentabilidad y sostenibilidad que se debe tener actualmente con el control de las plagas. El uso de hongos entomopatógenos se ha visto que es una buena opción frente al uso de insecticidas de síntesis química. El objetivo de esta investigación fue conocer al agente causal de la muerte de larvas de en una cría de laboratorio de *H. phidilealis* y determinar sus efectos sobre dicha especie a través de bioensayos. Los resultados sentarán las bases para un manejo alternativo de este insecto en México.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Material Entomológico

Se colectaron larvas de *H. phidilealis* en Atlixco, Puebla (coordenadas: 18.866647, -98.427983 y 1760 msnm), las cuales estaban colonizando un cultivo comercial de coliflor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). El material biológico se trasladó a la cámara de cría del Área de Entomología Agrícola, Campus Montecillo, del Colegio de Postgraduados; los especímenes se

mantuvieron a $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, con un periodo de 12:12 h L:D y una humedad relativa de $55 \pm 5\%$. A partir de estos ejemplares, se generó un pie de cría con las mismas condiciones; al llegar a la quinta generación, durante los meses de noviembre-diciembre de 2020, las larvas de distintos instares comenzaron a presentar esporulación blanquecina típica de una infección de hongos entomopatógenos, la cual se extendió a más del 90% de los individuos de la cría. Las larvas asintomáticas que llegaron al estado adulto, presentaron esterilidad, probablemente como efecto subletal de la infección del patógeno.

2.4.2. Aislamiento del Hongo

Se seleccionaron 10 larvas con mayor presencia de micelio y se colocaron en viales de 2 mL, con una porción de algodón humedecido con agua destilada estéril a manera de cámara húmeda, para una pronta esporulación. Después de cinco días, se procedió a colocar parte del cuerpo del insecto infectado en cajas Petri con medio Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) (BIOXON®).

Aislamientos monospóricos: Después de 15 días posteriores a su inoculación en placas de ADS, se colocó una cantidad no cuantificada de conidios, los cuales fueron depositados en frascos de vidrio con tapa de rosca conteniendo 20 mL de Tween 80 al 0.03%, y fueron agitados por tres minutos con un vortex para obtener una suspensión homogénea. Se colocó una alícuota de 100 μL en una caja de Petri conteniendo 15 mL de agar-agua al 1.5%. Esta se extendió con un asa triangular de vidrio en toda la superficie de la placa de agar-agua. Las placas se incubaron a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en total oscuridad durante 24 horas. Después de este tiempo, en cada placa se localizaron, aquellos conidios aislados de otros conidios y que habían germinado (emisión del tubo germinativo), esto

con la ayuda de microscopio LEICA® modelo DM 750 y estas fueron transferidas a otra caja Petri con medio ADS.

2.4.3. Identificación Morfológica

Para cada aislamiento, se prepararon microcultivos, para ello se colocó un portaobjetos en cajas Petri de 90 mm de diámetro con 15 mL de agar-agua al 1.5%, sobre este se depositaron 3 círculos de medio ADS de un centímetro de diámetro de las placas con el hongo previamente aislado y se cubrieron con cubreobjetos estériles. Las cajas se incubaron a 25 °C durante siete días o hasta que se observó el desarrollo y esporulación del hongo.

Los cubreobjetos se retiraron del círculo de ADS y se colocaron sobre una gota de lactofenol-azul de algodón y se sellaron con esmalte para uñas. Posteriormente, se examinaron bajo el microscopio compuesto con el objetivo 40X. Todos los aislamientos fueron determinados hasta género basándose en las características descritas por Humber (1997).

Una vez determinado el género, las muestras se observaron con el objetivo de 40X de un foto-microscopio III CARL ZEISS conectado a una cámara digital para microscopia PaxCam3. Se obtuvieron de 50 a 100 fotografías de cada aislamiento en formato JPG, las cuales fueron mejoradas con el programa GIMP Versión 2.6.11; para la medición del largo y ancho de los conidios y las fialides, se utilizó el Programa Image J (v. 1.53e) (Rueden et al. 2017). Para su identificación con base en estos parámetros, se utilizaron las claves de Humber (2012) y Rehner et al. (2011).

2.4.4. Crio-Conservación de los Aislamientos

Para conservar los aislamientos de estos hongos para futuras investigaciones o, en su caso, para la implementación de estrategias de control contra *H. phidilealis*, basadas en la aplicación de tácticas alternativas con hongos entomopatógenos, se procedió a mantener cada uno de los aislamientos en crio-conservación en viales de 2 ml a -90 °C en un ultracongelador Thermo Scientific 700 Series Model 703[®]. Ello consistió en extraer 5 círculos de 5 mm de diámetro por medio de un sacabocado de un cultivo de 20 días de sembrado en placas de Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) (BIOXON[®]), e incubados a 25 °C en total oscuridad. Estos círculos fueron depositados en crio-viales de 2 mL de volumen (CORNING[®]) que contenían 1 mL de glicerol al 10% estéril, y del cual se añadió más glicerol al 10% estéril para ajustar el volumen final en el criovial.

2.4.5. Identificación Molecular

Extracción de ADN. De los 10 aislamientos previamente purificados y adicionalmente dos muestras previamente identificadas como *Beuveria bassiana* obtenidas con el insecto cebo en larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), recolectada de suelos donde se cultivó maíz y menta en los años 2018 y 2019, respectivamente; ambos conservados en la colección de entomopatógenos del laboratorio de patología de insectos del Colegio de Postgraduados. Estos aislamientos, se sembraron en placas de ADS, con una lámina de papel celofán dulce con el mismo diámetro que la caja Petri y se incubaron a 25 °C en total oscuridad durante 15 días. Con la ayuda de un bisturí, se procedió a raspar el total del micelio obtenido sobre el papel celofán, cuidando de no traer parte del medio de cultivo, y se colocó en tubos de vidrio previamente esterilizados.

La extracción de ADN de este micelio obtenido, se realizó con el kit de extracción Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit de la marca ZYMO RESEARCH®, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración del ADN se determinó en un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA ®), y se almacenaron a 4 °C para su posterior evaluación.

Reacción en Cadena de la Polimerasa. Una vez obtenido el ADN con una concentración por encima de 120 ng/UL, se procedió a realizar una mezcla para cada aislamiento, que contenía: 5 µL de Buffer PCR, proporcionado por el proveedor de la Taq polimerasa, 1 µL de cloruro de magnesio, 0.5 µL de DNTP's, 1 µL de los primers B22U y B822L, esto para la amplificación de la región Block (Rehner et al. 2006), 0.15 µL de Taq polimerasa (Gotak Flexi Dna Polimerasa (5 U/UL), PROMEGA®) y de 10 a 20 ng µL⁻¹ de ADN genómico, teniendo una mezcla total de 25 µL. Para ello se utilizó un termociclador T-100 Thermal Cycle de BIORAD® con las condiciones de ciclaje térmico establecidas por Rehner y Buckley (2005). El producto de PCR fue enviado a la empresa Macrogen, Inc. en Corea del Sur para su secuenciación.

Análisis de los datos: Todas las secuencias fueron editadas y ensambladas con el programa BioEdit (Hall, 1999). Se realizaron alineamientos múltiples con Clustal W, para el análisis de datos se utilizó el método Máxima Verosimilitud, el Bootstrap del árbol consenso se realizó con 1000 réplicas. Para este análisis se utilizó el programa MEGA 5 (Tamura et al., 2011).

2.4.6. Bioensayo: Curvas de Supervivencia

Material entomológico. Se colectaron larvas de distintos estadios de *H. phidilealis* en Atlixco, Puebla, México, en el mes de mayo de 2021, se instaló en el sitio y con las condiciones

antes mencionadas para su reproducción y renovación de la cría. Para evitar contaminación de campo, el bioensayo se realizó con larvas de la segunda generación de laboratorio.

Aislamientos del hongo. De los aislamientos en crio-conservación, se eligieron 3 de ellos al azar (D, F y L) y los dos aislamientos de la colección del laboratorio de patología de insectos, anteriormente mencionadas (identificadas como W y Y), esto con el propósito de comparar los aislamientos obtenidos de la cría de *H. phidilealis* con otras cepas aisladas de suelo con insectos cebo. Estos cinco aislamientos, se sembraron en placas de ADS, cubiertos con papel celofán dulce para obtener micelio y conidios directamente, sin tener que utilizar un método de separación del medio de cultivo. Se incubaron a 25 °C en total oscuridad durante 20 días. De esta biomasa del hongo, se obtuvo una concentración de 1×10^8 conidios/mL en un volumen de 10 mL de agua.

Larvas de tercer ínstar de *H. phidilealis* se lavaron en agua destilada, se secaron sobre papel filtro y luego se sumergieron en 10 mL de suspensión de 1×10^8 conidios/mL del hongo entomopatógeno durante 10 s. El mismo procedimiento se realizó en tres grupos de larvas con las mismas condiciones, más un cuarto grupo (testigo) que fue sumergido en Tween 80 al 0.03%. Cada unidad experimental constó de 10 larvas. Después del tratamiento los insectos se colocaron en recipientes individuales con alimento (discos de hojas de col). Posteriormente estos dispositivos se incubaron a 25°C y $\geq 55\%$ de humedad relativa en obscuridad total. La mortalidad se registró diariamente durante un periodo de 30 días.

Para los datos de tiempo-mortalidad se realizó un análisis de supervivencia con el método de Long-Rank mediante el lenguaje de programación R versión 4.0.5.

2.5 RESULTADOS

2.5.1. Identificación Morfológica

En general, los aislamientos crecieron a 25 ± 2 °C sobre Agar Dextrosa Sabouraud, alcanzando en promedio entre 17 y 28 mm de diámetro a los 15 días de incubación, se observó una colonia de apariencia algodonosa en cada una de las cepas, típica del género *Beauveria*, al inicio de color blanco, posteriormente tomo color amarillo pálido. Hifas septadas, ramificadas, hialinas, de paredes lisas, 1-1.8 μm de ancho y con terminaciones en zig-zag. Fialides en forma de botella, con una constricción en la parte superior; conidios de globosos a subglobosos con paredes lisas. En el Cuadro 2.1, se presentan las mediciones de la longitud de las fialides de cada aislamiento en estudio, así como el diámetro polar y ecuatorial de los conidios.

Cuadro 2.1. Mediciones de la longitud de la fiálide y de los diámetros ecuatoriales y polares de los aislamientos de hongos entomopatógenos obtenidos de *Helulla philidialis*.

AISLAMIENTO	DIAMETRO POLAR	DIAMETRO ECUATORIAL	ALTURA DE FIALIDE
A	3.150 ± 0.052 μm	2.492 ± 0.042 μm	5.263 ± 0.081 μm
B	3.441 ± 0.049 μm	2.489 ± 0.039 μm	4.578 ± 0.070 μm
D	3.107 ± 0.046 μm	2.412 ± 0.038 μm	5.869 ± 0.113 μm
F	2.470 ± 0.033 μm	1.904 ± 0.029 μm	4.888 ± 0.066 μm
L	2.423 ± 0.030 μm	1.990 ± 0.027 μm	4.735 ± 0.068 μm
M	2.484 ± 0.041 μm	1.934 ± 0.038 μm	4.611 ± 0.069 μm
N	2.523 ± 0.043 μm	1.958 ± 0.029 μm	4.724 ± 0.064 μm
O	2.200 ± 0.043 μm	1.695 ± 0.028 μm	4.886 ± 0.057 μm
P	2.471 ± 0.044 μm	2.043 ± 0.037 μm	4.673 ± 0.057 μm
Q	2.205 ± 0.033 μm	1.719 ± 0.028 μm	4.727 ± 0.060 μm
V	2.489 ± 0.031 μm	2.118 ± 0.031 μm	4.443 ± 0.084 μm
W	2.558 ± 0.044 μm	1.981 ± 0.036 μm	4.539 ± 0.054 μm
Y	2.352 ± 0.033 μm	1.904 ± 0.030 μm	4.486 ± 0.063 μm
Z	2.680 ± 0.034 μm	2.270 ± 0.037 μm	4.497 ± 0.051 μm

2.5.2. Identificación Molecular

Los productos de PCR amplificados, obtenidos con los primers B22U y B822L, de los 12 aislamientos analizados tuvieron un tamaño similar de aproximadamente 800 pb para el iniciador B22U y de 1400 para B822L. Después de la alineación y el recorte, la longitud final del conjunto de datos de secuencia de Bloc fue de aproximadamente 769 posiciones alineadas. El análisis filogenético mostró que todos los aislamientos corresponden a *B. bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Figura 2.1).

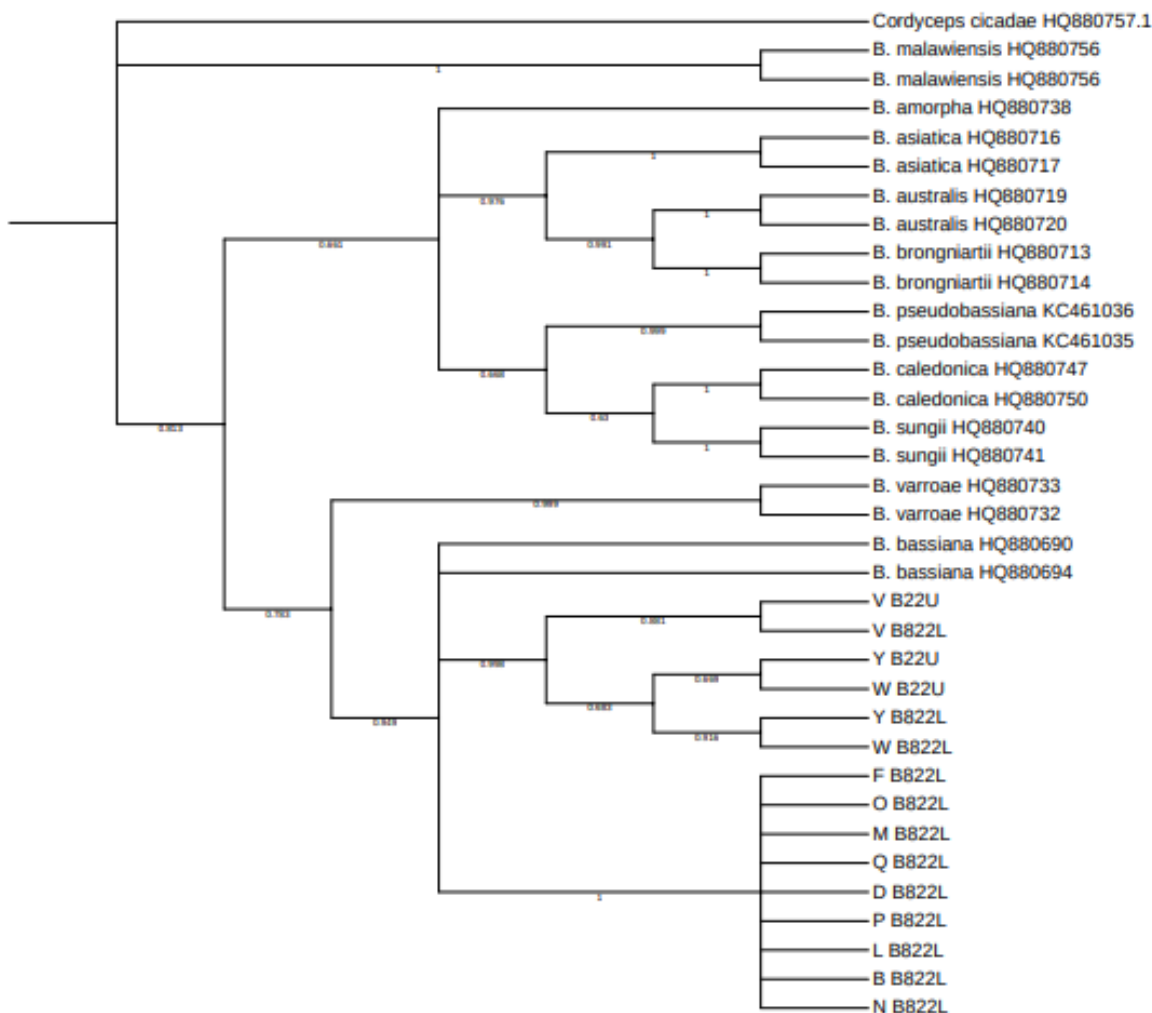


Figura 2.1. Dendrograma obtenido de las secuencias de 10 aislamientos de *Hellia phidilealis* comparadas con aislamientos de *Beauveria bassiana* obtenidas de larvas de *Galleria mellonella* (V, W) y de otros aislamientos del género *Beauveria*.

La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo de dos parámetros de Kimura (1980). El árbol de consenso bootstrap inferido de 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985), se tomó para representar la historia evolutiva de los taxones analizados (Felsenstein, 1985). Las ramas correspondientes a particiones reproducidas en menos del 50% de réplicas de arranque se colapsan. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 repeticiones) se muestra junto a las ramas

(Felsenstein, 1985). Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente mediante la aplicación de los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque de Máxima Verosimilitud Compuesta (MCL), y luego seleccionando la topología con valor de verosimilitud superior. Se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de tasas evolutivas entre sitios [2 categorías (+G, parámetro = 0,7196)]. Este análisis involucró 35 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 769 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA 5.

2.5.3. Curvas de Supervivencia

El bioensayo arrojó una marcada diferencia entre el testigo, sin aplicación de *B. bassiana*, con el tratamiento de diferentes aislamientos, incluidas las cepas obtenidas previamente de *G. mellonella* (log-rank $\chi^2 = 422$; $df = 5$; $P < 0.001$); disminuyendo el porcentaje de supervivencia del testigo a partir del día 30 (Figura 2.2A).

En cuanto a la comparación entre los distintos aislamientos, el porcentaje de supervivencia de *H. phidilealis* empezó a decaer a partir del cuarto día, alcanzando un 50% de supervivencia entre el séptimo y el decimotercer día después de la inoculación, siendo el aislamiento “D” el que requirió un menor tiempo para alcanzar este porcentaje (log-rank $\chi^2 = 25.6$; $df = 4$; $P < 0.001$) (Figura 2.2B).

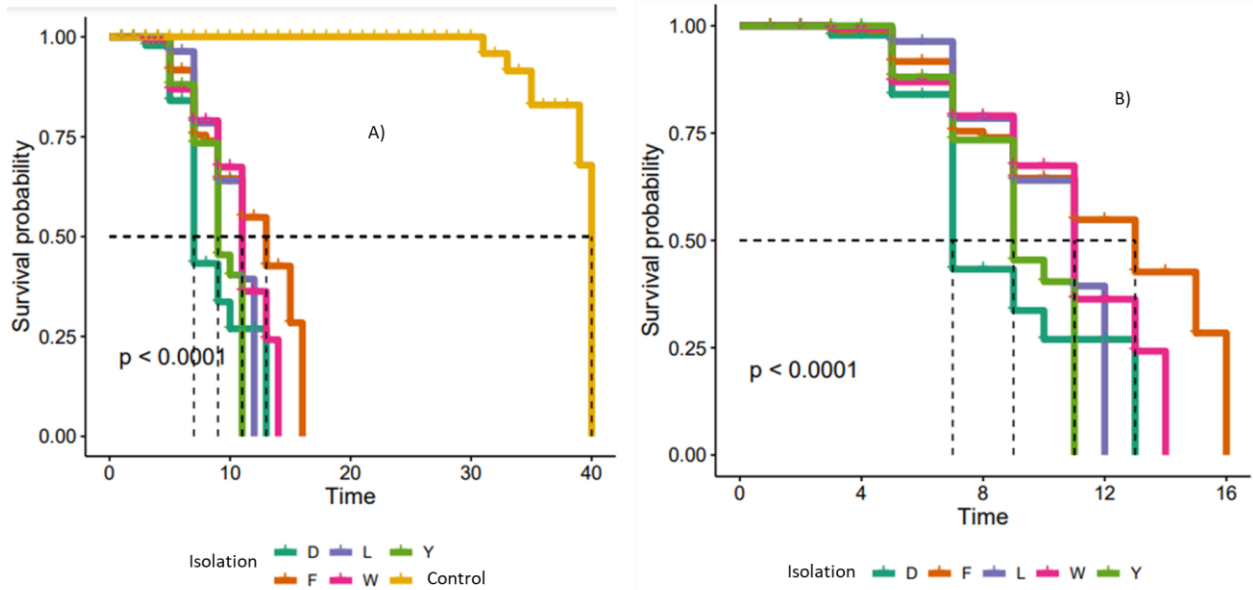


Figura 2.2. Curvas de supervivencia de *Hellua phidilealis* expuestos a diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* sometidos a análisis de supervivencia utilizando la prueba de rango logarítmico de los estimadores de Kaplan-Meier. A) (log-rank $\chi^2 = 422$; $df = 5$; $P < 0.001$); y B) (log-rank $\chi^2 = 25.6$; $df = 4$; $P < 0.001$).

Una vez detectados los insectos que no reaccionaban al toque con el pincel, se consideraron muertos y se depositaron en cajas Petri con papel filtro y algodón humedecido con agua destilada a modo de cámara húmeda para favorecer la esporulación del hongo, misma que se expresó entre el segundo y tercer día después de colocados en las cajas Petri; todos los insectos tratados presentaron la esporulación característica de *B. bassiana*.

2.6 DISCUSIÓN

Considerando las características descritas en la identificación morfológica, así como el rango en las mediciones indicadas, se puede afirmar que, morfológicamente, todos los aislamientos en cuestión, se tratan de *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., toda vez que coincide con lo reportado por Humber (2012) y Rehner et al. (2011).

La evidencia del uso de *B. bassiana* como agente de control de otras especies de Pyralidae ha sido estudiado por García et al. (2018) contra larvas de segundo ínstar de *Diatraea saccharalis*, *D. indigenella*, *D. tabernella* y *D. busckella* en condiciones de laboratorio, con mortalidades del 73.3, 83.3, 67.6 y 24.1%, respectivamente; estos autores determinaron una concentración letal media de 9.04×10^5 conidios/mL y una concentración letal noventa de 2.07×10^7 conidios/mL sobre larvas de segundo ínstar de *D. saccharalis*; en este estudio no se contempló la obtención de concentraciones letales, sin embargo, con la concentración de 1×10^8 conidios/mL, se obtuvieron tasas de mortalidad superiores al 90%. Se recomienda hacer estudios específicos sobre concentraciones letales al 50% para tener un mejor uso racional de este agente. Por otra parte, Cabrera y Pinedo (1994) detectaron que *B. bassiana*, no pudo controlar a *H. phidilealis*, con una concentración similar a la utilizada en el presente estudio (23×10^7 conidios/mL) de un producto comercial.

En el contexto de un manejo integral de *H. phidilealis* diversos autores han probado otras alternativas como el extracto hidroetanólico de las hojas de *Azadirachta indica*, las cuales redujeron significativamente las poblaciones de *P. xylostella* y *H. undalis* en comparación con el insecticida sintético (cipermetrina+dimetoato) y una práctica campesina en Togo (Mondedji et al. 2014). Además, *H. undalis* es altamente susceptible a cuatro endotoxinas δ de *Bacillus*

thuringiensis (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca) y una formulación comercial basada en *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* (Xentari®) (Srinivasan y Hsu, 2008). Del mismo modo, se observó que las toxinas y/o las formulaciones de *Bacillus thuringiensis* son eficaces contra *H. undalis* Fab.) en Taiwán (Srinivasan y Hsu, 2008).

Mewis et al. (2003) observaron infecciones por protozoarios de larvas en las Filipinas. La especie no fue claramente identificada, el género fue descrito como *Vairimorpha*; las infecciones de laboratorio en larvas de tercer ínstar con una dieta artificial causaron una tasa de mortalidad del 80%; un promedio del 16% de la población silvestre estaba infectada con *Vairimorpha* con una tasa de mortalidad del 75%.

Por otra parte Kalbfleisch, (2006) detectó que el atrayente sexual E,E-11,13-Hexadecadienal fue específico y atractivo para los machos de *H. undalis*; la altura de la trampa fue mejor a 0.5 m sobre el suelo, con trampas tipo ala y una distancia entre trampas de más de 15 m, cuando las trampas se colocan con viento cruzado y entre 20 y 30 m cuando se colocan en línea con la dirección del viento.

La mayoría de los estudios se centran en la mortalidad ocasionada por la exposición aguda de los hongos entomopatógenos, sin embargo, es necesario abordar el efecto subletal indirecto de *B. bassiana* en la progenie de *H. phidelialis*. Esto podría contribuir de manera sobresaliente en la regulación de la población de este insecto plaga.

2.7 AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo agradecen a Lauro Soto Rojas, Investigador del Programa de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, por su apoyo en los análisis estadísticos y de las curvas de supervivencia.

CAPÍTULO III. DISTRIBUCIÓN POTENCIAL UTILIZANDO DISPONIBILIDAD AMBIENTAL DE *Hellula phidilealis* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

3.1 RESUMEN

El barrenador del tallo de la col, *Hellula phidilealis* (Lepidoptera: Pyralidae), es una plaga económicamente importante en cultivos de la familia Brassicaceae. El principal daño lo ocasiona la larva al alimentarse de los puntos de crecimiento de la planta. Las mayores pérdidas se registran cuando el insecto se alimenta de plantas recién ubicadas en campo. Los métodos y herramientas de modelado que integran datos de distribución y variables climáticas se usan ampliamente para predecir, a escala global, nacional o local, la distribución real y potencial de plagas de insectos. El resultado es la integración de mapas en los que se predice la presencia o ausencia de una determinada especie; lo que puede servir como base para planificar futuras estrategias de manejo. Los mapas de idoneidad ambiental podrían ser una herramienta importante para apoyar las decisiones técnicas y políticas, relacionadas con el manejo de plagas. En el presente trabajo se modeló el algoritmo de máxima entropía para determinar las áreas potenciales de riesgo de establecimiento de *H. phidilealis*, considerando 19 variables climáticas; los modelos obtenidos infieren que *H. phidilealis* puede tener una distribución potencial alta en el país y con interacciones geográficas que podrían involucrar áreas productoras de brócoli y coliflor en los estados de Sonora y Sinaloa; así como potencial medio en los estados de Aguascalientes, Guanajuato, Jalisco, Michoacán y Zacatecas. Nuestra aportación puede contribuir a la prevención y manejo de este pirálido en zonas productoras de crucíferas, así como la dirección correcta de muestreos.

Palabras clave: Máxima entropía, Muestreos, Aproximación de áreas

3.2 ABSTRACT

The cabbage stem borer, *Hellula phidilealis* (Lepidoptera: Pyralidae), is an economically important pest of crops in the Brassicaceae family. The main damage is caused by the larva feeding on the growing points of the plant. The greatest losses are recorded when the insect feeds on plants recently placed in the field, although the critical period extends up to 60 days after transplantation. Modeling methods and tools that integrate distribution data and climatic variables are widely used to predict, at global, national or local scales, the actual and potential distribution of insect pests. The result is the integration of maps in which the presence or absence of a certain species is predicted; which can serve as a basis for planning future management strategies. Environmental suitability maps could be an important tool to support technical and political decisions related to pest management. In the present work, the maximum entropy algorithm was modeled to determine the potential areas of risk of establishment of *H. phidilealis* considering 19 climatic variables; where it was observed that *H. phidilealis* has a high potential distribution in the country, and with geographic interactions that could involve broccoli and cauliflower producing areas in the states of Sonora and Sinaloa, as well as medium potential in the states of Aguascalientes, Guanajuato, Jalisco, Michoacan and Zacatecas. Our contribution can contribute to the prevention and management of this pyralid in cruciferous producing areas, as well as the correct direction of sampling.

Keywords: Maximum entropy, Sampling, Area approximation

3.3 INTRODUCCIÓN

La producción en México de especies de la familia Brassicaceae cultivadas es de tal importancia que, para el año 2020, la producción nacional de brócoli y coliflor, fue de 584 mil ton y 103 mil ton, respectivamente, la superficie sembrada fue de 34 mil y 4 mil hectáreas respectivamente, generando un valor de la producción respectiva de 3, 860 y 499 millones de pesos; en cuanto al valor de las exportaciones en este mismo periodo, fueron de 554 y 78.2 millones de dólares, respectivamente (SIAP, 2022). El barrenador del tallo de la col, *Hellula phidilealis* (Lepidoptera: Pyralidae), es una plaga económicamente importante en cultivos de esta familia; en la India, por ejemplo, para la producción de coliflor, los agricultores utilizan 10-12 aplicaciones de plaguicidas durante un período de 4 meses para prevenir los daños de plagas y enfermedades, en particular *H. undalis* (Ahuja et al. 2012). Por otro lado, según lo informado por Boopathi y Pathak (2012), *H. undalis* causa del 5 al 10% de daño en etapa vegetativa y de formación de la cabeza en brócoli en ese país. Es estacionalmente la plaga más grave de la col y coliflor en Trinidad y Tobago (Alam, 1989).

El principal daño lo ocasiona la larva al alimentarse de los puntos de crecimiento de la planta. Las mayores pérdidas se registran cuando el insecto se alimenta de plantas recién ubicadas en campo, aunque el periodo crítico se extiende hasta los 60 días después del trasplante. Las larvas de primer ínstar tienen un hábito minador; recién emergidas del huevo penetran entre el parénquima de la hoja para protegerse durante el primer y segundo ínstar, después se dirigen al brote de las plantas jóvenes. Cuando llegan al brote, lo barrenan por completo en su interior, posteriormente ingresan al tallo con dirección a la raíz, pero sin llegar a ella. En el caso de los tres últimos instares, muestra preferencia por los tallos y las hojas en la axila y peciolo (Razuri e Hinostroza, 1974; Sivapragasam y Aziz, 1990). En plantas jóvenes, perforan el tallo principal y

pueden causar el marchitamiento y la muerte de la planta. Cuando el daño comienza por la hoja, la larva enrolla la orilla para formar un túnel cubierto con excremento y seda (Razuri e Hinostroza, 1974; Shrestha y Webb, 2016), en otras ocasiones penetran en la nervadura central para pupar. Si se alimentan del brote principal, causan la producción de brotes secundarios lo que evita la formación de cabezas. Las larvas que se alimentan del florete en formación, generan una extensa red con la producción de seda que deforma la cabeza y provoca que el producto no sea comercializable (Reiter et al. 2008; Shrestha y Webb, 2016).

Los métodos y herramientas de modelado que integran datos de distribución y variables climáticas se usan ampliamente para predecir a escala global, nacional o local, la distribución real y potencial de plagas de insectos (Guisan y Thuiller, 2005). El resultado final es la integración de mapas en los que se predice la presencia o ausencia de una determinada especie (Gevrey y Worner, 2006). Estas predicciones pueden servir como base para planificar futuras estrategias de seguimiento, gestión y control. Los mapas de idoneidad ambiental podrían ser una herramienta importante para apoyar las decisiones técnicas y políticas relacionadas con el manejo de plagas. En el presente trabajo se modeló el algoritmo de máxima entropía para determinar las áreas potenciales de riesgo de establecimiento de *H. phidilealis*, considerando 19 variables climáticas; lo cual puede contribuir a la prevención y manejo de este pirálido en zonas productoras de crucíferas, así como apoyar en el monitoreo de zonas con potencial de establecimiento.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. Registros de Presencia de Plagas

Los datos de distribución de *H. phidilealis* se obtuvieron de distintas bases de datos con soporte científico como los son Ecoregistros (La Grotteria, 2022), Naturalist (Academia de

Ciencias de California, 2022). Biofaces (Biofaces, 2022), Charles Darwin Foundation for the Galapagos Islands (Charles Darwin Foundation, 2022), BOLD (International Barcode of Life, 2022), entre otras publicaciones y datos propios de colecta de los autores del presente trabajo.

Los registros de distribución se incorporaron en una hoja de Excel[®], unificando las coordenadas para que todas se encontraran en formato de grados decimales (es decir, 18.4616, -97.3933). La base de datos final incluyó 63 registros de 14 países en los que se reportó la presencia de *H. phidilealis*: Argentina, Barbados, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, Dominica, Ecuador, Guyana, Nicaragua, Trinidad y Tobago, San Vicente y las Granadinas, y las Islas Vírgenes, así como 37 registros de Estados Unidos de América y nueve de México, contando con un total de 109 datos (Figura 3.1). El número total y su distribución se consideraron precisos para calcular el modelo de distribución (Van Proosdij et al. 2015).



Figura 3.1. Distribución de los datos colectados en bases de datos con presencia de *Hellula phidilealis* (Lepidoptera: Pyralidae).

3.4.2. Modelo de Distribución de Especies

Se utilizó el algoritmo de máxima entropía MaxEnt versión 3.4.4 (Phillips et al. 2006) para modelar varios escenarios de propagación potencial de *H. phidilealis*. Se descargaron 19 variables climáticas globales de WorldClim en su versión 2 (2017) con una resolución de 5 minutos de arco y datos de elevación de 90 m utilizadas en el modelo. Estas variables bioclimáticas representaron las condiciones actuales (1970-2000), están disponibles a escala global y tienen resoluciones espaciales más finas. El resultado del modelo es la cuantificación de la idoneidad del hábitat para la especie en función de las variables de entrada (Phillips y Dudík, 2008).

3.4.4. Evaluación del Modelo

El rendimiento del modelo de nicho se evaluó con el índice del área bajo la curva (AUC) (Hernandez et al. 2006; Phillips y Dudík, 2008) y se clasificaron según Swets (1988): AUC 0,90–1,00 = excelente; 0.80 – 0.89 = bueno; 0.70 – 0.79 = regular; 0.60 – 0.69 = pobre; 0.50 – 0.59 = reprobado. El punto de corte óptimo (PCO) se determinó en función del umbral más estricto dentro de MaxEnt (presencia de entrenamiento del percentil 10). La importancia de los factores ambientales individuales para el desarrollo del modelo se evaluó utilizando el Jackknife incorporado.

3.4.5. Mapas de Predicción y Distribución

Se proyectaron las capas ambientales globales en las provincias biogeográficas de México y se interpretó cada ecosistema modelado (Guisan y Thuiller, 2005). Las interacciones geográficas, (la probabilidad de que el hábitat sea adecuado para la coexistencia; (López-Martínez et al. 2016) de *H. phidilealis* y las áreas de cultivo de crucíferas en México (SIAP, 2022) (Figura 3.2) se calcularon en el software ArcMap® 10.8 (ESRI Inc., EE. UU.), así como la producción de mapas. Las provincias biogeográficas y zonas de transición se basan en Morrone (2015).

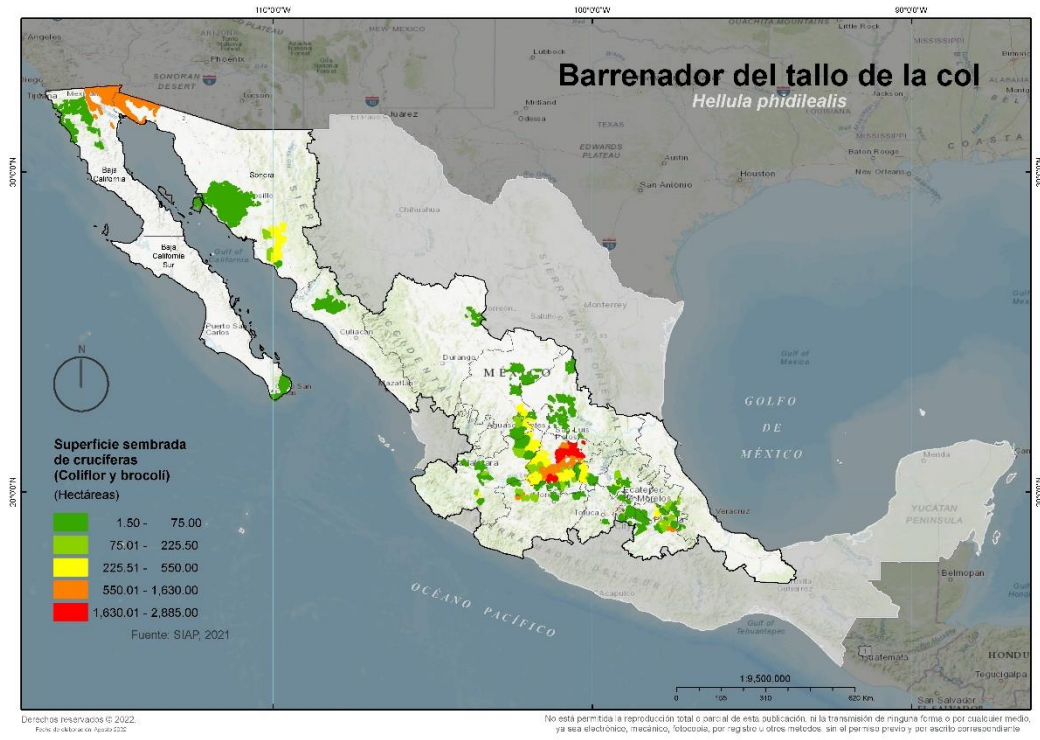


Figura 3.2. Distribución de municipios productores de crucíferas en México, según el SIAP, 2022

3.5 RESULTADOS

3.5.1. Idoneidad Ambiental

Los resultados del modelo muestran que *H. phidilealis* presentó una alta idoneidad para la provincia biogeográfica de Sonora, en los municipios de Empalme, Guaymas, BÁCUM, San Ignacio Río Muerto, Cajeme, Benito Juárez, Etchojoa, Huatabampo y Navojoa (Figura 3.3A); para la provincia biogeográfica del desierto chihuahuense, en los municipios de Nogales, Santa Cruz, Imuris, Cananea, Naco, Nacozari de García, Villa Hidalgo, Agua prieta, Fronteras y Bavíspe (Figura 3.3B); para la provincia biogeográfica de Tamaulipas, los municipios de Valle Hermoso, Matamoros, Río Bravo y San Fernando (Figura 3.3C); para la provincia biogeográfica Veracruzana, los municipios de Soto La Marina, Altamira, Tampico, Ciudad Madero, Pueblo Viejo, Tampico Alto, Pánuco, Ozuluama de Mascareñas, Tamalín, Tantima, Tamiahua, Tuxpan y Cazonas de Herrera (Figura 3.3D) y para la provincia biogeográfica de Tierras Bajas del Pacífico, los municipios de Ahome, Guasave, Angostura, Salvador Alvarado y Navolato (Figura 3.3E). La idoneidad media se calculó en las provincias de Tierras Bajas el Pacífico, Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental, Sonora, Tamaulipas, Veracruzana y Tierras Altas de Chiapas (Figura 3.4). Actualmente solo se tienen datos registrados en los estados Chiapas, Chihuahua, Colima, Oaxaca, Puebla, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas.

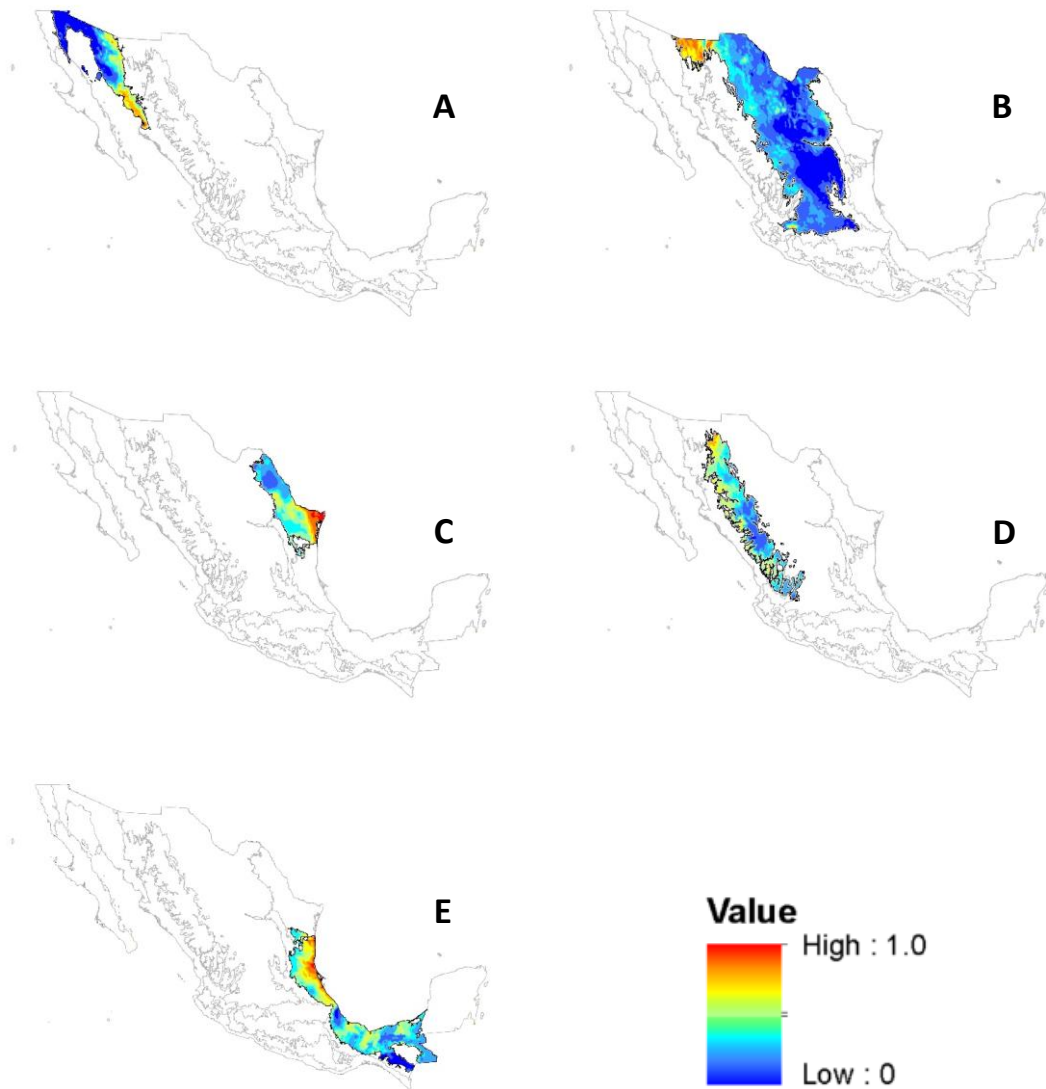


Figura 3.3. Cartografía de Idoneidad Ambiental para *Hellula phidilealis* (Lepidoptera: Pyralidae) en distintas provincias biogeográficas de México. A) Provincia de Sonora, B) Provincia del Desierto de Chihuahuense, C) Provincia de Tamaulipas, D) Provincia Veracruzana, E) Provincia de Tierras Bajas del Pacífico.

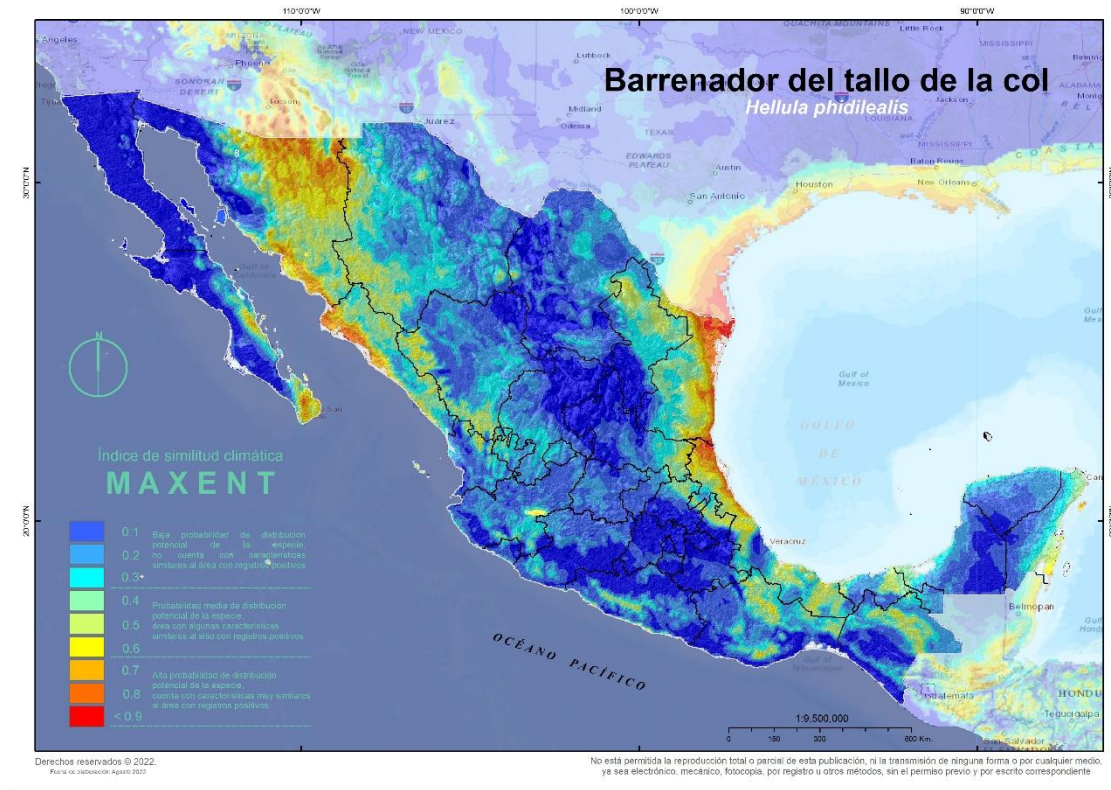


Figura 3.4. Cartografía de Idoneidad Ambiental Media para *Hellula phidilealis* (Lepidoptera: Pyralidae) en las provincias biogeográficas de Tierras Bajas el Pacífico, Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental, Sonora, Tamaulipas, Veracruzana y Tierras Altas de Chiapas.

3.5.2. Validación del Modelo

El rendimiento del modelo se consideró excelente, con el valor de 0.948. Para *H. phidilealis* la altitud, la temperatura media del trimestre más húmedo, la temperatura media del trimestre más frío y la estacionalidad de la temperatura fueron las variables que más influyeron en la distribución potencial del insecto (Cuadro 3.1). Estas cuatro variables aportaron 62.1% en el modelo calculado.

Cuadro 3.1. Análisis de la contribución de 19 variables bioclimáticas y 1 topográfica al modelo de aptitud ambiental de *Hellula phidilealis* (Lepidoptera: Pyralidae).

Variable	Contribución %
Elevación	21.9
Temperatura media anual	1.6
Intervalo medio diurno	1.2
Isotermalidad	1.0
Estacionalidad de la temperatura	9.8
Temperatura máxima del mes más cálido	0.3
Temperatura mínima del mes más frío	0
Rango anual de temperatura	5.5
Temperatura media del trimestre más húmedo	15.2
Temperatura media del cuarto más seco	7.6
Temperatura media del trimestre más cálido	1.1
Temperatura media del trimestre más frío	15.2
Precipitación anual	1.9
Precipitación del mes más lluvioso	3.1
Precipitación del mes más seco	0.8
Estacionalidad de la precipitación	6.7
Precipitación del trimestre más húmedo	0.2
Precipitación del trimestre más seco	0.6
Precipitación del trimestre más cálido	0.9
Precipitación del trimestre más frío	4.9

3.5.3. Interacción Geográfica

Los resultados de la interacción geográfica, indicaron que *H. phidilealis* puede tener distribución potencial alta en el país, y con interacciones geográficas que podrían involucrar áreas productoras de brócoli y coliflor en los estados de Sonora y Sinaloa, con un total de superficie sembrada de 1,786 ha (SIAP, 2022), así como potencial medio en los estados de Aguascalientes, Guanajuato, Jalisco, Michoacán y Zacatecas, los cuales cuentan con una superficie sembrada de 28,908.27 ha.

3.6 DISCUSIÓN

La idoneidad ambiental arrojada por el presente estudio, mostró que *H. phidilealis* puede establecerse en los estados de Chiapas, Chihuahua, Colima, Oaxaca, Puebla, Sinaloa, Sonora y

Tamaulipas. Es de interés particular los estados de Puebla, Sinaloa y Sonora, debido a que son estados productores de crucíferas en el país.

El uso del modelo de máxima entropía para determinar áreas de potencial establecimiento, se ha utilizado con otras especies de insectos; Luna et al. (2017) calcularon modelos de distribución para México y la interacción geográfica con las zonas productoras de aguacate del país con cinco especies plaga. Por otra parte, Pérez-De la O et al. (2016) calcularon la disponibilidad ambiental de *Bulia schausi* Richards (Lepidoptera: Noctuidae) en México y su potencial interacción con áreas dedicadas a la producción de brócoli, el modelo obtenido presentó un valor de AUC de 0.982 y determinaron, al igual que en el presente estudio, que tres variables ambientales influyeron en la distribución potencial de la especie; dicho valor es similar al arrojado por el presente trabajo de 0.948 aunque con distintas variables.

Nuestra cartografía no revela con precisión las interacciones ecológicas a nivel de nicho local, por lo que además es importante establecer mecanismos de vigilancia epidemiológica fitosanitaria para la correcta detección oportuna de ésta y otras plagas de reciente impacto o, en su caso, cuarentenarias; además de referenciar con precisión el posible impacto de *H. phudilealis* sobre la producción de crucíferas.

3.7 AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo agradecen a Sandra Berenice Rositas Tristán, Investigadora del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria de la Dirección General de Sanidad Vegetal- SENASICA, por su apoyo en los análisis de Máxima Entropía e Idoneidad ambiental.

CONCLUSIONES GENERALES

- Se identificaron cinco instares larvales utilizando como variable la anchura de la cápsula cefálica. La tasa de cambio fue de 0.50, 0.58, 0.92 y 0.54 para los instares L2, L3, L4 y L5 respectivamente, con un promedio de 0.63. Los límites para L1 fueron de 150 a 241 μm , para L2 de 242 a 369 μm , de 370 a 693 μm para L3, para L4 fue de 694 a 1146 μm y finalmente para L5 fue de 1147 a 1478 μm . Dependiendo donde se ubiquen los valores del ancho de la capsula cefálica de una larva de *H. phidilelais*, se puede determinar en qué ínstar se encuentra y saber qué estrategia podemos aplicar para su manejo, considerando que, dependiendo de su estadio, el daño y la ubicación en la planta difiere.

- Mediante análisis cultural, morfológico y molecular, se determinó que el agente causal de la epidemia dentro de la cría del insecto objetivo de este trabajo fue *Beauveria bassiana* (Bals.- Criv.) Vuill. En cuanto a la comparación entre los distintos aislamientos del hongo, el porcentaje de supervivencia de *H. phidilealis* empezó a decaer a partir del cuarto día, alcanzando un 50% de supervivencia entre el séptimo y el decimotercer día después de la inoculación, siendo el aislamiento “D” el que requirió un menor tiempo para alcanzar este porcentaje. En los bioensayos, con la concentración de 1×10^8 conidios / mL, se obtuvieron tasas de mortalidad mayores al 90%. Se recomienda hacer estudios específicos sobre concentraciones letales al 50% para tener un mejor uso racional de este agente. Se demostró que este hongo, asilado de larvas de la misma especie, pueden tener efectos negativos en la población de *H. phidilealis*

-La idoneidad ambiental realizada para esta plaga, podría ser la base para realizar estudios de muestreo sistemático para determinar la distribución de *H. phidilealis* en los estados de Chiapas, Chihuahua, Colima, Oaxaca, Puebla, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas. Es de interés particular los

estados de Puebla, Sinaloa y Sonora ya que representan una alta proporción en la producción de crucíferas en el país. El rendimiento del modelo se consideró excelente, con el valor de 0.948. Para *H. phidilealis* la altitud, la temperatura media del trimestre más húmedo, la temperatura media del trimestre más frío y la estacionalidad de la temperatura fueron las variables que más influyeron en la distribución potencial del insecto.

LITERATURA CITADA

- Academia de Ciencias de California, 2022. iNaturalist; *Hellula phidilealis*. En línea: <https://www.inaturalist.org/>. Fecha de consulta: agosto, 2022.
- Ahuja DB, Singh RV, Bhat MN, Singh S. 2012. Area Wide Implementation of Integrated Pest Management in India for Cauliflower Cultivated in Rainy Season. *Agrotechnology* 1:2.
- Alam MM. 1989. Distribution, Host Plants and Natural Enemies of Cabbage bud-worm (*Hellula phidilealis* (Walker) in the Caribbean. Caribbean food crops society societ e cara ibe pour les plantes alimentaires Twenty fifth Annual Meeting 1989 25 congres annuel.
- Biofaces. 2022. Biofaces, BiofacesBring Nature Closer.-*Hellula phidilealis*. En linea: <https://www.biofaces.com/newest/>. Fecha de consulta: agosto, 2022.
- BOLD, International Barcode of Life. 2022. BARCODE OF LIFE DATA SYSTEM. Advancing biodiversity science through DNA-based species identification. En linea: <http://bins.boldsystems.org/index.php>. Fecha de consulta: agosto, 2022.
- Boopathi T, Pathak KA. 2012. Seasonal Abundance of Insect Pests of Broccoli in North Eastern Hill Region of India. *Madras Agricultural Journal* 99: 125-127.
- Cabrera-La Rosa JC, Pinedo CE. 1994. El Hongo *Beauveria bassiana* en el Control de Algunas Plagas Agr colas. *Revista Peruana de Entomolog a* 37:107–110.
- Chapman RF. 1998. *The Insects Structure and Function*. 4th Edition. Cambridge. University Press, England. 374 p.
- Charles Darwin Foundation, 2022. Charles Darwin Foundation for the Galapagos Islands. *Hellula phidilealis*. En linea: <https://www.darwinfoundation.org/en/>. Fecha de consulta: agosto, 2022.
- Dyar HC. 1890. The number of molts of lepidopterous larvae. *Psyche* 5:420-422.
- Ebenebe AA, Achari SR, Chand N, Krishna AA, Baleisuva S. 2011. The cabbage webworm (*Hellula undalis*) on tickweed (*Cleome viscosa*) in Samoa. *South Pac. J. Nat. Appl. Sci.* 29: 1–6.
- Felsenstein J. 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39:783- 791.
- Frouz J, Ali A, Lobinske RJ. 2002. Influence of temperature on developmental rate, wing length, and larval head capsule size of pestiferous midge *Chironomus crassicaudatus* (Diptera: Chironomidae). *Journal of Economic Entomology* 95: 699–705.
- Garc a JL, Sotelo P, Monroy DM, Barrera G, G mez-Valderrama J, Espinel C, Barreto E, Villamizar FL. 2018. Identification and Characterization of a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Isolate Having a High Potential for the Control of the *Diatraea* sp. Sugarcane Stem Borer. *Biotechnolog a Aplicada* 35:1201-7.

- Gevrey M, Worner SP. 2006. Prediction of global distribution of insect pest species in relation to climate by using an ecological informatics method. *Journal of Economic Entomology* 99: 979–986.
- Got B. 1988. Determination of instars of the european corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) based on a distribution model of capsule widths. *Annals of the Entomological Society of America* 81: 123-131.
- Guisan A, Thuiller W. 2005. Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. *Ecology Letters* 8: 993–1009.
- Hall TA. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hernandez PA, Graham C, Master LL, Albert DL. 2006. The effect of sample size and species characteristics on performance of different species distribution modeling methods. *Ecography* 29: 773–785.
- Hernández-Livera RA, Llanderal-Cazáres C, Castillo-Márquez LE, Valdez-Carrasco J, Nieto-Hernández R. 2005. Identificación de instares larvales de *Comadia redtenbacheri* (HAMM) (Lepidoptera: Cossidae). *Agrociencia* 39: 539-544.
- Herting B. 1965. A Catalogue of Parasites and Predators of Trinidad. Arthropods Section A. Host or Prey/enemy Vol. VI Lepidoptera part 1 (Microlepidoptera) Commonwealth Agricultural Bureaux, England. 218 p.
- Humber RA. 1997. Fungi: Identification. In: *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Lawrence L. Ed. Academic Press. USA, 153-185 pp.
- Humber RA. 2012. Identification of Entomopathogenic Fungi. In: Lacey, L.A. (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology*, second ed. Academic Press, Inc., California, USA, 151–187 pp.
- Husain M, Alwaneen WS, Mehmood K, Rasool KG, Tufail M, Aldawood AS. 2017. Biological traits of *Cadra cautella* (Lepidoptera: Pyralidae) reared on khodari date fruits under different temperature regimes. *Journal of Economic Entomology* 110: 1923–8.
- Irigaray SCF, Moreno F, Pérez-Moreno I, Marco V. 2006. Larval growth and the effect of temperature on head capsule size in *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae), *Environmental Entomology* 35: 189–193,
- Kalbfleisch S. 2006. Integrated Pest Management of *Hellula undalis* Fabricius on Crucifers in Central Luzon, Philippines, with E, E-11,13- Hexadecadienal as Synthetic Sex Pheromone. des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation. Technische Universität München Department für Pflanzenwissenschaften Lehrstuhl für Gemüsebau. 188 pp.
- Kimura M. 1980. A simple Method for Estimating Evolutionary Rate of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

- La Grotteria J. 2022. Ecoregistros. Registros Ecológicos de la Comunidad. En línea: <https://www.ecoregistros.org/site/index.php>. Fecha de consulta: agosto, 2022.
- Logan JA. 1998. General program for determining instar distributions from headcapsule widths: Example analysis of mountain pine beetle (Coleoptera: Scolytidae). *Environmental Entomology* 27: 332-340.
- López-Martínez V, Sánchez-Martínez G, Pérez-De la O NB, Jiménez-García D, Coleman TW. 2016. Environmental suitability for *Agilus auroguttatus* (Coleoptera: Buprestidae) in Mexico using MaxEnt and database records of four *Quercus* (Fagaceae) species. *Agricultural and Forest Entomology* 18: 409–418.
- Luna A., López-Martínez V, Pérez-De la O N, Jiménez-García D, Robert W. Jones, Castañeda-Vildozola A, Ruiz-Montiel C. 2017. Actual and Potential Distribution of Five Regulated Avocado Pests Across Mexico, Using the Maximum Entropy Algorithm. *Florida Entomologist* 100: 92-100.
- Mewis I, Kleespies RG, Ulrichs C, Schnitzler WH. 2003. First Detection of a Microsporidium in the Crucifer Pest *Hellula undalis* (Lepidoptera: Pyralidae)—A Possible Control Agent? *Biological Control* 26: 202–208.
- Mewis I, Ulrichs C, Schnitzler W.H. 2001. Ovipositionspräferenz des Südeuropäischen Kruziferenzünslers: *Hellula undalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae). *Mitteilungen der deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie* 13, 535-538.
- Mewis I, Ulrichs C, Schnitzler W.H. 2002. The role of glucosinolates and their hydrolysis products in oviposition and host-plant finding by cabbage webworm, *Hellula undalis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 105: 129-139.
- Moneddji AD, Nyamador WS, Amevoin K, Ketoh GK, Glitho IA. 2014. Efficacité d'extraits de Feuilles de Neem *Azadirachta indica* (Sapindale) sur *Plutella xylostella* (Lepidoptera : Plutellidae), *Hellula undalis* (Lepidoptera : Pyralidae) et *Lipaphis erysimi* (Hemiptera : Aphididae) du Chou *Brassica oleracea* (Brassicaceae) dans une approche « Champ Ecole Paysan » au sud du Togo. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 8: 2286-2295.
- Morrone J. 2015. Biogeographical regionalisation of the world: a reappraisal. *Australian Systematic Botany* 28: 81–90.
- iNaturalist. 2022. Academia de Ciencias de California; *Hellula phidilealis*. En línea: <https://www.inaturalist.org/>. Fecha de consulta: agosto, 2022.
- Opoosun OO, Odebiyi JA. 2009. Life Cycle Stages of Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae), Ibadan, Oyo State, Nigeria. *Nigerian Journal of Entomology* 26: 21-27.

- Pappers SM, van Dommelen H, van der Velde G, Ouborg NJ. 2001. Differences in morphology and reproductive traits of *Galerucella nymphaeae* from four host plant species. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 99: 183–191.
- Pérez-De la O N, López-Martínez V, Jiménez-García D, Campos-Figueroa M. 2016. Predicción de la Disponibilidad Ambiental de *Bulia schausi* (Lepidoptera: Noctuidae), una Plaga Potencial de Brócoli en México. *Southwestern Entomologist* 41: 163-170.
- Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231–259.
- Phillips SJ, Dudík M. 2008. Modeling of species distribution with MaxEnt: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography* 31: 161–175.
- Praadepa N, Ramaraju K, Chitra N. 2017. Biology studies of *Melanitis leda* (Linnaeus, 1758) using Dyar’s law. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 5:1886-1890.
- R Core Team. 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Ravan S, Sahebzadeh N. 2015. Effects of abiotic factors and host preference on the biology of the oriental cabbage webworm, *Hellula undalis* Fabricius (Lepidoptera : Pyralidae). *Jordan J. Agric. Sci.* 1: 803-12.
- Razuri V, Hinostroza F. 1974. Biología y comportamiento del gusano del brote de la col *Hellula undalis* Fab. (Lep: Pyralidae). *Revista Peruana de Entomología* 17: 69-73.
- Redovnikovi IR, Gliveti T, Delongai K, Furac, JV. 2008. Glucosinolates and their potential role in plant. *Periodicum Biologorum* 110: 297-309.
- Rehner SA, Buckley E, Infante F, Castillo A, Vega FE. 2006. Phylogenetic Origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana* s.l. Pathogens of the Coffee Berry Borer. *Journal Invertebrate Pathology* 93:11-23.
- Rehner SA, Buckley E. 2005. A *Beauveria* Phylogeny Inferred from Nuclear ITS and EF1-a Sequences: Evidence for Cryptic Diversification and Links to Cordyceps Teleomorphs. *Mycologia* 97: 84-98.
- Rehner SA, Minnis AM, Sung GH, Luangsaard JJ, Devetto L, Humber RA. 2011. Phylogeny and Systematics of the Anamorphic, Entomopathogenic Genus *Beauveria*. *Mycologia* 103: 1055–1073.
- Reiter S, Kuhar TP, Doughty H. 2008. Cabbage Webworm, Lepidoptera, *Hellula rogatalis* (Hulst). Virginia State University.
- Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia DE, Walker AE, Arena ET, Eliceiri KW. 2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 18, 529.

- Shrestha D, Webb ES. 2016. Cabbage webworm, *Hellula rogatalis* (Hulst) (Insecta: Crambidae: Glaphyriinae). EENY-649. University of Florida.
- Shull DR, Stewart RL, Paulson GS. 2010. Application of Dyar's Law to Life Stages of *Sigara mathesoni* (Heteroptera: Corixidae). *Entomological News* 121: 469-474.
- SIAP. 2022. Servicio Información Agroalimentaria y Pecuaria, cierre de la producción agrícola 2019. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. En línea: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. Fecha de consulta: agosto, 2022.
- Sivapragasam A, Aziz AMA. 1990. Cabbage Webworm on Crucifers in Malaysia. Chapter 8, In: *Diamondback Moth and Other Crucifer Pests*. 75-80 pp.
- Sivapragasam A, Chua TH. 1997. Natural Enemies for the Cabbage Webworm, *Hellula undalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Pyralidae) in Malaysia. *Researches on Population Ecology* 39: 3-10.
- Srinivasan R, Hsu YC. 2008. Susceptibility of Major Lepidopterans to δ -endotoxins and a Formulation of *Bacillus thuringiensis* (Bt) on Vegetable Brassicas in Taiwan. *Biocontrol Science and Technology* 18: 935- 939.
- Sugie H, Yase J, Futai K, Shirai Y. 2003. A Sex Attractant of the Cabbage Webworm, *Hellula undalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae). *Applied Entomology and Zoology* 38: 45-48.
- Sukovata L. 2019. A Comparison of three approaches for larval instar separation in insects—a case study of *Dendrolimus pini*. *Insects* 10:384.
- Swets KA. 1988. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 240: 1285-1293.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-9.
- Thompson WR. 1946. A Catalogue of the Parasites and Predators of Insect Pests. Sect. 1. Part 27. Parasites of the Lepidoptera (G-M.). Imperial Parasite Service, Belleville, Canada 385 p.
- Van Proosdij AS, Sosef MSM, Wieringa JJ, Raes N. 2015. Minimum required number of specimen records to develop accurate species distribution models. *Ecography* 38: 1-11.
- WorldClim. 2017. Global Climate Layers, Version 3 (release 3). En línea: <http://www.worldclim.org>. Fechas de acceso: agosto, 2022.