



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO EN FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

SUSCEPTIBILIDAD DE *DUPONCHELIA* *FOVEALIS* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) A DIFERENTES GRUPOS DE ENTOMOPATÓGENOS

MIRIAM ANAID REYES SERRANO

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

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2022



COLEGIO DE POSTGRADUADOS


INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **Susceptibilidad de *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) a diferentes grupos de entomopatógenos**, realizada por la estudiante: **Miriam Anaid Reyes Serrano**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



ARIEL WILBERT GUZMAN FRANCO

ASESORA



MA. TERESA SANTILLÁN GALICIA

ASESORA



RAQUEL ALATORRE ROSAS

ASESOR



FERNANDO TAMAYO MEJÍA

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

SUSCEPTIBILIDAD DE *Duponchelia fovealis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

A DIFERENTES GRUPOS DE ENTOMOPATÓGENOS

Miriam Anaid Reyes Serrano, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2022

RESUMEN

Duponchelia fovealis es un lepidóptero que en su fase larval se alimenta de raíces, flores, yemas y frutos, aumentando el riesgo de pérdidas en los cultivos susceptibles. En México esta plaga se reportó recientemente y su presencia en cultivos de fresa, en la cual la mayoría de su producción es para consumo en fresco, tiene un panorama complicado para su combate. El objetivo de este trabajo fue evaluar la susceptibilidad de diferentes estados de desarrollo de *D. fovealis*, a la infección por entomopatógenos de diferentes grupos. Se seleccionaron productos comerciales de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, y de nematodos *Steinernema feltia*, *S. carpocapsae* y *Heterorhabditis bacteriophora*. Además, se emplearon algunos aislamientos de hongos *Beauveria bassiana*, *B. pseudobassiana*, *Metarhizium anisopliae*, y *Cordyceps fumosorosea*. Todos los patógenos se evaluaron en larvas de 3er estadio, excepto los nematodos que se estudiaron en larvas y pupas. A pesar de que el análisis Probit reveló que algunos productos de *B. thuringiensis* fueron más virulentos, todos los productos evaluados tuvieron alta virulencia contra larvas de *D. fovealis*. En nematodos, la especie *H. bacteriophora* resultó ser la más virulenta en comparación con especies de *Steinernema*. Las larvas de *D. fovealis* resultaron ser la etapa de desarrollo más susceptible a la infección por nematodos en comparación con las pupas. La mortalidad ocasionada por *H. bacteriophora* (200 juveniles infectivos [IJs]) sobre larvas fue entre 80 y 95 %, mientras que en pupas fue entre 25 y 40%. La mayor mortalidad de larvas con hongos entomopatógenos (*M. anisopliae* 25%) fue menor que la ocasionada por bacterias y nematodos. En general, los productos a base de *B. thuringiensis* y el nematodo *H. bacteriophora* fueron los agentes de control biológico con mayor potencial para combatir a *D. fovealis*.

Palabras clave: lepidóptera, patógenos, nematodos, bacterias, hongos.

**SUSCEPTIBILITY OF *Duponchelia fovealis* ZELLER (LEPIDOPTERA:
CRAMBIDAE) TO DIFFERENT ENTOMOPATHOGENS**

**Miriam Anaid Reyes Serrano, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2022**

ABSTRACT

Duponchelia fovealis is a Lepidoptera that in its larval phase feeds on roots, flowers, buds and fruits, increasing the risk of losses in susceptible crops. In Mexico this plague was recently reported and its presence in strawberry crops, in which most of its production is for fresh consumption, has a complicated panorama for its combat. The objective of this work was to evaluate the susceptibility of different stages of development of *D. fovealis* to infection by entomopathogens from different groups. Commercial products of the bacterium *Bacillus thuringiensis*, and nematodes *Steinernema feltia*, *S. carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* were selected. In addition to some isolates of fungi *Beauveria bassiana*, *B. pseudobassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Cordyceps fumosorosea* were used. All pathogens were evaluated in 3rd instar larvae, except nematodes, which were studied in larvae and pupae. Although Probit analysis revealed that some *B. thuringiensis* products were more virulent, all tested products had high virulence against *D. fovealis* larvae. In nematodes, the *H. bacteriophora* species turned out to be the most virulent compared to *Steinernema* species. *D. fovealis* larvae were found to be the most susceptible developmental stage to nematode infection compared to pupae. Mortality caused by *H. bacteriophora* (200 infective juveniles [IJs]) on larvae was between 80 and 95%, while on pupae it was between 25 and 40%. The highest mortality of larvae with entomopathogenic fungi (*M. anisopliae* 25%) was lower than that caused by bacteria and nematodes. In general, products based on *B. thuringiensis* and the nematode *H. bacteriophora* were the biological control agents with the greatest potential to combat *D. fovealis*.

Key words: lepidoptera, pathogens, nematodes, bacteria, fungi.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindar el apoyo económico para la realización de mis estudios de Posgrado.

Al Colegio de Postgraduados (CP) Campus Montecillo por haber dado la oportunidad de continuar con mi formación profesional.

A la Secretaría de Desarrollo Agroalimentario y Rural de Guanajuato, por el financiamiento para el desarrollo de la investigación.

Al Posgrado en Fitosanidad, al área de Entomología y Acarología, por la disponibilidad del uso de sus instalaciones y con sus profesores.

A los profesores que fungieron como mi consejo particular principalmente al Dr. Ariel W. Guzmán por aceptarme como su estudiante y su confianza para la realización de este proyecto.

Dra. Mayte Santillán, por su apoyo y disposición en la elaboración de esta investigación.

Dra. Raquel Alatorre, por recibirme en su laboratorio con los brazos abiertos, sus valiosas observaciones y consejos para mejorar el trabajo.

Dr. Fernando Tamayo por la disposición e interés en la investigación.

A mis compañeros y amigos que conocí en el laboratorio de patología de insectos en especial a M.C. Maribel Rivero por compartir conmigo su conocimiento y experiencia.

DEDICATORIA

A mi esposo **Jesús** por su apoyo incondicional a cada uno de mis sueños, por ser el viento que siempre me impulsa a volar, una vida no me basta para agradecerle a ese ser supremo haberte puesto en mi camino.

A mis hijos **Jesús** y **Joel** por ser el motor que mueve mi vida, los amo infinitamente.

A mi madre **Lulú** por ese amor incondicional que siempre me das.

A mi padre **José** por nunca dejar de creer y confiar en mí.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
INTRODUCCIÓN GENERAL	10
REVISIÓN DE LITERATURA.....	11
Morfología de <i>Fragaria x ananassa</i>	11
Cultivo de fresa en México.....	11
Plagas e insectos benéficos.....	12
Características generales de <i>Duponchelia fovealis</i>	12
Monitoreo de <i>Duponchelia fovealis</i>	13
Combate químico.....	13
Combate biológico	14
<i>Bacillus thuringiensis</i>	14
Nematodos.....	16
Hongos entomopatógenos	18
<i>Beauveria</i>	19
<i>Metarhizium</i>	20
<i>Cordyceps fumosorosea</i>	21
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	22
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos	22

Hipótesis	22
CHAPTER I. SUSCEPTIBILITY OF <i>Duponchelia fovealis</i> ZELLER (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) TO DIFFERENT ENTOMOPATHOGENS.....	23
1.1 ABSTRACT	23
1.2 INTRODUCTION.....	24
1.3 MATERIAL AND METHODS.....	26
1.3.1 <i>Duponchelia fovealis</i> colony	26
1.3.2 Bioassays with <i>Bacillus thuringiensis</i>	27
1.3.3 Data analysis.....	28
1.3.4 Bioassays with entomopathogenic nematodes against larvae and pupae of <i>D fovealis</i>	28
1.3.5 Data analyses.....	30
1.3.6 Assays with entomopathogenic fungi	30
1.4 RESULTS.....	32
1.4.1 Bioassays with <i>Bacillus thuringiensis</i> against larvae of <i>D fovealis</i>	32
1.4.2 Bioassays with entomopathogenic nematodes against larvae and pupae of <i>D fovealis</i>	32
1.4.3 Assays with entomopathogenic fungi	33
1.5 DISCUSSION.....	34
DISCUSIÓN GENERAL	44
CONCLUSIÓN GENERAL	46
LITERATURA CITADA.....	47

LISTA DE CUADROS

- Table 1.** Commercial products of *Bacillus thuringiensis* evaluated against *Duponchelia fovealis* larvae. A.I. = Active ingredient, I.U. = International Units. 39
- Table 2.** Virulence of five *Bacillus thuringiensis* commercial products against *Duponchelia fovealis*. LC₅₀ (mg a.i. mL⁻¹) ± 95% confidence interval (CI). RC = Regression coefficient (slope), SE = Standard error. 40
- Table 3.** Virulence of three entomopathogenic nematode species against *Duponchelia fovealis* larvae. LC₅₀ (IJs larva⁻¹) ± 95% confidence interval (CI). RC = Regression coefficient (slope), SE = Standard error. 41

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1.** Proportion of *Duponchelia fovealis* 3rd instar larvae infected by two doses (100 and 200 IJs) of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae*, *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. Error bars represent 95% confidence intervals back-transformed from the logistic scale 41
- Figure 2.** Proportion of *Duponchelia fovealis* pupae infected by three doses (50, 100 and 200 IJs) of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae*, *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. Error bars represent 95% confidence intervals back-transformed from the logistic scale..... 42
- Figure 3.** Proportion of *Duponchelia fovealis* 3rd instar larvae infected by isolates of *B. bassiana* (Bb), *B. pseudobassiana* (Bp), *M. anisopliae* (Ma) and *C. fumosorosea* (Cf). Error bars represent 95% confidence intervals back-transformed from the logistic scale..... 43

INTRODUCCIÓN GENERAL

Duponchelia fovealis Zeller (Lepidóptera: Crambidae) es un lepidóptero originario del Mediterráneo, que se ha diseminado por el comercio internacional y actualmente ya se localiza en Europa, África, Medio Oriente, parte de norte y sur América. Es una plaga polífaga con más de 38 familias de plantas hospedantes (CABI, 2020). Entre las especies cultivadas de importancia económica están maíz, pepino, chile pimiento, calabaza, jitomate y fresa (Petrucci *et al.*, 2020). En fresa las larvas se alimentan de los tejidos de las hojas, corona y frutos, interrumpen el flujo de la savia, provocan marchitamiento y coloración amarillenta; en infestaciones severas causan la muerte de la planta. En fruto reducen la calidad y el valor comercial, pues además del daño por su alimentación, la exposición de la pulpa puede favorecer el crecimiento microbiano (Zawadneak *et al.*, 2016). Por su biología *D. fovealis* es una plaga importante en Portugal, Italia, Francia, Brasil y Turquía.

En México se realizaron los primeros reportes de *D. fovealis* en algunas parcelas de fresa en Michoacán y Guanajuato hace dos años (Soria-Morales, 2019); se identificaron daños en raíces, hojas, tallos, inflorescencias y frutos (Cruz-Esteban y Rojas, 2021). Esto podría significar riesgos para la producción de fresa en México, su producción ocupa el tercer lugar mundial, en 2019 se produjeron 861,336 toneladas (FAOSTAT, 2019), Los principales estados productores en orden de importancia son Michoacán, Baja California y Guanajuato (SIAP, 2020). Ante el probable riesgo de esta plaga, es indispensable considerar las interacciones biológicas y ecológicas que suceden con los agentes de control biológico disponibles y esta plaga. De esta manera existirá información para poder estructurar propuestas de manejo integrado de la misma

REVISIÓN DE LITERATURA

Morfología de *Fragaria x ananassa*

La fresa es una herbácea con sistema radical fasciculado, compuesto de raíces y raicillas, numerosas hojas originadas en una corona o rizoma muy corta; las flores son blancas con cinco sépalos hendidos, cinco pétalos redondeados y numerosos estambres y pistilos, organizadas en cimas; el fruto es un poliaquenio de sabor dulce y aroma característico. Se propaga por división de la corona o por estolones (SIAP, 2019).

Cultivo de fresa en México

El cultivo requiere entre 15 y 20 °C para su desarrollo, la zona apta para producción está entre 800 y 2,500 msnm, preferentemente en suelos franco-arenosos, ricos en materia orgánica y un pH de 5.5 a 6.5 (SIAP, 2020). Aunque la planta es semiperenne, su producción comercial se explota no más de dos años consecutivos, plantaciones de mayor edad son débiles, con rendimiento bajo y frutas de menor calidad (Arroyo y Hernández, 2021). Los sistemas de producción se clasifican de acuerdo con la tecnificación; los semitecnificados y tecnificados, en comparación con el sistema tradicional, presentan un mayor rendimiento y el precio del producto es más elevado al ofrecer mejor calidad e inocuidad, y aumenta la rentabilidad (León-López *et al.*, 2014). En México, las zonas productoras de fresa proporcionan fuente de empleo para miles de personas, tanto en campo como en la industria debido a la venta de fruta en fresco y de los productos que se generan de ésta (Echánove, 2001).

Plagas e insectos benéficos

En el cultivo se han identificado insectos benéficos de muchos grupos, tales como Coleoptera (Carabidae, Coccinellidae y Melyridae); Diptera (Syrphidae y Tachinidae); Hemiptera (Anthocoridae, Berytidae, Nabidae, Lygaeidae y Reduviidae); Neuroptera (Chrysopidae), y Thysanoptera (Thripidae) (Salas-Araiza *et al.*, 2014). La lista de insectos plaga también es larga, entre los más importantes se puede señalar a: *Tetranychus urticae* “araña roja”, *Lygus hesperus* “chinche ligus”, *Phyllophaga spp.* “gallina ciega”, *Spodoptera frugiperda* “gusano cogollero”, *Helicoverpa zea* “gusano del fruto”, *Frankliniella occidentalis* “trips”, y *Chaetosiphon fragaefolii*, *Aphis gossypii* y *Macrosiphum euphorbiae* “pulgones” (León *et al.*, 2018) y *Duponchelia fovealis*, que se ha reportado recientemente en México (Cruz-Esteban y Rojas, 2021).

Características generales de *Duponchelia fovealis*

Duponchelia fovealis se desarrolla en un promedio de 47 días a 20 °C. Los huevos presentan un tamaño de 0.5 x 0.7 mm, color blanquecino, pero a medida que se desarrollan se tornan a color rojo a marrón (Stocks y Hodges, 2011). Las larvas pueden llegar a medir de 17 a 30 mm, se desarrollan aproximadamente en cuatro semanas; la cabeza es oscura, el cuerpo color blanco cremoso a marrón claro con manchas distintivas marrón grisáceo distribuidas en todo el cuerpo, en cada mancha surge una seta pequeña. Se alimentan de hojas, flores, tallos, pero en ataques severos, devoran todo el follaje dejando únicamente el talluelo (Araujo *et al.*, 2020). Las pupas generalmente son de color amarillo a marrón, requieren de una a dos semanas para su desarrollo. Los adultos son de aproximadamente 12 mm de largo, y una envergadura

alar de 20 mm, las alas delanteras son marrones, con dos líneas transversales y un punto en la región central hacia el ápice, las posteriores son marrones, con una delgada línea ondulada a lo largo del centro; generalmente viven como adultos de una a dos semanas (Stocks y Hodges, 2011). Durante este periodo, las hembras ponen hasta 200 huevos (Stocks y Hodges, 2011). En climas cálidos hay dos generaciones por año, la primera emerge en primavera (abril a mayo) y la segunda a finales de verano. Los adultos son buenos voladores y pueden dispersarse hasta 100 km (Stocks y Hodges, 2011).

Monitoreo de *Duponchelia fovealis*

El monitoreo de adultos (machos) se basa en el uso de trampas con feromonas sexuales comerciales, compuestas de una mezcla terciaria de (E)-13-octadecenal (E13-18: Ald), (Z) -13-octadecenal (Z13-18: Ald) y (Z) -11-hexadecenal (Z11-16: Ald) en una proporción de 10: 1: 0.1, respectivamente. Las trampas se sitúan a 0.5 m del suelo en estacas separadas por 15 m (Cruz-Esteban y Rojas, 2021). Además del monitoreo, para el seguimiento de la plaga, es necesario buscar los daños que producen como la defoliación, túneles, marchitez o colapso del tallo (Stocks y Hodges, 2011).

Combate químico

Entre los plaguicidas probados para su combate se encuentran: spinosad, bifentrina, fluvalinato, deltametrina, fenvalerato, acefato y lambda-cialotrina (Bonsignore y Vacante, 2010); imidacloprid, metomil, etoprop, emamectina, permetrina, clorantraniliprol y azadiractina, los cuales se aplican en los primeros estadios larvales (Stocks y Hodges, 2011).

Combate biológico

En Brasil se realizaron evaluaciones con especies de *Trichogramma* sobre huevos de *D. fovealis*, y *T. galloi* y *T. pretiosum* fueron especies con potencial para parasitar los huevos, pero con marcada preferencia por los huevos de menor edad (24-48 h) (Pereira *et al.*, 2018).

Bacillus thuringiensis

Bacillus thuringiensis (Bt) es un miembro del grupo *Bacillus cereus*, bacterias del suelo gram positivas, formadoras de esporas (Bravo *et al.*, 2005), su ciclo de vida presenta dos fases principales: crecimiento vegetativo y esporulación, en la primera las bacterias se duplican por bipartición y en la esporulación, se lleva a cabo la diferenciación de bacteria a espora (Bravo y Soberón, 2007), los cuerpos paraesporales son en forma de cristales de naturaleza proteica y propiedades insecticidas (Fernández y Vega, 2002: Bravo y Soberón, 2007), pueden ser de forma bipiramidal, romboide, cuadrada o amorfa y su toxicidad es muy variada, la cual depende del tipo de cristal (Fernández y Vega, 2002).

Los cristales se componen predominantemente de uno o más proteínas (Cry y Cyt); las proteínas Cry son una inclusión paraesporal (cristal) de Bt que exhibe algún efecto tóxico a un organismo blanco o a cualquier proteína que tenga una secuencia similar a una proteína Cry conocida. Una proteína Cyt se concreta como una inclusión paraesporal (cristal) de Bt que exhibe actividad hemolítica o cualquier proteína que tenga una secuencia similar con una proteína Cyt conocida (Bravo y Soberón, 2007). Estas toxinas son altamente específicas para su insecto objetivo, las proteínas Cry son tóxicas

específicamente para los órdenes Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera y otros invertebrados como los nematodos. Las proteínas Cyt se encuentran principalmente en cepas de Bt activas contra Diptera (Bravo y Soberón 2007). Las toxinas se insertan en la membrana plasmática de las células intestinales formando un poro lítico o lesión (Fernández y Vega, 2002; Soberón y Bravo, 2007), que conduce a una variación en la permeabilidad, alterando el transporte de los iones de potasio, lo cual trae como consecuencia la lisis celular, disrupción de la integridad del intestino y la muerte del insecto. Al multiplicarse las esporas bacterianas en la hemolinfa, provocan una septicemia que incrementa el efecto de las toxinas (Fernández y Vega, 2002). Por ello Bt es una alternativa viable para el control de insectos plaga en la agricultura y de importantes vectores de enfermedades humanas (Bravo *et al.*, 2005).

Las primeras formulaciones de Bt se comercializaron hace más de 30 años, como Dipel y Thuricide, y se siguen utilizando aún hoy en día; estas formulaciones están basadas en la cepa HD1 de Bt var. kurstaki. El cuerpo paraesporal de la cepa HD1 consta de cuatro proteínas Cry: CryIAa, CryI Ab, CryI Ac y Cry2A. Estas varían en su espectro de acción y toxicidad específica. En combinación dan a este aislado un amplio espectro de actividad contra una amplia gama de insectos (Federici, 1998). Los síntomas que se observan en las larvas susceptibles después de ingerir los cristales y esporas son dificultad de la ingestión, parálisis del intestino, parálisis total y finalmente la muerte (Bravo y Soberón, 2007).

Se han realizado también ensayos con productos comerciales de *Bacillus thuringiensis*, como Agree® (subespecie aizawai) y Dipel® (subespecie kurstaki), los cuales han sido eficientes para el manejo de larvas de *D. fovealis*. Los resultados de

patogenicidad y virulencia de ambos formulados lograron una CL50 con dosis de 1.74×10^5 y 8.86×10^5 , respectivamente (Petrucci *et al.*, 2020).

Nematodos

Los nematodos entomopatógenos son parásitos facultativos u obligados que pueden causar a sus huéspedes esterilidad, afectar la fecundidad, longevidad y actividad de vuelo, retraso en el desarrollo, aberraciones morfológicas, y en algunos casos, ocasionan una rápida mortalidad (Vashist *et al.*, 2013). Las dos familias más importantes y estudiadas son Steinernematidae y Heterorhabditidae, patógenos obligados de insectos en la naturaleza. La aplicación exitosa de estas familias como agentes de control biológico se atribuye en parte a su simbiosis con bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, que se transportan en el intestino de juveniles infectivos (JI) de vida libre de *Steinernema* y *Heterorhabditis*, respectivamente (Renn, 1998; Forst y Clarke, 2002). Una diferencia importante entre los esteinernemátidos y heterorabdítidos es que todas menos una especie en el primer grupo presentan una reproducción anfimictica, mientras que las especies heterorabdítidos son hermafroditas en la primera generación, pero anfimictica a partir de la segunda generación. De este modo, los esteinernemátidos requieren un macho y una hembra infecciosos para producir progenie en un huésped, mientras que los heterorabdítidos solo necesitan un juvenil infeccioso para penetrar a un huésped y el hermafrodita resultante adulto es autofértil (Hazir *et al.*, 2003).

En el complejo nematodo-bacteria, el nematodo depende de la bacteria para matar a su insecto hospedero, creando un entorno adecuado para su desarrollo al producir antibióticos que suprimen la competencia secundaria microorganismos (Vashisth *et al.*,

2013). El juvenil infeccioso infecta al huésped a través de aberturas (boca, espiráculos, ano) o áreas delgadas de la cutícula del huésped (común en heterorabdítidos) (Kaya, 1990) y penetra en el hemocele del huésped, luego libera la bacteria a través del ano en esteirnelemátidos, o a través de la boca en heterorabdítidos. (Hazir *et al.*, 2003). La bacteria prolifera en el hemocele y produce toxinas que matan al insecto, enzimas que degradan los tejidos, antibióticos que preservan el cadáver del ataque de otros microorganismos (Burnell y Stock, 2000). El nematodo inicia su desarrollo, alimentándose de las células bacterianas y los tejidos del huésped que han sido metabolizado por la bacteria y tiene de una a tres generaciones, dependiendo del tamaño del huésped, la comida y los recursos disponibles en el anfitrión, una vez que se agotan, se produce una nueva generación de juveniles infecciosos que emergen del cadáver huésped al suelo para buscar nuevos hospederos (Hazir *et al.*, 2003)

En el laboratorio, la mayoría de los nematodos entomopatógenos infectan una variedad de insectos donde el contacto con el huésped es determinado, las condiciones ambientales son óptimas y no existen barreras ecológicas o conductuales a la infección. En el campo, los nematodos entomopatógenos atacan un rango de huéspedes significativamente más estrecho que en el laboratorio (Hazir *et al.*, 2003). Resultando como excelentes agentes de biocontrol de plagas de insectos que habitan en el suelo, dotados de muchas ventajas que incluyen capacidad de búsqueda del hospedero, alta virulencia, facilidad de producción, facilidad de aplicación, seguridad de los mamíferos y excepción del registro en muchos países. Sin embargo, la eficacia de estos nematodos contra plagas de insectos es variada, particularmente en el ambiente del suelo (Vashisth *et al.*, 2013). Entre otros factores importantes que influyen en la actividad de los

nematodos es la temperatura y la humedad, ya que estos afectan su movilidad, infectividad, desarrollo y reproducción (Kaya, 1990).

Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos poseen un gran potencial como agentes controladores, componiendo un grupo de más de 750 especies, diseminados en el ambiente y provocando infecciones fungosas a poblaciones de artrópodos (Pucheta-Diaz *et al.*, 2006). Los hongos son el único grupo de entomopatógenos que puede colonizar a sus huéspedes por contacto y adhesión de las esporas a diferentes partes de su cuerpo (partes bucales, membranas intersegmentales o espiráculos) (Alean, 2003). El proceso se inicia cuando la spora o conidio se adhiere a la cutícula del insecto; luego se produce un tubo germinativo y con el apresorio se fija en la cutícula, con el tubo germinativo o haustorio (hifa de penetración) se da la penetración al interior del cuerpo del insecto, en la que participa un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por la hifa, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula (García *et al.*, 2008). El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan descomposición del tejido en la zona de penetración. Después de la penetración, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, colonizando completamente y a partir de la cual se forman pequeñas colonias y estructuras del hongo, lo que corresponde a la fase final de la enfermedad del insecto (Monzón, 2001).

El ambiente afecta la biología de los hongos entomopatógenos (Pucheta-Diaz *et al.*, 2006). Algunos factores abióticos que afectan la viabilidad y persistencia son la

temperatura, humedad relativa, lluvia y radiación ultravioleta (Ignoffo, 1992; Tanada y Kaya, 1993). El huésped es un factor biótico importante que afecta la propagación, dispersión y persistencia, mismo que se relaciona con los nutrientes presentes, y la etapa de desarrollo más susceptible a los hongos entomopatógenos (Inglis *et al.*, 2001).

Entre los géneros más importantes están: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium* (López-Llorca y Jansson, 2001), mientras que para la FAO (2003), los géneros de importancia son *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Rhizopus* y *Fusarium* (Motta-Delgado y Murcia-Ordoñez, 2011).

Beauveria

El género *Beauveria* está compuesto por varias especies: *B. bassiana*, *B. brongniarti*, *B. tenella*, *B. amorpha* y *B. velata*; sin embargo, las más frecuentemente estudiadas son *B. bassiana* y *B. brongniartii* (Alean Carreño, 2003). Ataca a más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes, incluyendo plagas de gran importancia agrícola, entre las que están la broca del café, la palomilla del repollo y el picudo del plátano (Monzón, 2001).

La colonia de *Beauveria* en medio papa dextrosa agar (PDA) a los 14 días es algodonosa a polvorienta, blanca y a medida que va pasando el tiempo se vuelve amarillenta y cremosa. El revés es de color rojizo al centro y amarillento alrededor (Gonzales *et al.*, 2012). Se caracteriza por presentar conidióforos sencillos, aproximadamente de 1 a 2 μm de diámetro, provenientes de hifas septadas de las que

nacen células conidiógenas. Estas células conidiógenas se encuentran formando grupos compactos grandes y a veces solitarios, en forma de botella de 3 a 6 μm de longitud y 3 a 5 μm de diámetro. En algunos casos estas células se ramifican formando células secundarias. Al final de las células se forma un raquis que sostienen a los conidios. El raquis tiene una longitud de 20 μm y 1 μm de diámetro, es denticulado y sostiene una espora en cada dentículo. Conidios hialinos, globosos a ovals de 2 a 3 x 2 a 2.3 μm que se insertan sucesivamente en el raquis en forma opuesta (Tanada y Kaya, 1993; Humbert, 1997; Cañedo, 2004).

Metarhizium

Al principio se distinguieron sólo tres especies como *M. album*, *M. anisopliae* y *M. flavoviride*, actualmente se conocen 30 especies (tanto en estado asexual como sexual). *Metarhizium* es un género extremadamente diverso y la diversidad suele ser asociada a varios factores selectivos tipo de hábitat, condiciones climáticas, asociaciones específicas con plantas e insectos huéspedes (Brunner-Mendoza *et al.*, 2019). En condiciones naturales, la persistencia y movilidad de las conidias de *Metarhizium* está sujeta a una gran variedad de factores bióticos y abióticos (temperatura, humedad, radiación solar, pH, microorganismos del suelo, plantas e invertebrados) (Lacey *et al.*, 2015).

M. anisopliae ataca más de 200 especies de insectos y ácaros de diversos géneros, en los órdenes Orthoptera, Hemiptera, Lepidoptera, Dermaptera, Hymenoptera y Coleoptera, entre otros (Zimmermann, 1993). El medio de cultivo *M. anisopliae* presenta un crecimiento radial, la coloración de la colonia generalmente es verde oliva,

con aspecto algodonoso, de textura variable y superficie plana (Guerrero et al., 1999). Las hifas son cenocíticas, lisas. Los conidios poseen extremos redondeados, lisos y agrupados en cadenas regulares debido a la agregación por clonación de los conidios; su tamaño es de 5.2 a 7.7 x 1.4 a 3.1 μm (Guerrero et al., 1999; Domsch *et al.*, 1993).

Cordyceps fumosorosea

Cordyceps fumosorosea (Wize) (anteriormente *Isaria fumosorosea* [Kepler *et al.* 2017]) (Hypocreales: Cordycipitaceae) han sido ampliamente explotados como agentes de control de una amplia gama de plagas agrícolas económicamente importantes, como moscas blancas (Hussein *et al.* 2013). Los hongos hipocreales son capaces de producir blastosporas de manera rápida, que son vegetativas, únicas. Células similares a levaduras de paredes delgadas con propiedades hidrofílicas. Estas células han demostrado ser altamente infecciosas para insectos y ácaros, elevando así las perspectivas monetarias, benéficas y su importancia en la agricultura (Jaronski y Jackson 2012; Jaronski y Mascarín 2016).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

Evaluar la susceptibilidad *D. fovealis* a la infección de diferentes grupos de entomopatógenos.

Objetivos específicos

Evaluar los niveles de infección que ocasionan productos comerciales de *Bacillus thuringiensis* en larvas de *D. fovealis*.

Evaluar los niveles de infección que ocasionan productos comerciales de nematodos de *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema carpocapsae* y *Steinernema feltiae* en larvas y pupas de *D. fovealis*.

Evaluar los niveles de infección que ocasionan aislamientos de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* en larvas de *D. fovealis*.

Hipótesis

D. fovealis tiene susceptibilidad al menos a un grupo de entomopatógenos.

CHAPTER I. SUSCEPTIBILITY OF *Duponchelia fovealis* ZELLER (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) TO DIFFERENT ENTOMOPATHOGENS

1.1 ABSTRACT

Duponchelia fovealis Zeller, is currently considered one of the most important emergent pests of a range of crops in the Americas including strawberry. This pest is common in Europe, but its presence in the Americas, particularly Brazil and Mexico, has been only recently reported. Control of this pest is mainly by synthetic pesticides although efforts to develop biological control methods are underway. Since its recent arrival in Mexico interest in the potential of different entomopathogens for the control of *D. fovealis* has increased. Here we evaluated commercial products of *Bacillus thuringiensis*; the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema feltiae*, *S. carpocapsae*; and different isolates of the entomopathogenic fungal species, *Beauveria bassiana*, *B. pseudobassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Cordyceps fumosorosea*. All pathogens were evaluated against 3rd instar larvae, except nematodes which were evaluated against both larvae and pupae. Although analysis suggested that some *B. thuringiensis* products were the most virulent, all products evaluated showed high virulence against *D. fovealis* larvae. Amongst nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* was the most virulent and larvae were more susceptible to nematodes than pupae; larval mortalities at the highest dose evaluated (200 infective juveniles [IJs]) were between 80 and 95 %, while for pupae it was between 25 and 40%. Mortality of larvae due to entomopathogenic fungi was lower than due to the other entomopathogens; the highest mortality observed was 25 % caused by an *M. anisopliae* isolate, although this was not statistically different to other fungal isolates. Overall, our results showed that biological

control products based on *B. thuringiensis* or the nematode *H. bacteriophora* have the greatest potential. However, we consider that *H. bacteriophora* could be more convenient as it infects both larvae and pupae.

Keywords: Developmental stage, Probit analysis, differential susceptibility, microbial control

1.2 INTRODUCTION

Duponchelia fovealis Zeller (Lepidoptera: Crambidae) is an insect pest originating in the Mediterranean area; in 2020 it was known to be distributed throughout Europe, Africa, the Middle East, and the Americas (CABI, 2020). It is a polyphagous pest reported feeding on at least 38 families of plants (Petrucci *et al.*, 2020). Host plants that are economically important crops include maize, cucumber, green pepper, squash, tomatillo and strawberry. In strawberry, *D. fovealis* is considered as an important pest in Italy, France (Bonsignore & Vacante, 2010), Turkey (Efil, Özgür & Figen 2014), Portugal (Franco & Baptista, 2010) and Brazil (Zawadneak *et al.*, 2016). Recently this pest has been reported in Mexico (Cruz-Esteban & Rojas, 2021) which produces 658,000 tonnes of strawberry annually and is considered as the third largest worldwide producer (mainly in the states of Baja California, Michoacán and Guanajuato) (SENASICA, 2018).

Duponchelia fovealis feeds on roots, flowers, buds and fruits of strawberry, and the last larval instar can penetrate the stems causing major damage as entry points also allow plant pathogens to invade (Zawadneak *et al.*, 2016). In severe infestations, larvae can consume all foliage leaving only stems (Araujo *et al.*, 2020). Larvae are normally found on the abaxial side of leaves close to the ground making them difficult to control using

pesticide sprays (Bethke & Vander Mey, 2015). Not only can frequent pesticide applications in strawberry lead to resistance and environmental contamination, but they also represent a serious hazard for humans as strawberries are consumed fresh (Araujo *et al.*, 2020).

Biological control, specifically microbial control of pests, is an important strategy whereby entomopathogenic microorganisms are used to cause infections and eventually death of insect pests, without causing damage to plants or humans (Lacey 2017). However, it is necessary to study the pathogenicity and virulence of a range of microorganisms to find those with the greatest potential for use in the field; it is particularly important to exploit the ability of each group of pathogens to target different developmental stages of the target pest. There are few reports of natural enemies of *D. fovealis*, but those that have been reported include larval parasitoids from the genus *Apanteles* (Hymenoptera: Braconidae), the predatory insect *Hyaliodocoris insignis* Stal (Heteroptera: Miridae), the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* Balsamo (Hypocreales: Cordycipitaceae) (Zawadneak *et al.*, 2016; Poitevin, Porsani, Poltronieri, Zawadneak & Pimentel, 2018; Araujo *et al.*, 2020) and the bacterium *Bacillus thuringiensis* Berliner (Petrucci *et al.*, 2020).

Duponchelia fovealis larvae are normally found feeding on leaves, stems and fruits of strawberry (Zawadneak *et al.*, 2016); pupae can be found beneath leaves close to the ground or at the edge of pots in greenhouse plants (Bethke & Vander Mey, 2015). The fact that different developmental stages can be found at different sites in the strawberry plant, suggest different pathogens groups could be used for their control, depending on

the instar targeted. Here we evaluated three groups of entomopathogens for their capacity to infect *D. fovealis*: commercial products of the bacterium *B. thuringiensis*; the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* Filipjev, *S. carpocapsae* Weiser and *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar; and different isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *B. pseudobassiana* S.A. Rehner & Humber, *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin, and *Cordyceps fumosorosea* (Wize) Kepler, B. Shrestha & Spatafora. Our results will help to select those entomopathogens with the greatest potential for biological control of *D. fovealis*.

1.3 MATERIAL AND METHODS

1.3.1 *Duponchelia fovealis* colony

To establish a colony, larvae were collected from strawberry crops in the municipalities of 'Jerecuaro' and 'Jaral del Progreso', Guanajuato, Mexico. Groups of field-collected larvae were placed in plastic boxes (20 × 15 × 10 cm) with artificial diet (Southland Products Inc., Arkansas 71653), developed for *Diatraea saccharalis* Fabricius and prepared following the manufacturer's instructions. Plastic boxes were sealed with a lid that had a 5 × 5 cm orifice covered with anti-insect mesh to provide ventilation. Larvae were incubated at 25 °C and 70% with a 16:8 light regime until they pupated. Groups of 20 pupae were then placed in new plastic boxes until adult emergence. Adults were fed with a 15% honey solution provided on cotton wool, and allowed to oviposit for five days and then removed. Once larvae began to hatch in the plastic boxes they were transferred, in groups of 20 larvae, to small plastic cups of 25 mL volume with a lid, containing 2 mL of diet, and were maintained until they reached second instar. Second instar larvae were

transferred individually to wells of 128-well plastic trays (BAW128, Frontier Agricultural Sciences Inc.), each well containing 1 ml of diet. Trays were covered with a transparent plastic lid (BACV16, Frontier Agricultural Sciences Inc.) with a central perforation in each well to allow ventilation. Larvae were maintained under these conditions until pupation and then treated as previously describe. The colony was maintained at the conditions described above. Experiments were done using the third generation of insects obtained under laboratory conditions.

1.3.2 Bioassays with *Bacillus thuringiensis*

The virulence of five products were compared against third instar larvae of *D. fovealis*. The procedure was the same for all the products (Table 1). Between seven and eight concentrations of each product, expressed as mg of active ingredient per ml (mg a.i./mL), were produced in 0.03% Tween 80. Replicate groups of 12 third instar larvae were exposed to different Bt concentrations using the following methodology. Cell culture plates comprised of 12 wells were used (COSTAR®, Corning Inc. NY, USA). In each well, 2 mL of diet were allowed to solidify, then 50 µL of the designated Bt concentration was deposited in each well and maintained in a laminar flow cabinet to dry for 30 min. Different 12-well plates were used for each concentration. Once the Bt suspension had dried, one 3rd instar larva was introduced to each well using a fine camel-hair brush. For the control treatment, 50 µL of 0.03% Tween 80 was added to the diet rather than Bt. All treatments were incubated at 25 °C, 60% RH and a 16:8 light regime. Mortality was recorded every 24 h for 7 days.

1.3.3 Data analysis

The Bt experiment was done using a completely randomized design where all Bt products were evaluated on the same day, and the complete experiment was repeated on three different occasions. Data were analysed using a generalized linear model (GLM) with binomial error and Probit link, assuming data followed a binomial distribution with sample sizes equal to the number of larvae treated. A parallel model analysis was done where first a single line was fitted to all the data points. Second, intercepts were allowed to vary amongst data points and third, slopes were also allowed to vary amongst data points. The best model was chosen based on partial *F*-tests. Concentrations causing 50% infection (LC₅₀) of larvae were estimated from best fit models, and confidence intervals (CI) for each LC₅₀ were calculated according to Fieller's theorem (Fieller, 1944). As data showed greater variation than expected under the binomial distribution, the ratio of the treatment mean deviance to the residual mean deviance was tested against the *F*-distribution, rather than the usual treatment deviance against the χ^2 distribution. Data from the control treatment was not considered for the analysis as no mortality was recorded. All the statistical analyses were done using the statistical package GenStat v. 8.0 (Payne, Murray, Harding, Baird & Soutar, 2005).

1.3.4 Bioassays with entomopathogenic nematodes against larvae and pupae of *D. fovealis*

We evaluated three nematode species, *Steinernema feltiae* (trade name: ENTONEM®), *S. carpocapsae* (trade name: CAPSANEM®) and *Heterorhabditis bacteriophora* (trade name: LARVANEM®) (Koppert Mexico, El Marquez, Queretaro, Mexico).

Nematode assays against larvae were done in two stages. First, two doses of 100 and 200 infective juveniles (IJ) were evaluated against 3rd instar larvae of *D. fovealis*, which helped determine their general pathogenicity. The procedure was the same for all three nematode species and IJs doses. Products containing IJs (10 g) were each suspended in 50 mL of 0.03% Tween 80, and then serially diluted (1:10) until the number of nematodes could be estimated accurately using a stereoscopic microscope and adjusted to provide the two required concentrations. The assay was done in 12-well cell culture plates as in the Bt experiment. Two circular pieces (1.5 cm diameter) of filter paper were placed at the bottom of each well, and the IJs deposited in 200 µL of sterile 0.03% of Tween 80. One 3rd instar larva was then placed in each well and fed a cube of diet (0.5 × 0.5 × 0.5 cm). Mortality was recorded every 24 h for 10 days and the diet cube replaced every 24 h. Dead larvae were removed from the cell culture plates and allocated separately to 5 cm diameter Petri dishes with damp filter paper and incubated for a further 10 days to allow nematode reproduction and confirm infection. In the control treatments, larvae were exposed only to 0.03% Tween 80. All treatments were incubated at the same conditions as described previously.

In the second experiment a series of doses from 5, 15, 50, 100 and 200 IJs per larva were evaluated. The procedure was as described above; IJs doses were deposited in wells within 200 µL of 0.03% Tween 80. Mortality was recorded every 24 h for 10 days and infection confirmation as described previously. A third experiment experiment with pupae was the same as described for larvae except that only three doses were evaluated: 50, 100 and 200 IJs per pupa. All other methods and incubation conditions were the same as in the experiments with larvae.

1.3.5 Data analyses

All nematode experiments were done using a completely randomized design, where all treatments were done the same day, and the each experiment was repeated on three occasions. Mortality data from experiments with two IJs doses against larvae, and three IJs doses against pupae were analysed by logistic regression, to assess the effect of nematode species and dose of IJs as main factors, and their interaction in the mortality of larvae and pupae. When data showed greater variation than expected under the binomial distribution, the ratio of the treatment mean deviance to the residual mean deviance, was tested against the F -distribution, rather than the usual treatment deviance against the χ^2 distribution. For the dose-response experiment against larvae, the same Probit analysis as described for the Bt experiment was used. In all experiments, data from control treatments were not included in the analysis as no mortality was recorded.

1.3.6 Assays with entomopathogenic fungi

Eight isolates were evaluated: three isolates of *Beauveria bassiana* (Bb88, Ap9 and Ap3); two isolates of *B. pseudobassiana* (Gp9 and Gp10); two isolates of *Metarhizium anisopliae* (Ma65 and Ma129); and one isolate of *Cordyceps fumosorosea* (Pfr4). With the exception of the *C. fumosorosea* isolate, all isolates were grown on Sabouraud dextrose agar (SDA) at 25 °C in darkness for 15 days; *C. fumosorosea* was incubated at the same temperature but for 10 days in darkness followed by 5 days in a 16:8 light: dark regime to promote sporulation. After the incubation period, conidia of all isolates (five Petri dishes of each *B. bassiana*, *B. pseudobassiana* and *C. fumosorosea* isolate; and eight dishes of each *M. anisopliae* isolate) were scraped from agar plates using a sterile scalpel

and deposited in sterile 50 mL centrifuge tubes (NEPTUNE™, Continental Lab Products Inc. San Diego Cal, USA) containing 15 mL of sterile 0.03% Tween 80 solution. Centrifuge tubes were vortexed at maximum speed for five minutes to separate conidia from mycelia. The contents of the tubes were filtered into new centrifuge tubes through a double sterile cloth. Conidial concentrations were estimated using a haemocytometer and adjusted to produce 10 mL of a 1×10^8 conidia mL⁻¹ suspension for each isolate, which was maintained at 4 °C for no more than 18 hours before experiments. Germination tests were done as described by Inglis, Enkerli & Goettel (2012); viability was always above 95%.

Groups of 12 3rd-instar larvae were sprayed with 10 mL of conidial suspensions of each isolate using an acrylic chamber (50×50×50 cm) fitted with an air atomizing nozzle (Spraying Systems Co. Cat. 1/4-J-SS-S, Wheaton, IL, USA) attached to an air compressor at 20 psi. For spraying, larvae were placed in the bottom of a glass Petri dish (15 cm diameter) and maintained at 4 °C for 5 mins prior to spraying to reduce larval movement; between isolates, the spray chamber and the nozzle were cleaned first by spraying 5 mL of 70% ethanol, 5 ml of 0.03% Tween 80, 5 ml of 1% sodium hypochlorite and then two rinses with 5 mL of sterile distilled water. A control treatment was included in which larvae were sprayed with 10 mL of 0.03% Tween 80 solution. After spraying, treated larvae were removed from the chamber and placed individually in 12-well cell culture plates as described previously, with a 0.5×0.5×0.5 cm diet cube. Treatments were incubated at 25 °C, 60% RH in a 16:8 light:dark regime. Mortality was recorded every 24 h for 10 days and on each occasion, 100 µL of distilled water was added to the filter paper in the bottom of each well and the diet replaced. Dead larvae were removed and placed

in 5-cm diameter Petri dishes with damp filter paper to encourage sporulation and confirm infection.

The experiment was done using a completely randomize design, where all treatments were applied at the same day, and the complete experiment was repeated on four occasions. Mortality data was analysed using logistic regression as described above, to compare amongst fungal treatments. The control treatment was not included in the analysis as no mortality was recorded.

1.4 RESULTS

1.4.1 Bioassays with *Bacillus thuringiensis* against larvae of *D. fovealis*

The parallel model analysis showed significant differences amongst intercepts ($F_{4, 107}=20.82$, $P<0.001$) and slopes ($F_{4, 107}=3.94$, $P=0.005$), suggesting differences in virulence (Table 2). The lowest LC_{50} value was obtained by the product PHC Condor®, suggesting this product was the most virulent; Agree® 50 WDG was the least virulent with the largest LC_{50} value (Table 2). PHC Condor® was nine times more virulent than Agree® 50 WDG.

1.4.2 Bioassays with entomopathogenic nematodes against larvae and pupae of *D. fovealis*

In the experiment where only two doses of IJs were tested against 3rd larvae significant differences were found amongst the three nematode species ($\chi^2_2=9.799$, $P=0.007$) and between the two IJs doses evaluated ($\chi^2_1=16.377$, $P<0.001$), but no interaction between these two factors ($\chi^2_2=1.1069$, $P=0.575$). All three species caused mortalities above 80%

with the higher dose (200 IJs), but with the 100 IJs dose mortality was between 50 and 80% (Fig 1). Overall, *H. bacteriophora* caused the greatest mortality in larvae compared with the other species, which was more evident at the lower dose (Fig 1).

When data on mortality from the dose response assay against *D. fovealis* larvae was evaluated, significant differences were found amongst the intercepts ($F_{2, 39} = 12.32$, $P < 0.001$), but not amongst slopes ($F_{2, 39} = 1.75$, $P = 0.187$), suggesting differences in virulence amongst the three nematode species. The most virulent species against *D. fovealis* larvae was *H. bacteriophora*, with the lowest LC_{50} (21.56 IJs larva⁻¹) followed by *S. feltiae* and *S. carpocapsae* as the least virulent species (Table 3).

When three doses of IJs of the three nematode species were evaluated against *D. fovealis* pupae, no differences were found amongst the three nematode species ($F_{2, 18} = 1.93$, $P = 0.174$). However, differences were found amongst the three doses evaluated ($F_{2, 18} = 5.88$, $P = 0.011$), and this was regardless of nematode species ($F_{4, 18} = 0.14$, $P = 0.964$). The highest pupal mortality due to nematode infection (40%) was achieved by *H. bacteriophora* at the highest dose of IJs (Fig. 2).

1.4.3 Assays with entomopathogenic fungi

Mortality due to fungal infection caused by the eight isolates was similar ($\chi^2_7 = 7.7029$, $P = 0.360$) and never exceeded 25 % (Fig. 3). Although some differences could be observed amongst isolates (Fig. 3), these differences were not statistically significant.

1.5 DISCUSSION

This is the first report of different groups of entomopathogens infecting and causing mortality in *D. fovealis*. We consider our information will help strawberry growers select potential biological control agents as part of an integrated control strategy for this pest. Products based on *B. thuringiensis* have been used successfully against many insect pests. Part of its success is due to its fast action when infecting its host (Lacey et al., 2015). We found mortality in 3rd instar larvae was achieved 72 hours after *D. fovealis* larvae ingested contaminated diet; it is likely that faster and greater mortality could be achieved in earlier instars as reported by Petrucci *et al.*, (2020) when evaluating Dipel® and Agree® against different instars of *D. fovealis* larvae. We evaluated five products, including Dipel® and Xentari®, which are amongst the most commonly used biopesticides for control of pests in vegetable production (Lacey *et al.*, 2015). Despite these two products showing high virulence against *D. fovealis* larvae, other products we evaluated were more virulent. All the products evaluated were comprised of more than one *B. thuringiensis* subspecies and/or strain, and each strain contains between four and six Cry proteins (Table 1); there are no specific Cry proteins related to *D. fovealis* that can explain the differences in virulence observed, but it is likely that these differences are related to the specific diversity of Cry proteins expressed by *B. thuringiensis* strains present (Gill, 1995). Based on our results for *B. thuringiensis* products we cannot recommend any product in particular, but we can say that despite differences in virulence, all products tested achieved adequate mortalities; with equivalent efficacy, growers could select any of these products based on cost, local availability, or compatibility with conventional application equipment.

Our results with entomopathogenic nematodes represent the first report of these microorganisms infecting *D. fovealis* larvae and pupae. Against larvae, all three nematode species evaluated showed high virulence (Fig. 2), especially at 200 IJs per larva where all species showed similar results. Interestingly, at lower doses, *H. bacteriophora* achieved the highest mortality (Fig. 2) compared with the *Steinernema* species and, more importantly, similar mortalities were achieved by *H. bacteriophora* at either 200 or 100 IJs per larva (Fig. 2); this is why this species had the greatest virulence in the dose-response assays (Table 3). These nematode species have a mutualistic association with bacteria in the genera *Xenorhabdus* spp. (with *Steinernema*) and *Photorhabdus* spp. (with *Heterorhabditis*) (Stock & Goodrich-Blair, 2012). This association is what enables host mortality to be achieved within 24-48 hours of nematodes entering the host and releasing the bacteria, which are responsible for killing the host (Dowds & Peters, 2002). After host death the nematodes develop and complete between two and three generations before exiting the dead host as infective juveniles; this takes between 10 and 30 days (Lewis & Clarke, 2012). In our study, the *Steinernema* species completed their lifecycles in 10 days, whereas *H. bacteriophora* completed its cycle in 15 days in both, larvae and pupae of *D. fovealis* (personal observation). *Duponchelia fovealis* pupae were less susceptible to infection than larvae, which we suggest is because pupae only have spiracles that are open for nematode entry while larvae have all natural openings (mouth, anus and spiracles). Pupae also have a thicker cuticle than larvae (Dowds & Peters, 2002). Although nematodes require time to complete their lifecycles, practically all species evaluated killed the host within 72 hours, which was similar to what was achieved by *B. thuringiensis*. However, nematodes have an advantage over *B. thuringiensis* as

nematodes can infect both larvae and pupae, whereas *B. thuringiensis* only can infect larvae.

We expected *D. fovealis* larvae to be highly susceptible to fungal infection, as reported for other lepidopteran species in the same taxonomic family (Crambidae) using the same conidial concentrations that we used, e.g. 100% mortality in *Cydalima perspectalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) after nine days, although the authors did not mention the instar that was evaluated (Tozlu *et al.*, 2022). In order to confirm that our isolates were pathogenic we did a preliminary assay with an additional lepidopteran host, *Galleria mellonella*. This species is known to be highly susceptible to fungal infection and has been used extensively as bait to obtain fungal isolates from soil (e.g. Meyling & Eilenberg, 2006; Hernández-Domínguez, Cerroblanco-Baxcajay, Alvarado-Aragón, Hernández-López & Guzmán-Franco, 2016). In this preliminary test, 90% of all *G. mellonella* larvae were infected by our isolates (one replicate per isolate), with the exception of *C. fumosorosea* which only infected 10% of larvae. These preliminary results confirmed the pathogenicity of the isolates used in our study. Recently, Baja *et al.* (2020) tested two fungal isolates (*B. bassiana* and *Cordyceps javanica* (Bally) Kepler, B. Shrestha & Spatafora) against different larval instars of *D. fovealis* and showed that 3rd instar larvae were not susceptible to *C. javanica* (only ca. 25% infection achieved) but that *B. bassiana* achieved ca. 70% infection. The levels of infection these authors obtained with their *B. bassiana* isolate was higher than we achieved in our study (15% infection achieved). This suggests that despite our poor results with entomopathogenic fungi, evaluating more isolates to find more virulent ones against *D. fovealis*, could be important to fully exploit fungal pathogens as biological control agents of *D. fovealis*.

Based on our results, *B. thuringiensis* and entomopathogenic nematodes, specifically *H. bacteriophora*, have the greatest potential to be used against *D. fovealis*. A potential advantage of *B. thuringiensis* is that it can be applied easily using conventional spray equipment (Lacey *et al.*, 2015), as the mode of action of this bacterium requires ingestion. Effective coverage of all leaves in the plant will expose larvae to the bacterium during feeding. However, in strawberry, *D. fovealis* larvae tend to remain on the abaxial side of older leaves that are close to the ground making it difficult to reach them with sprays such as those of *B. thuringiensis* (Bethke & Vander Mey, 2015). However, in this situation entomopathogenic nematodes could be an ideal candidate for use in combination with *B. thuringiensis* for biological control of *D. fovealis*. Entomopathogenic nematodes are highly susceptible to UV light and desiccation (Koppenhöfer, 2007), making the aerial part of plants a hostile environment for nematodes. However, if applied to the soil, where humidity can be ensured as well as more protection from UV, then there is more opportunity for successful infection of *D. fovealis* larvae that remain on the abaxial side of the leaves close to the ground. With sufficient humidity, nematodes can survive in the soil up to six weeks (Koppenhöfer, 2007), making it important to apply nematodes when the susceptible host is present. One of the most common methods of application of nematodes directly to the soil is by drench or drip irrigation (Copping, 2004) which, conveniently, is readily available in typical strawberry production.

In conclusion, our results showed that from the three groups of entomopathogens tested, *B. thuringiensis* and the nematode *H. bacteriophora* had the greatest potential for inclusion in integrated management programmes for this pest in strawberry, where producers would not need to invest in any additional technology for their application. The

nematode *H. bacteriophora* has the additional advantage that it can also infect pupae, although less effectively than larvae, but will contribute to overall population reduction of *D. fovealis* in strawberry. More research is needed on entomopathogenic fungi to find isolates with greater virulence and evaluate their ability to infect other developmental stages such as eggs and pupae.

Table 1. Commercial products of *Bacillus thuringiensis* evaluated against *Duponchelia fovealis* larvae. A.I. = Active ingredient, I.U. = International Units.

Product	Subspecies	Strain (Cry toxins)	% A.I.	Potency (I.U.)
PHC Condor®	kurstaki	EG2348 (Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ia, Cry2Aa and Cry2Ab) ¹	15.0	32,000 mg ⁻¹
Thuricide® PH	kurstaki	SA-12 (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ia, Cry2Aa and Cry2Ab) ²	3.20	Not available
Xentari® DF	aizawai	ABTS-1857 (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C and Cry1D) ³	10.3	15,000 mg ⁻¹
Dipel® DF	kurstaki	ABTS-351 (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa and Cry2Ab) ⁴	10.3	32,000 mg ⁻¹
Agree® WDG	50 aizawai	GC-91 (Cry1Ac, Cry1C, Cry1D and Cry2A) ⁵	50.0	25,000 mg ⁻¹

Table 2. Virulence of five *Bacillus thuringiensis* commercial products against *Duponchelia fovealis*. LC₅₀ (mg a.i. mL⁻¹) ± 95% confidence interval (CI). RC = Regression coefficient (slope), SE = Standard error.

Product	LC₅₀ (95% CI)	Intercept (SE)	RC (SE)
PHC Condor®	0.0003173 (0.000221- 0.0004206)	5.422 (0.755)	1.550 (0.225)
Thuricide® PH	0.0005008 (0.000347- 0.000674)	5.754 (0.744)	1.744 (0.235)
Xentari® DF	0.001115 (0.0004395- 0.002299)	2.741 (0.369)	0.928 (0.136)
Dipel® DF	0.001929 (0.001148- 0.002861)	4.008 (0.531)	1.476 (0.212)
Agree® 50 WDG	0.003063 (0.001936- 0.004453)	3.316 (0.403)	1.319 (0.171)

Table 3. Virulence of three entomopathogenic nematode species against *Duponchelia fovealis* larvae. LC₅₀ (IJs larva⁻¹) ± 95% confidence interval (CI). RC = Regression coefficient (slope), SE = Standard error.

Species	LC ₅₀ (95% CI)	Intercept (SE)	RC (SE)
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (LARVANEM®)	21.56 (14.40-31.38)	-1.746 (0.205)	1.310 (0.116)
<i>Steinernema feltiae</i> (ENTONEM®)	56.19 (38.74-82.54)	-2.291 (0.220)	1.310 (0.116)
<i>Steinernema carpocapsae</i> (CAPSANEM®)	73.04 (50.24-108.74)	-2.440 (0.225)	1.310 (0.116)

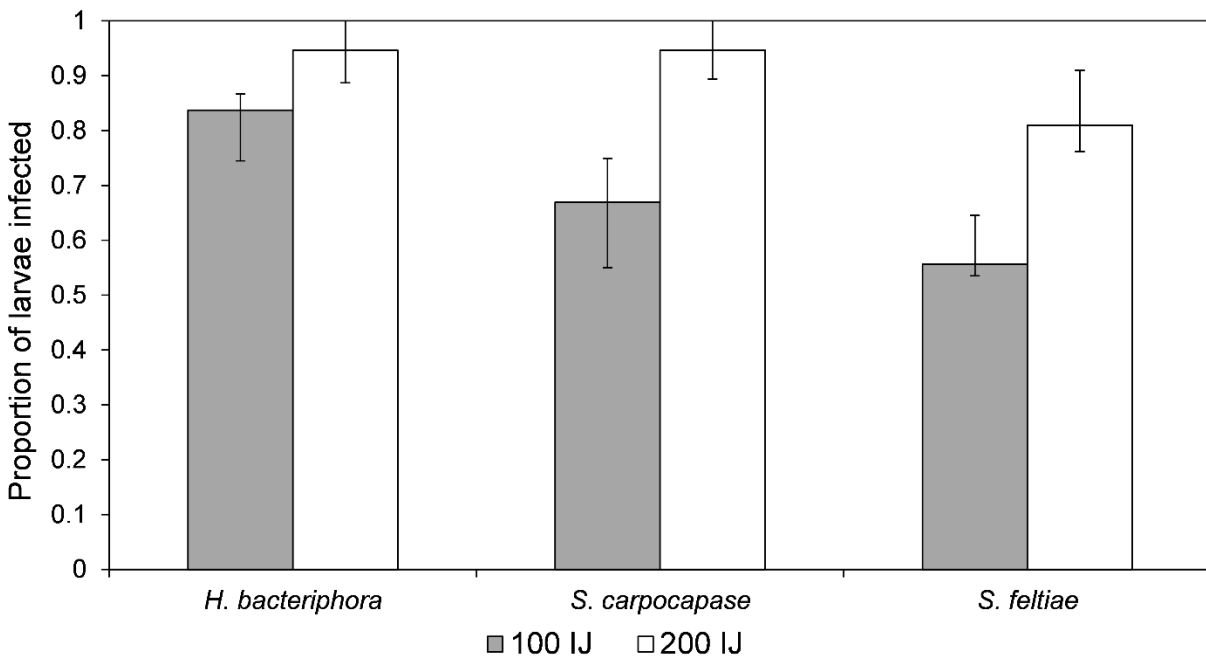


Figure 1. Proportion of *Duponchelia fovealis* 3rd instar larvae infected by two doses (100 and 200 IJs) of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae*, *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. Error bars represent 95% confidence intervals back-transformed from the logistic scale

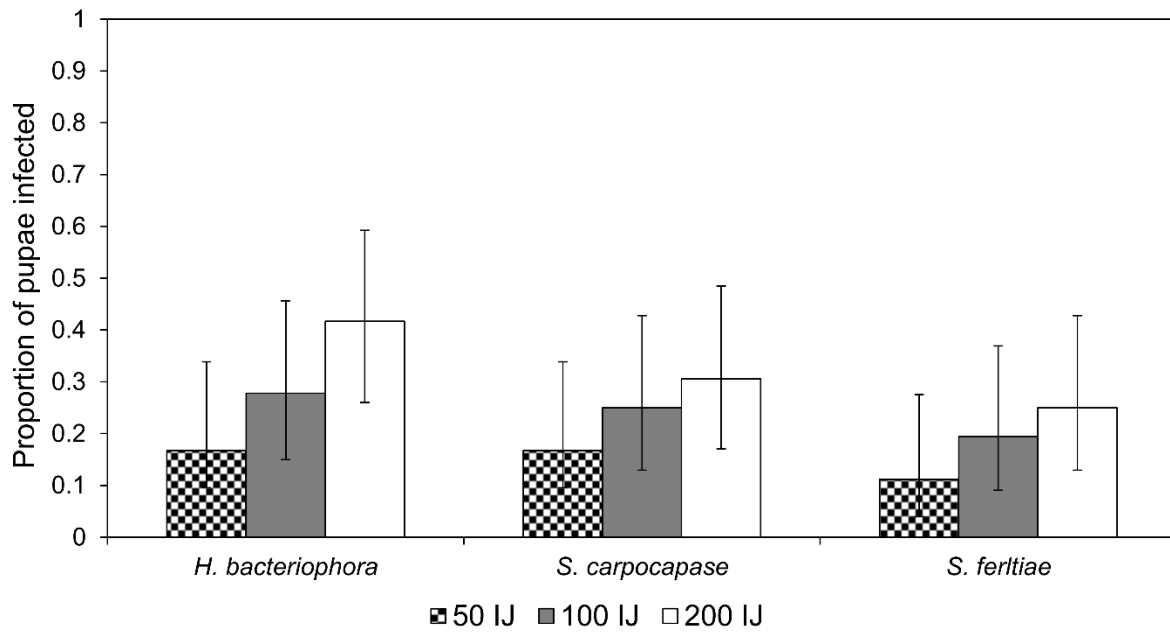


Figure 2. Proportion of *Duponchelia fovealis* pupae infected by three doses (50, 100 and 200 IJs) of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae*, *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. Error bars represent 95% confidence intervals back-transformed from the logistic scale.

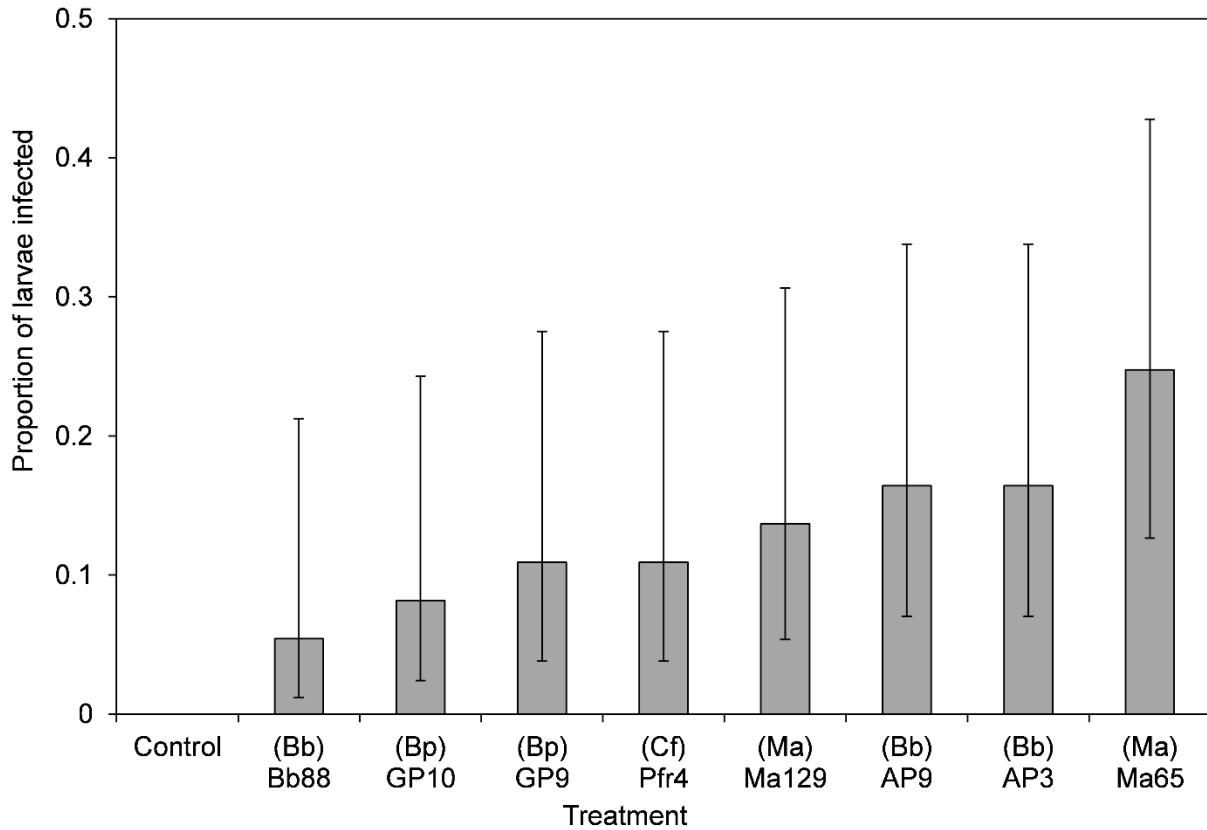


Figure 3. Proportion of *Duponchelia fovealis* 3rd instar larvae infected by isolates of *B. bassiana* (Bb), *B. pseudobassiana* (Bp), *M. anisopliae* (Ma) and *C. fumosorosea* (Cf). Error bars represent 95% confidence intervals back-transformed from the logistic scale.

DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos demostraron efectividad de los patógenos, en todos los grupos hubo mortalidad diferencial sobre *D. fovealis*. En el caso de *B. thuringiensis*, todos los productos comerciales mostraron diferencia significativa en la virulencia entre ellos. Anteriormente, se había considerado a Dipel® (*B. thuringiensis var. kurstaki*) como el producto de mayor impacto en el mercado mundial y el más recomendado para el control de *D. fovealis*, (Petrucci *et al.*, 2020); sin embargo, con los resultados de este trabajo se demostró que cualquiera de los productos probados es candidato para el combate de *D. fovealis*. Aunque PHC Condor® (*B. thuringiensis var. kurstaki*) presentó ligeramente una mayor acción tóxica, y por tanto mayor efectividad en larvas; esto coincidió con los resultados de otros estudios en lepidópteros con *thuringiensis var. Kurstaki*, esta cepa fue más específica para insectos de este orden (mariposas y polillas) (Sanahuja *et al.*, 2011).

Los nematodos se han empleado con éxito como agentes de biocontrol eficientes contra larvas de algunos lepidópteros (Goudarzi *et al.*, 2015), pero no se encontraron investigaciones previas del uso de éstos para *D. fovealis*. Con los resultados de este trabajo se confirmó que los nematodos tienen potencial biológico para combatir a *D. fovealis* en el estado larval y pupa. Además, por la biología de *Heterorhabditis* spp. y *Steinernema* spp., y su potencial para permanecer en el suelo y desplazarse en busca de su hospedero, se podría incrementar su potencial de impacto para en los cultivos de fresa, con los beneficios de su especificidad y sin riesgos a insectos no objetivo.

En este trabajo se encontró una variación de la susceptibilidad a los nematodos dependiendo de las etapas de desarrollo del huésped, aparentemente se puede atribuir a las diferencias en el tamaño o la accesibilidad de las aberturas naturales del cuerpo (boca, espiráculos y ano) que sirven como puerta de entrada para los juveniles infectivos (JI) (Dowds y Peters, 2002). En las dos etapas evaluadas, la pupa de *D. fovealis* fue menos susceptible a cualquiera de las dos especies de nematodos. Aparentemente las pupas fueron menos susceptibles porque sólo los espiráculos permanecen abiertos, y la boca y el ano están cerrados. Además, la cutícula en dicho estado de desarrollo también es más gruesa que en la etapa larval y resiste más la penetración de los JI (Dowds & Peters, 2002). La mortalidad de larvas de *D. fovealis* fue superior al 80% con 200 JIs de *H. bacteriophora*, por la biología de esta especie, que es móvil y puede orientarse hacia señales volátiles del huésped (Hazir *et al.*, 2003), podría esperarse mejor desempeño en campo, pero es algo que debe evaluarse en condiciones de campo.

Los resultados de infectividad con hongos entomopatógenos sobre *D. fovealis* pueden deber a varios factores. El insecto huésped y su estado de desarrollo está relacionado con la especificidad del hongo, y es posible que este factor haya sido uno de los importantes para explicar la baja virulencia de los aislamientos. También es posible una alta resistencia de las larvas de *D. fovealis* a las cepas fúngicas seleccionadas ya que el inóculo siempre estuvo por encima del 95% de viabilidad. Los mismos inóculos en *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) ocasionaron de 80 a 100% de mortalidad.

CONCLUSIÓN GENERAL

Con los resultados de este trabajo se puede asegurar que productos comerciales de *B. thuringiensis* y *H. bacteriophora* tienen potencial de usarse como agentes entomopatógenos en el combate de *D. fovealis*. En especial a *H. bacteriophora* con los porcentajes de mortalidad más elevados en infección a larvas y pupas.

LITERATURA CITADA

- Alean, I. C. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homóptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá, D. C. Colombia.
- Araujo, E. S., Poltronieri, A. S., Poitevin, C. G., Mirás-Avalos, J. M., Zawadneak, M. A. C., & Pimentel, I. C. (2020). Compatibility between entomopathogenic fungi and EGG parasitoids (Trichogrammatidae): A laboratory study for their combined use to control *Duponchelia fovealis*. *Insects*, 11(9), 1–14. <https://doi.org/10.3390/insects11090630>
- Arroyo Cossio, A. J., & Hernández Flores, A. A. (2021). Competitividad de la fresa mexicana en el mercado estadounidense de 1992 a 2017. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 22(1). https://doi.org/10.21930/rcta.vol22_num1_art:1414
- Baja, F., Poitevin, C. G., Araujo, E. S., Mirás-Avalos, J. M., Zawadneak, M. A. C., & Pimentel, I. C. (2020). Infection of *Beauveria bassiana* and *Cordyceps javanica* on different immature stages of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae). *Crop Protection*, 138(June). <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105347>
- Bethke, J., & Vander Mey, B. (2015). Pest Alert: *Duponchelia fovealis*. University of California Cooperative Extension San Diego.
- Bonsignore, C. P., & Vacante, V. (2010). *Duponchelia fovealis* (Zeller). Una nuova emergenza per la fragola *Protezione Delle Colture*, June, 40–43
- Bravo, A., Gill, SS, Soberón, M., 2005. Mecanismos y uso de *Bacillus thuringiensis*. En: Gilbert, LI, Iatrou, K., Gill, SS (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier BV, ISBN 0-44-451516-X, pp. 175-206.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberon, M., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49, 423e435.
- Burnell, A., & Stock, S. P. (2000). *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts—lethal pathogens of insects. *Nematology*, 2(1), 31-42.
- CABI, C. for A. and B. I. (2020). *Duponchelia fovealis* (Southern European marshland pyralid). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/20168>
- Cruz-Esteban, S., & Rojas, J. C. (2021). Pheromone-Baited Traps Confirm the Presence of *Duponchelia fovealis* in Strawberry Crops in Mexico. *Southwestern Entomologist*, 46(2), 533–536.
- Echánove, F. (2001). Abastecimiento a la Ciudad de México: el caso de los pequeños productores de fresa de Guanajuato'. *Investigaciones Geográficas*, 145, 128–148.

- Dowds, B. C., & Peters, A. R. N. E. (2002). Virulence mechanisms. *Entomopathogenic nematology*, 79-98.
- FAOSTAT. (2019). *Cantidades de producción de Fresas por país 2019*. <http://www.fao.org/faostat/es/?#data/QC/visualize>
- Fernández, O., y L. Vega. 2002. Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica), 64: 110-115.
- Forst, S., Clarke, D. 2002. Bacteria nematode symbiosis. En: Entomopathogenic nematology. CABI International 2002. (Ed.) R. Gaugler. p. 57-77
- Franco, M. C., & Baptista, M. C. (2010). *Duponchelia fovealis* Zeller-nova praga em Portugal. *Frutas Legumes Flores*, 110, 34-35.
- García, M. A. G., García, S. C., Gordillo, J. M. L., & Martínez, R. F. M. (2008). Hongos entomopatógenos como una alternativa en el control biológico. *Kuxulkab'*, 15(27). <https://doi.org/10.19136/kuxulkab.a15n27.846>
- Goudarzi, M.; Moosavi, M.; Asadi, R. 2015. Effects of entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) and *Steinernema carpocapsae* (Weiser), in biological control of *Agrotis segetum* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Noctuidae). *Turkish Journal of Entomology* 39(3): 239-250. Hazir, S., Kaya, H. K., Stock, S. P., & Keskin, N. (2003). Entomopathogenic nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) for biological control of soil pests. *Turkish journal of Biology*, 27(4), 181-202.
- Hazir, S., Kaya, H. K., Stock, S. P., & Keskin, N. (2003). Entomopathogenic nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) for biological control of soil pests. *Turkish journal of Biology*, 27(4), 181-202.
- Hussein HM, Zemek R, Habuštová SO, Prenerová E, Adel MM (2013) Laboratory evaluation of a new strain CCM 8367 of *Isaria fumosorosea* (syn. *Paecilomyces fumosoroseus*) on *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Arch Phytopathol Plant Prot* 46:1307–1319
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., & Butt, T. M. (2001). for Managing Insect Pests. Fungi as biocontrol agents: progress problems and potential, 23.
- Jaronski ST, Mascarín GM (2016) Mass production of entomopathogenic fungi: state of the art. In: Morales-Ramos JA, Rojas MG, Shapiro-Ilan DI (eds) Mass production of beneficial organisms: invertebrates and entomopathogens. Academic Press, pp 357–413
- Kaya, H.K., 1990. Soil ecology. In: Gaugler, R., Kaya, H.K. (Eds.), Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 93–115.

- Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., & Goettel, M. S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *Journal of invertebrate pathology*, 132, 1-41.
- León-López, L., Guzmán-Ortíz, D. L. A., García Berumen, J. A., Chávez Marmolejo, C. G., & Peña-Cabriales, J. J. (2018). Consideraciones para mejorar la competitividad de la región “El Bajío” en la producción nacional de fresa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(4), 673–686. <https://doi.org/10.29312/remexca.v5i4.929>
- Lopez-Llorca, L. V., & Jansson, H. B. (2001). Biodiversidad del suelo: control biológico de nemátodos fitopatógenos por hongos nematófagos. *Cuadernos de biodiversidad*, nº 6 (feb. 2001); pp. 12-15.
- Monzón A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas, 63: 9-103
- Motta-Delgado, P. A., & Murcia-Ordoñez, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente & Agua-An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 6(2), 77-90.
- Pereira Paes, J. P., Souza Lima, Victor Luiz Pratissoli, D., de Carvalho, J. R., & Oliveira de Freitas Bueno, R. C. (2018). Selection of parasitoids of the genus *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and parasitism at different eggs ages of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, 40(1), 1–21. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v40i1.42216>
- Petrucci, K. P. de O. S., Pratissoli, D., Damascena, A. P., Araujo Junior, L. M. de, Carvalho, J. R. de, Rodrigues, H. de S., & Bueno, R. C. O. de F. (2020). Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* berliner (bacillaceae). *Nucleus*, 17(1), 293–304. <https://doi.org/10.3738/1982.2278.3698>
- Pucheta Díaz, M., Flores Macías, A., Rodríguez Navarro, S., & De La Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12), 856-860.
- Salas-Araiza, M., Salazar-Solís, E., Alejandro, O., Jaime, M., & Guzmán-Mendoza, R. (2014). Insectos Benéficos En El Cultivo De Fresa En Irapuato, Guanajuato. México. *Entomología Mexicana*, 1, 289–294. https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/37985986/salasA_et_al_2014.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1556917231&Signature=oxV4PLImZwnpyg83w0kDRUpQHul%3D&response-content-disposition=inline%3B filename%3DBeneficial_insects_in_strawb
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., & Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant biotech*

- SIAP. (2019). Resumen por cultivo. In 2019 (p. 1). http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do
- SIAP. (2020). *Atlas agrolimentario*. https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2020/Atlas-Agroalimentario-2020
- Soria-Morales, J. (2019, January). Periódico Rural AGRO21 - Año 03 - No.10 - Enero 2019 by Grupo AGRO21 - issuu. *Periódico Rural AGRO21*, 5. https://issuu.com/agro21/docs/ruralagro21_ed_10
- Stocks, S. D., & Hodges, A. (2011). European Pepper Moth or Southern European Marsh Pyralid *Duponchelia fovealis* (Zeller). Department of Entomology and Nematology; UF/IFAS Extension, Gainesville, FL 32611. Document EENY-508, 10. http://entnemdept.ufl.edu/creatures/veg/leps/european_pepper_moth.htm
- Tanada, Y. & Kaya, H. K. (1993). In *Insect Pathology*, pp. 12–51. New York: Academic Press.
- Vashisth, S., Chandel, Y. S., & Sharma, P. K. (2013). Entomopathogenic nematodes-a review. *Agricultural Reviews*, 34(3).
- Zawadneak, M. A. C., Gonçalves, R. B., Pimentel, I. C., Schuber, J. M., Santos, B., Poltronieri, A. S., & Solis, M. A. (2016). First record of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) in South America. *Idesia (Arica)*, 34(3), 91–95. <https://doi.org/10.4067/s0718-34292016000300011>
- Zimmermann, G. (1993). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science*, 37(4), 375-379