

## Search for baculoviruses in sawflies (Hymenoptera: Diprionidae) in Mexico

### Búsqueda de baculovirus en moscas sierra (Hymenoptera: Diprionidae) en México

Cristian Estrada-Emigdio<sup>1</sup>; Beatriz S. Macario-Tovar<sup>2</sup>; Estefan Miranda-Miranda<sup>2</sup>;  
Raquel Cossio-Bayugar<sup>2</sup>; Ernesto González-Gaona<sup>3</sup>;  
Karla V. De Lira-Ramos<sup>3</sup>; Alejandro Pérez-Panduro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Fitosanidad. km 36.5 carretera México-Texcoco.  
C. P. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Centro  
Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI).  
Búlevar Cuauhnahuac núm. 8534. C. P. 62574. Jiutepec, Morelos, México.

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Pabellón.  
Carretera Aguascalientes-Zacatecas, km 32.5. C. P. 20678. Pabellón de Arteaga, Aguascalientes, México.

\*Corresponding author: aperez@colpos.mx; tel.: +52 595 101 2254.

#### Abstract

**Introduction:** Sawflies (Hymenoptera: Diprionidae) affect conifers and other forest species in the northern hemisphere, reducing forest productivity and causing stand death, thereby justifying control actions.

**Objective:** The aim was to collect baculoviral strains from Mexican sawfly populations and explore their potential for developing biopesticides.

**Materials and methods:** A search for baculovirus-infected field populations was carried out. Twenty-three samples of live or dead larvae were collected from 12 localities. Microscopic diagnosis at 400X or 1000X under phase contrast, a DNA hybridization test, and a pathogenicity test were performed.

**Results and discussion:** Samples from eleven localities showed baculoviral polyhedra. Three subsamples of *Zadiprion ojedae* DNA from Guachochi, Chihuahua, hybridized with a synthetic probe of the *Neodiprion sertifer* Polh gene sequence, confirming they harbored baculovirus infection.

Five tested inocula produced disease and mortality in all treated larvae; two of them induced baculoviral polyhedra proliferation in  $\geq 89\%$  of the resulting cadavers. The *rictus mortem* of sawfly larvae killed by baculovirus differs from that observed in Lepidoptera: most baculovirus-bearing cadavers remain firm or hard, flattened or not, obscured or not, and do not hang from the hind legs. For most of the cadavers found with liquefied tissues, the agent that most probably caused death was not the baculovirus but the accompanying microbiota (bacilli, cocci, or fungi).

**Conclusions:** Baculovirus strains are widely present in Mexican sawfly populations and several of them were pathogenic and promising for developing bioinsecticides.

**Keywords:** Diprionidae;  
*Zadiprion*; *Neodiprion*;  
*Monoctenus*; bioinsecticides.

#### Resumen

**Introducción:** Las moscas sierra (Hymenoptera: Diprionidae) afectan las coníferas y otras especies forestales en el hemisferio norte, reduciendo la productividad del bosque y causando la muerte de los rodales, lo que justifica acciones de control.

**Objetivo:** Obtener cepas baculovíricas de poblaciones de moscas sierra mexicanas y explorar su potencial para elaborar bioplaguicidas.

**Materiales y métodos:** Se hizo una búsqueda de poblaciones de campo infectadas con baculovirus. De 12 localidades se recolectaron 23 muestras de larvas vivas o muertas. Se realizó un diagnóstico microscópico a 400X o 1000X bajo contraste de fases, una prueba de hibridación de ADN y otra de patogenicidad.

**Resultados y discusión:** Las muestras procedentes de once localidades mostraron poliedros baculovíricos. Tres submuestras de ADN de *Zadiprion ojedae* de Guachochi, Chihuahua, hibridaron con una sonda sintética de la secuencia del gen Polh de *Neodiprion sertifer*, confirmando que albergaban la infección baculovírica. Cinco inóculos probados produjeron enfermedad y mortalidad en todas las larvas tratadas; dos de ellos indujeron proliferación de poliedros baculovíricos en  $\geq 89\%$  de los cadáveres resultantes. El *rictus mortem* de las larvas de moscas sierra muertas por baculovirus difiere del observado en los lepidópteros: la mayoría de los cadáveres portadores de baculovirus permanecen firmes o duros, aplanados o no, oscurecidos o no y no cuelgan de las patas traseras. La licuefacción de sus tejidos internos, su aplanamiento y oscurecimiento dependen de la abundancia relativa y tipo de microbiota acompañante. En la mayoría de los cadáveres encontrados con tejidos licuados, el agente que probablemente causó la muerte en mayor medida no fue el baculovirus, sino la microbiota acompañante (bacilos, cocos y hongos).

**Conclusiones:** Las cepas baculovíricas están ampliamente presentes en las poblaciones mexicanas de moscas sierra y varias de ellas fueron patogénicas y prometedoras para el desarrollo de bioinsecticidas.

**Palabras clave:** Diprionidae;  
*Zadiprion*; *Neodiprion*;  
*Monoctenus*; bioinsecticidas.

## Introduction

Sawflies (Hymenoptera: Diprionidae) are phytophagous species that defoliate conifers of the genera *Pinus*, *Juniperus*, *Cupressus*, *Abies* and *Larix*, as well as some other broadleaf species in the northern hemisphere (Olivo, 2011; Smith, 1988, 1993). In Mexico, there have been significant outbreaks of sawflies in various forest areas; for example, in the Meseta Tarasca (Michoacán), between 1930-1943 and 1966-1975, there were diprionid infestations covering between 7000 and 60000 ha (González-Gaona et al., 2014), and in Chihuahua several infestations have been recorded since 1980 (Olivo, 2011) which have covered extensions of 3400 to 34500 ha (González-Gaona et al., 2014; Nolasco-Gumeta, 2014). These pests have also been detected in Guerrero, Oaxaca, and San Luis Potosí (Smith, Sánchez-Martínez, & Ordaz-Silva, 2010). This working group has also observed outbreaks of various sizes and intensities of these pests in Jalisco, Veracruz, and Sonora, but the record has not been documented in scientific publications. Other outbreaks have also been reported only in papers of limited circulation such as theses or symposia, a situation that prevents their citation in publications of greater impact. For a long time, it has been thought that only a few species of sawflies of the genera *Zadiprion*, *Neodiprion*, and *Monoctenus* are present in Mexico (Smith et al., 2010); however, the recent work by De Lira Ramos, González Gaona, and Sánchez Martínez (2021) has significantly increased the list with several newly described species and it will likely continue to grow as this group is further studied.

The damage caused by sawfly outbreaks is significant enough to justify control actions. Chemical insecticides are inadequate for such control because of their high potential to disrupt the environment. For this purpose, entomopathogens are preferable to insecticides for pest control, but even among entomopathogens there are groups that have significant disadvantages for forested areas, making some less ideal than others. For example, because of their wide host range, fungi such as *Beauveria* and *Metarhizium* are potentially harmful to non-target insects. At the same time, strains of the bacterium *Bacillus thuringiensis* Berliner, with potential against diprionids, also pose a risk to forest-dwelling bees and ants. In contrast, baculoviruses tend to have a high degree of specificity and aggressiveness towards their hosts, as well as mechanisms to persist in the environment (Balla et al., 2021; Thompson, Scott, & Wickman, 1981) and are therefore more suitable as control agents in forest environments.

In Mexico, no baculovirus inocula have been isolated from diprionids and no baculovirus-based bioinsecticides have been developed (Tapia-Uriza et al., 2022) against these pests, but several facts have

## Introducción

Las moscas sierra (Hymenoptera: Diprionidae) son especies fitófagas que defolian coníferas de los géneros *Pinus*, *Juniperus*, *Cupressus*, *Abies* y *Larix*, así como algunas otras especies latifoliadas en el hemisferio norte (Olivo, 2011; Smith, 1988, 1993). En México han habido brotes significativos de moscas sierra en diversas zonas forestales; por ejemplo, en la Meseta Tarasca (Michoacán), entre 1930-1943 y 1966-1975, hubo infestaciones de diprionidos que abarcaron entre 7000 y 60000 ha (González-Gaona et al., 2014). En Chihuahua se han registrado varias infestaciones desde 1980 (Olivo, 2011) las cuales han abarcado extensiones de 3400 a 34500 ha (González-Gaona et al., 2014; Nolasco-Gumeta, 2014). Estas plagas también se han detectado en Guerrero, Oaxaca y San Luis Potosí (Smith, Sánchez-Martínez, & Ordaz-Silva, 2010). Asimismo, el presente grupo de trabajo ha observado brotes de varios tamaños e intensidades de estas plagas en Jalisco, Veracruz y Sonora, pero el registro no se ha documentado en publicaciones científicas. También se tiene conocimiento de otros brotes reportados solo en documentos de circulación limitada como tesis o simposios, situación que impide su citación en publicaciones de mayor impacto. Durante mucho tiempo se ha pensado que solo unas cuantas especies de moscas sierra de los géneros *Zadiprion*, *Neodiprion* y *Monoctenus* están presentes en México (Smith et al., 2010); sin embargo, el trabajo reciente realizado por De Lira Ramos, González Gaona, y Sánchez Martínez (2021) ha incrementado considerablemente la lista con diversas especies recientemente descritas y, probablemente, seguirá creciendo a medida que este grupo sea más estudiado.

Los daños causados por los brotes de mosca sierra son lo suficientemente importantes para justificar acciones de control. Los insecticidas químicos resultan inadecuados para dicho control por su alto potencial de perturbación del ambiente. Por ello son preferibles los entomopatógenos sobre los insecticidas para controlar a estas plagas, pero incluso entre aquellos existen grupos que presentan desventajas importantes para las zonas forestales, lo que hace que algunos entomopatógenos sean menos ideales que otros. Por ejemplo, a causa de su amplia gama de huéspedes, los hongos como *Beauveria* y *Metarhizium* son potencialmente dañinos para los insectos no blanco. Al mismo tiempo, las cepas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner, con potencial contra los diprionidos, también suponen un riesgo para las abejas y hormigas que viven en los bosques. En cambio, los baculovirus suelen tener alto grado de especificidad y agresividad hacia sus huéspedes, así como mecanismos para persistir en el medio ambiente (Balla et al., 2021; Thompson, Scott, & Wickman, 1981) y, por tanto, son más adecuados como agentes de control en entornos forestales.

prompted this search. Information exists documenting the occurrence of baculoviral infections in sawfly populations and the development of commercial bioinsecticides from wild inocula in several regions of the world (Arthurs & Dara, 2019; Dixon, 2019; Lucarotti, Morin, Graham, & Lapointe, 2007; Moreau et al., 2005; Moreau & Lucaritti, 2007; Qinghua et al., 2018; van Frankenhuyzen, Lucarotti, & Lavallée, 2016), suggesting that they could also exist in Mexico. Other studies note the existence of latent baculoviral infections in healthy lepidopteran populations (Hughes, Possee, & King, 1997; Il'inykh & Ul'yanova, 2005; Williams, Virto, Murillo, & Caballero, 2017), suggesting that sawflies could also harbor such infections. The experience of the members of this research team, who have found and activated latent infections in Lepidoptera, suggests, as a working hypothesis that these viruses could also be found in Diprionidae species. In this sense, the objective of the study was to search for baculoviral infections in Mexican populations of sawflies and to explore the potential of the obtained viral strains for the development of bioinsecticides.

## Materials and methods

### Sample collection and baculovirus detection

In this work, several populations of sawflies associated with *Pinus* and *Juniperus* trees that inhabit temperate forests were sampled. The samples involved populations located between 1500 and 3000 m in all mountain systems of Mexico (Figure 1). The location of the sawfly populations (pest outbreaks) was supported by the network of local technicians of CONAFOR (National Forestry Commission), and a number of them were detected in several forest regions. Subsequently, 23 samples of larvae suspected of carrying baculoviral infection were collected between 2011 and 2019. Most of the samples were conform by dead and dehydrated larvae, which were placed in containers either individually or in small groups of individuals with the same appearance. When the collected individuals were still hydrated, they were placed in vials with silica gel, or their confinements were placed on ice for transport to the laboratory. All samples were frozen until microscopic diagnosis. Two of the samples were collected as live larvae but they died during transport to the laboratory.

The samples were examined for the presence of baculovirus polyhedra in the cadavers. For diagnosis, a frotis from the abdominal region of each cadaver was prepared on a slide and observed under an Olympus CX43 microscope at 400X or 1000X with phase contrast or darkfield illumination; in addition to the appearance of each cadaver, the type of microorganism observed, and its relative abundance was also recorded. To identify the sawfly species involved in each field sample, adults

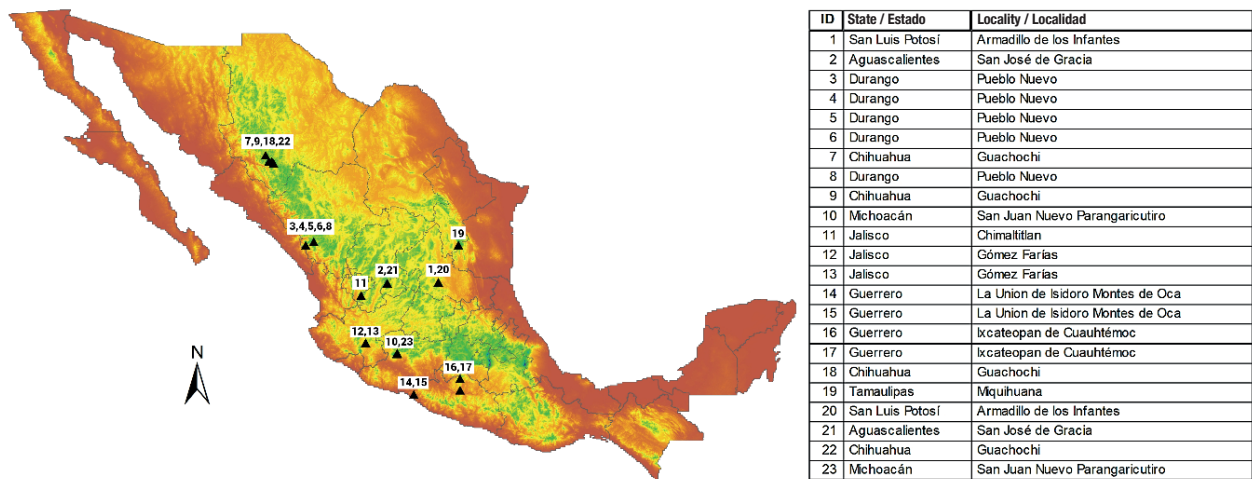
En México no se han aislado inóculos baculovíricos de diprionidos ni desarrollado bioinsecticidas a base de baculovirus (Tapia-Uriza et al., 2022) contra esas plagas, pero varios hechos han impulsado a esta búsqueda. Existe información documental de la presencia de infecciones baculovíricas en poblaciones de moscas sierra y la elaboración de bioinsecticidas comerciales a partir de inóculos silvestres en varias regiones del mundo (Arthurs & Dara, 2019; Dixon, 2019; Lucarotti, Morin, Graham, & Lapointe, 2007; Moreau et al., 2005; Moreau & Lucaritti, 2007; Qinghua et al., 2018; van Frankenhuyzen, Lucarotti, & Lavallée, 2016), lo que sugiere que también podrían existir en México. Otros estudios constatan la existencia de infecciones de baculovirus latentes en poblaciones sanas de lepidópteros (Hughes, Possee, & King, 1997; Il'inykh & Ul'yanova, 2005; Williams, Virto, Murillo, & Caballero, 2017), lo cual sugiere que también las moscas sierra podrían albergar este tipo de infecciones. La experiencia de los miembros de este equipo de trabajo, que han encontrado y activado infecciones latentes en lepidópteros, sugiere como hipótesis que estos virus también podrían encontrarse en especies de Diprionidae. En este sentido, el objetivo de este estudio fue buscar infecciones por baculovirus en poblaciones mexicanas de moscas sierra y explorar el potencial de las cepas virales obtenidas para el desarrollo de bioinsecticidas.

## Materiales y métodos

### Recolección de muestras y detección de baculovirus poliédricos

En este trabajo se muestrearon poblaciones de moscas sierra asociadas a los árboles *Pinus* y *Juniperus* que habitan en bosques templados ubicados entre 1500 y 3000 m en todos los sistemas montañosos de México (Figura 1). Con la ayuda de la red de técnicos locales de la CONAFOR (Comisión Nacional Forestal) se detectaron brotes de estos defoliadores en diversas regiones forestales. Posteriormente, de dichas infestaciones se recogieron 23 muestras de larvas vivas o muertas, sospechosas de portar infecciones baculovíricas. Las colectas se realizaron entre 2011 y 2019. La mayoría de las muestras se conformaron de larvas muertas y deshidratadas, colocadas dentro de contenedores individuales o en pequeños grupos de individuos con el mismo aspecto. Cuando los individuos colectados todavía estaban hidratados fueron puestos en frascos con silica gel o sus confinamientos se pusieron en hielo para transportarlos al laboratorio. Todos los especímenes se congelaron hasta su diagnóstico microscópico. Dos de las muestras se colectaron como larvas vivas, pero murieron durante su traslado al laboratorio.

Las muestras se examinaron para determinar la presencia de baculovirus en los cadáveres. Para su diagnóstico individual, sobre un portaobjetos, se



**Figure 1.** Map showing the locations where the 23 samples of sawfly larvae were collected to search for baculoviral infections. The box on the right shows the list of samples analyzed and the name of the collection sites.

**Figura 1.** Mapa en el que se señalan los lugares donde se tomaron las 23 muestras de larvas de mosca sierra para la búsqueda de sus infecciones baculovíricas. El cuadro en la esquina superior derecha contiene la lista de las muestras analizadas y el nombre de los lugares de recolección.

obtained in the field or laboratory were processed with appropriate taxonomic keys (De Lira et al., 2021); however, for four samples (1, 2, 9, and 10, Table 1) no adults were collected or brooded from larvae. For other five samples 3, 7, 14, 15, and 23 (Table 1), only the genus was determined due to the lack of appropriate taxonomic keys. The adults derived from these samples did not consistently match the available taxonomic keys, suggesting that they may be new species.

#### Molecular detection of baculovirus DNA in larvae

A nucleic acid hybridization test was carried out on DNA from larval cadavers of *Zadiprion ojedae* Smith collected in Guachochi, Chihuahua, and *Zadiprion borjai* (González et al., 2022) from Miquihuana, Tamaulipas.

#### Probe preparation

The sequence of the polyhedrin (Polh) gene of *Neodiprion abietis* Harris nucleopolyhedrovirus (NeabNPV), with 741 bp, according to GenBank record NC\_008252.1, was prepared by Integrated DNA Technologies (IDT). This sequence was integrated into the PucIDT plasmid and used to transform an *Escherichia coli* HB 101 competent cell line (Promega Corporation), following the manufacturer's instructions (Promega information bulletin TB092). Bacteria transformed with the PucIDT-NeabNPVPolh plasmid were incubated in tubes containing 50 mL of Luria-Bertani (LB) medium and 50 µg of ampicillin, at 37 °C for 18 h with constant shaking. The resulting bacterial culture was processed for plasmid DNA extraction with the miniprep

preparó un frotis de la región abdominal de cada cadáver y se observó al microscopio Olympus CX43 a 400X o 1000X con iluminación de contraste de fases o campo oscuro; se registró el aspecto del cadáver, el tipo de microorganismo observado y su abundancia relativa. Para identificar las especies de moscas sierra involucradas en cada muestra de campo, los adultos obtenidos en campo o laboratorio se procesaron con claves taxonómicas apropiadas (De Lira et al., 2021); sin embargo, para cuatro muestras (1, 2, 9 y 10, Cuadro 1) no se obtuvieron adultos ni se criaron a partir de larvas. Para las muestras 3, 7, 14, 15 y 23 (Cuadro 1) solo se determinó el género debido a la falta de claves taxonómicas apropiadas. Los adultos obtenidos de estas muestras no coincidieron de forma convincente con las claves taxonómicas disponibles, lo que sugiere que podrían tratarse de especies nuevas.

#### Detección molecular de ADN de baculovirus en larvas

Se realizó una prueba de hibridación de ácidos nucleicos en el ADN de cadáveres larvarios de *Zadiprion ojedae* Smith & Sanchez recolectadas en Guachochi, Chihuahua, y de *Zadiprion borjai* (González et al., 2022) colectadas en Miquihuana, Tamaulipas.

#### Preparación de la sonda

La secuencia del gen de la polihedrina (Polh) del nucleopoliedrovirus de *Neodiprion abietis* Harris (NeabNPV), con 741 pb, según el registro NC\_008252.1 del GenBank, fue elaborada por la empresa Integrated DNA Technologies (IDT). Esta secuencia se integró en el

**Table 1. Microscopic diagnosis (400X and 1000X with phase contrast or darkfield) of cadaver samples of Diprionidae larvae collected in regions of Mexico.**

**Cuadro 1. Diagnóstico microscópico (400X y 1000X con contraste de fases o campo oscuro) de muestras de cadáveres de larvas de Diprionidae recolectadas en regiones de México.**

Sample/ Muestra	Sample identification and number of individuals examined (n)* / Identificación de la muestra y número de individuos examinados (n)*	Comments and collection date / Observaciones y fecha de recolección	Result / Resultado
1	Property/Propiedad La Barranca, Armadillo de los Infantes, San Luis Potosí (10)	2013	10 with cocci and microsporidia / 10 con cocos y microsporidios
2	Los Alamitos, San José de Gracia, Sierra Fría Aguascalientes (10)	2013	10 with cocci / 10 con cocos
3	<i>Zadiprion</i> spp. (10) Pueblo Nuevo, Durango.	2013 Black cadaver preserved in group and partially disintegrated / Cadáver negro preservado en grupo y parcialmente desintegrado	10 with bacilli, microsporidia and cocci / 10 con bacilos, microsporidios y cocos
4	<i>Zadiprion falsus</i> (10) El Pochón, Pueblo Nuevo, Durango.	2013	1 with abundant polyhedra and a few cocci. Liquefied body. 9 with bacilli, microsporidia and cocci / 1 con abundantes poliedros y algunos cocos. Cuerpo licuado. 9 con bacilos, microsporidios y cocos.
5	<i>Zadiprion falsus</i> (10) Pueblo Nuevo, Durango.	2013 Yellowish brown cadavers Preserved in groups and partially disintegrated / Cadáveres de color amarillo- marrón, conservados en grupo y parcialmente desintegrados	10 with bacilli, microsporidia and cocci / 10 con bacilos, microsporidios y cocos.
6	<i>Zadiprion falsus</i> (10) Cruz de Piedra, Pueblo Nuevo, Durango.	2013	10 with bacilli, microsporidia and cocci / 10 con bacilos, microsporidios y cocos
7	<i>Zadiprion</i> spp. (10) "Virus" Zerahuaran, Guachochi, Chihuahua.	2013 Liquefied bodies / Cuerpos licuados	10 with fungal hyphae, very few polyhedra / 10 con hifas fúngicas, muy pocos poliedros
8	<i>Zadiprion falsus</i> (10) "Virus" jaula 16, Pochón, Pueblo Nuevo, Durango.	2013 Liquefied bodies / Cuerpos licuados	10 with small bacilli, few polyhedra / 10 con pequeños bacilos, pocos poliedros
9	Guachochi, Chihuahua (10)	2013	10 with bacilli and cocci / 10 con bacilos y cocos
10	San Juan Parangaricutiro, Michoacán (10)	2013	10 with cocci / 10 con cocos
11	<i>Zadiprion falsus</i> (10) San Juan Potrereros Chimaltitlán, Jalisco.	2013	10 with cocci and microsporidia / 10 con cocos y microsporidios
12	<i>Zadiprion falsus</i> (10) Cruz del Muchacho, Gómez Farías, Jalisco.	2012	10 with bacilli and microsporidia / 10 con cocos y microsporidios
13	<i>Zadiprion falsus</i> (10) Cruz del Muchacho, Gómez Farías, Jalisco.	2012 Black dehydrated conserved in gel caps / Negros, deshidratados y conservados en cápsulas de gel	10 with bacilli and microsporidia / 10 con bacilos y microsporidios

\* When the species is not indicated is due to the lack of adults in the sample or adequate taxonomic keys.

\*Cuando la especie no se indica es debido a la falta de adultos en la muestra o de claves taxonómicas adecuadas.

**Table 1. Microscopic diagnosis (400X and 1000X with phase contrast or darkfield) of cadaver samples of Diprionidae larvae collected in regions of Mexico.**

**Cuadro 1. Diagnóstico microscópico (400X y 1000X con contraste de fases o campo oscuro) de muestras de cadáveres de larvas de Diprionidae recolectadas en regiones de México.**

Sample/ Muestra	Sample identification and number of individuals examined (n)* / Identificación de la muestra y número de individuos examinados (n)*	Comments and collection date / Observaciones y fecha de recolección	Result / Resultado
14	<i>Zadiprion</i> spp. (41) Unión de San Isidro de Montes de Oca, Sierra de Ixtapa, Guerrero.	2019 Collected from needles on low branches. Black, flat and hard or leathery bodies / Recolectadas en acículas de ramas bajas. Cuerpos negros, aplanados y duros o coriáceos.	1 with highly abundant polyhedra 3 with few polyhedra, long bacillus, and microsporidia. 37 with scarce polyhedra, small ovoid bacillus / 1 con poliedros muy abundantes; 3 con pocos poliedros, bacilo largo y microsporidios; 37 con poliedros escasos, bacilo ovoide pequeño.
15	<i>Zadiprion</i> spp. (187) Unión de San Isidro de Montes de Oca, Sierra de Ixtapa, Guerrero.	2019 Dry hard cadavers collected at the foot of the trees. 85 incubated in moist chamber. 60 Incubated in PDA. 42 cadavers examined under optical microscope / Cadáveres duros y secos recolectados al pie de los árboles. 85 incubados en cámara húmeda y 60 en PDA. 42 cadáveres examinados con microscopio óptico.	145 with contaminating fungi. Medium bacillus and a <i>Beauveria bassiana</i> strain. 38 with abundant polyhedra, 4 cocci and bacilli / 145 con hongos contaminantes. Bacilo mediano y una cepa de <i>Beauveria bassiana</i> . 38 con abundantes poliedros, 4 con cocos y bacilos.
16	<i>Monoctenus cuauhtemoci</i> (25) Ixcateopan, Guerrero.	28/05/19 Hard cadavers. Larvae transported by commercial service and died during transport / Cadáveres duros. Larvas transportadas por un servicio comercial y muertas durante su traslado al laboratorio	1 with polyhedra 6 with abundant cocci 10 with few cocci. 8 with cocci, microsporidia, and bacilli / 1 con poliedros 6 con numerosos cocos 10 con pocos cocos 8 con cocos, microsporidios y bacilos
17	<i>Monoctenus cuauhtemoci</i> (75) Ixcateopan, Guerrero.	28/05/19 Hard cadavers Collected live but died during transport / Cadáveres duros Larvas muertas durante su traslado al laboratorio.	3 with scarce polyhedra 72 with cocci / 3 con poliedros escasos y 72 con cocos
18	<i>Zadiprion ojedae</i> (30) Guachochi, Chihuahua.	2019 Hard, flat cadavers / Cadáveres duros y aplanados	8 with polyhedra and cocci 22 with cocci and/or hyphae / 8 con poliedros y cocos 22 con cocos o hifas
19	<i>Zadiprion borjai</i> (21) Miquihuala, Tamaulipas.	13/12/2017 Died during transport from Tamaulipas to Texcoco. Hard, flat bodies / Las larvas murieron durante su transporte de Tamaulipas a Texcoco. Cadáveres duros y planos.	13 with polyhedra 8 with cocci / 13 con poliedros 8 con cocos

\* When the species is not indicated is due to the lack of adults in the sample or adequate taxonomic keys.

\*Cuando la especie no se indica es debido a la falta de adultos en la muestra o de claves taxonómicas adecuadas.

**Table 1. Microscopic diagnosis (400X and 1000X with phase contrast or darkfield) of cadaver samples of Diprionidae larvae collected in regions of Mexico. (cont.)**

**Cuadro 1. Diagnóstico microscópico (400X y 1000X con contraste de fases o campo oscuro) de muestras de cadáveres de larvas de Diprionidae recolectadas en regiones de México. (cont.)**

Sample/ Muestra	Sample identification and number of individuals examined (n)* / Identificación de la muestra y número de individuos examinados (n)*	Comments and collection date / Observaciones y fecha de recolección	Result / Resultado
20	<i>Monoctenus sanchezii</i> (5) Armadillo de los Infante, San Luis Potosí.	17/09/2011 Firm, but soft, cylindrical, brownish yellow cadavers / Cadáveres firmes, pero blandos, cilíndricos y de color amarillo pardo	1 with abundant polyhedra 1 with very few polyhedra 3 with cocci / 1 con numerosos poliedros 1 con muy pocos poliedros 3 con cocos
21	<i>Neodiprion omosus</i> (5) Los Alamitos, San José, Sierra Fría, Aguascalientes.	08/08/2011 Flat, dry, hard, dark cadavers / Cadáveres aplanados, secos, duros y oscuros	5 with small globose bacilli / 5 con pequeños bacilos globosos
22	<i>Neodiprion autumnalis</i> (9) Guachochi, Chihuahua.	29/05/2012 Firm but soft cylindrical cadavers, brownish yellow in color / Cadáveres cilíndricos firmes pero blandos, de color amarillo pardo	3 with abundant polyhedra 2 with very few polyhedra and cocci 4 with cocci / 3 con numerosos poliedros 2 con muy pocos poliedros y cocos 4 con cocos
23	<i>Neodiprion</i> spp. (8) San Juan Pueblo Nuevo, Parangaricutiro, Michoacán.	September 2011 Hard, dry, dark brown cadavers / Cadáveres duros y secos de color café oscuro	8 with small globular bacilli / 8 con pequeños bacilos globulares

\* When the species is not indicated is due to the lack of adults in the sample or adequate taxonomic keys.

\*Cuando la especie no se indica es debido a la falta de adultos en la muestra o de claves taxonómicas adecuadas.

procedure described by Green and Sambrook (2012). To generate the DIG-NeabNPVPolh probe used in this hybridization assay, 5 µg of the DNA obtained from the miniprep was used, labeled with hapten digoxigenin using the random primer method, following the instructions of the Dig-High prime DNA labeling kit (Roche).

#### DNA extraction from samples

From each field sample, groups of 10 specimens were frozen at -190 °C and ground in a porcelain mortar to a fine powder. From this powder, DNA was extracted using the phenol-chloroform procedure described by Green and Sambrook (2012). DNA from each group of powdered cadavers provided a sample for the DNA hybridization assay.

#### Hybridization assay

Two 100 ng aliquots of DNA from each group of larvae (Table 2) were placed on a nitrocellulose membrane (BioRad) in a Hoeffer PR600 Slot-Blot. Each aliquot was placed in a different slot, so each sample in the assay was processed twice. The pore size of the nitrocellulose membrane was 0.45 µm. DNA was

plásmido PucIDT y se utilizó para transformar una línea de células competentes de *Escherichia coli* HB 101 (Promega Corporation), siguiendo las instrucciones del fabricante (boletín informativo TB092 de Promega). Las bacterias transformadas con el plásmido PucIDT-NeabNPVPolh se incubaron en tubos con 50 mL de medio Luria-Bertani (LB) y 50 µg de ampicilina, a 37 °C durante 18 h con agitación constante. El cultivo bacteriano resultante se procesó para la extracción de ADN del plásmido con el procedimiento miniprep descrito por Green y Sambrook (2012). Para generar la sonda DIG-NeabNPVPolh utilizada en este ensayo se usaron 5 µg del ADN obtenido del miniprep, se marcaron con el hapteno digoxigenina utilizando el método del cebador aleatorio, siguiendo las instrucciones del kit de etiquetado de ADN Dig-High prime (Roche).

#### Extracción del ADN de las muestras

De cada muestra de campo se congelaron grupos de 10 especímenes a -190 °C y se molieron en un mortero de porcelana hasta obtener un polvo fino. De este polvo se extrajo el ADN mediante el procedimiento de fenol-cloroformo descrito por Green y Sambrook (2012). El ADN de cada grupo de cadáveres pulverizados constituyó una muestra para el ensayo de hibridación de ADN.

**Table 2. DNA samples from *Zadiprion ojedae* and *Z. borjai* cadavers subjected to hybridization tests with the DIG-NeabNPVPolh probe. 100 ng of each DNA sample was used in each well. All DNA samples were processed in duplicate.**

**Cuadro 2. Muestras de ADN de cadáveres de *Zadiprion ojedae* y *Z. borjai* sometidas a prueba de hibridación con la sonda DIG-NeabNPVPolh. Se utilizaron 100 ng de cada muestra de ADN en cada pozo. Todas las muestras de ADN se procesaron por duplicado.**

Sample and replication/ Muestra y réplica		Sample description and collecting date/ Descripción de la muestra y fecha de colecta
1	A	DNA from tick ( <i>Rhipicephalus microplus</i> )/ ADN de garrapata ( <i>Rhipicephalus microplus</i> )
	B	
2	A	DNA from healthy <i>Zadiprion</i> sp. cells/ ADN de células sanas de <i>Zadiprion</i> sp.
	B	
3	A	PucIDT-Polh NeabNPV
	B	
4	A	<i>Zadiprion ojedae</i> . Guachi, Chihuahua (140719)
	B	
5	A	<i>Zadiprion borjai</i> . Ejido Servando Canales, Miquihuana, Tamaulipas (090719)
	B	
6	A	<i>Zadiprion ojedae</i> . Guachochi, Chihuahua (060619)
	B	
7	A	<i>Zadiprion ojedae</i> . Guachochi, Chihuahua (060619)
	B	
8	A	<i>Zadiprion ojedae</i> . Guachochi, Chihuahua (100619)
	B	
9	A	<i>Zadiprion borjai</i> . Ejido Servando Canales, Miquihuana, Tamaulipas (090719)
	B	
10	A	<i>Zadiprion ojedae</i> . Guachochi, Chihuahua (100619)
	B	
11	A	<i>Zadiprion ojedae</i> . Guachochi, Chihuahua (190719)
	B	
12	A	<i>Zadiprion ojedae</i> . Guachochi, Chihuahua (190719)
	B	

attached to the membrane by vacuum. Subsequently, the DIG-NeabNPVPolh probe was applied following the procedure described by Green and Sambrook (2012). After the hybridization period, the membranes were washed and treated with alkaline phosphatase pre-labeled monoclonal antibodies and revealing reagents included in the Dig-High prime DNA labeling kit, following the product instructions. When necessary, the concentration of DNA in the working solutions was quantified using a NanoDrop® by reading the absorbance of each aliquot at 260 nm.

#### **Biological activity assays of baculoviral inocula**

One cadaver from each of five samples (4, 7, 8, 14, and 16; Table 1) was used as inoculum source to treat a group of healthy larvae. Inocula were prepared by macerating the donor cadaver with a micropistil in 1.5 mL Eppendorf tubes with distilled, sterilized water (1.0 mL) and 0.05 % Tween 80. The inoculum obtained

#### **Ensayo de hibridación**

Dos alícuotas de 100 ng de ADN de cada grupo de larvas (Cuadro 2) se colocaron en una membrana de nitrocelulosa (BioRad) en un Slot-Blot Hoeffler PR600. Cada alícuota se colocó en una ranura diferente, por lo que cada muestra en el ensayo se procesó dos veces. El tamaño de los poros de la membrana de nitrocelulosa fue de 0.45 µm. El ADN se fijó a la membrana mediante vacío. Posteriormente se aplicó la sonda DIG-NeabNPVPolh siguiendo el procedimiento descrito por Green y Sambrook (2012). Tras el periodo de hibridación, las membranas se lavaron y se trataron con anticuerpos monoclonales marcados previamente con fosfatasa alcalina y reactivos de revelado incluidos en el kit Dig-High prime DNA labeling, siguiendo las instrucciones del producto. Cuando fue necesario, se cuantificó la concentración de ADN en las soluciones de trabajo utilizando un NanoDrop®, leyendo la absorbancia de cada alícuota a 260 nm.



from each of the first four donor cadavers was applied on larvae (19 to 22) of *Zadiprion* spp. from Xicotetes, Atzalán, Veracruz, while the fifth inoculum was used on 145 larvae of *Monoctenus cuauhtemoci* (De Lira et al., 2022) from Ixcateopan de Cuauhtémoc, Guerrero (Table 3). A control group of 20 healthy larvae was used for inocula 4, 7, 8 and 14, while another of 100 healthy larvae was used for inoculum 16. In the latter case, the field inoculum was increased by several healthy larvae from the same locality, one year earlier. The abundance of baculovirus polyhedra was different in each donor cadaver.

The larvae treated (both *Zadiprion* spp. and *M. cuauhtemoci*) were inoculated by impregnating baits made of their natural diet (pine needles or branchlets of *Juniperus flacida* Schltdl., respectively). The baits were impregnated by immersion of pieces of pine needles or branchlets of *J. flacida* (about 6 cm long) in the macerate, with the respective inoculum. The control groups were immersed in distilled water. The baits were stuck in floral sponge (cubes of approximately 2 x 2 x 2 cm) saturated with distilled water to keep them alive, turgid and erect, while the larvae fed on them. The baits were then placed inside cylindrical transparent plastic enclosures of approximately 10 x 10 cm (diameter x height). These containers were provided with ventilation holes of approximately 1.0 cm in diameter, covered with fine mesh fabric. When the larvae consumed the baits impregnated with inoculum, fresh food (not impregnated with inoculum) was provided. Containers were placed in an insectary with 12:12 h (light: dark), temperature of 25 °C, and relative humidity of 70 %. Every day the treated larvae were checked to collect those that had died, preserve them in containers by dehydration with silica gel, and then freeze them.

## Results

### Sample collection

In the field, several sawfly outbreaks were detected in 10 Mexican regions located into 8 Mexican states (Aguascalientes, Chihuahua, Durango, Guerrero, Jalisco, Michoacán, San Luis Potosí and Tamaulipas). From those outbreaks, 23 samples of larvae suspected of being infected by baculovirus were collected (Table 1). These samples included eight species of sawflies (*Zadiprion falsus* Smith, *Z. ojedae*, *Z. borjai*, *Zadiprion* spp., *M. sanchezii* Smith, *M. cuauhtemoci*, *Neodiprion omosus* Smith, *N. autumnalis* Smith, and *Neodiprion* spp.). Other species may be present in the four samples where neither genus nor species was determined because no adults were obtained from the corresponding population, or in the other five samples whose adults were not in accordance with the descriptions of the taxonomic keys, probably because they are new species.

### Ensayos de actividad biológica de inóculos baculovíricos

Un cadáver de cada una de las cinco muestras de campo (4, 7, 8, 14 y 16; Cuadro 1) probadas se utilizó como fuente de inóculo para tratar un grupo de larvas sanas. Los inóculos se prepararon macerando el cadáver donante con un micropistilo en tubos Eppendorf de 1.5 mL con agua destilada y esterilizada (1.0 mL) y 0.05 % de Tween 80. El inóculo obtenido de cada uno de los cuatro primeros cadáveres donantes se aplicó en larvas (19 a 22) de *Zadiprion* spp. procedentes de Xicotetes, Atzalán, Veracruz, mientras que el quinto inóculo se utilizó en 145 larvas de *Monoctenus cuauhtemoci* (De Lira et al., 2022) procedentes de Ixcateopan de Cuauhtémoc, Guerrero (Cuadro 3). Un grupo control de 20 larvas sanas se utilizó para los inóculos 4, 7, 8 y 14 mientras que otro de 100 larvas sanas se utilizó para el inóculo 16. En este último caso, el inóculo de campo se incrementó en varias larvas sanas de la misma localidad, un año antes. La abundancia de poliedros de baculovirus fue diferente en cada cadáver donante.

Las larvas tratadas (tanto de *Zadiprion* spp. como de *M. cuauhtemoci*) fueron inoculadas mediante la impregnación de cebos de su dieta natural (acículas de pino o ramitas de *Juniperus flacida* Schltdl., respectivamente). La impregnación se hizo sumergiendo los trozos de acículas de pino (aproximadamente 8 cm de largo) o las ramitas de *J. flacida* (4 cm) en el macerado del inóculo respectivo. Los grupos de control se sumergieron en agua destilada. Ambos cebos fueron clavados en esponja floral (cubos de aproximadamente 2 x 2 x 2 cm) saturada con agua destilada para mantenerlos vivos, turgentes y erguidos, mientras las larvas se alimentaban de ellos. Los cebos fueron colocados dentro de confinamientos cilíndricos de plástico transparente de 10 x 10 cm (diámetro x altura), aproximadamente. A dichos confinamientos se les habilitaron orificios de ventilación de 1.0 cm de diámetro, aproximadamente, cubiertos con malla fina de tela. Cuando las larvas consumieron los cebos impregnados con el inóculo, se proveyó nuevo alimento limpio (no impregnado con el inóculo). Los confinamientos se colocaron en un insectario con 12:12 h (luz: oscuridad), temperatura de 25 °C y humedad relativa de 70 %. Todos los días se revisaron las larvas tratadas para recoger las que habían muerto, conservarlas en recipientes mediante deshidratación con silica gel y luego congelarlas.

## Resultados

### Recolección de muestras y detección de infección por baculovirus

En el campo se detectaron diferentes brotes de mosca sierra en 10 regiones comprendidas en ocho estados de la república mexicana (Aguascalientes, Chihuahua, Durango, Guerrero, Jalisco, Michoacán, San Luis Potosí

### Molecular detection

The DIG-NeabNPVPolh probe hybridized with its homologous sequence from the positive control (NeabNPVPolh sequence) placed in wells 3A and 3B in Figure 2 but did not produce significant signal in the two negative controls: tick DNA (1A and 1B) and DNA from healthy *Zadiprion* spp. cell culture (wells 2A and 2B). The test showed significant reaction consistent with DNA from three *Z. ojedae* subsamples from Guachochi, Chihuahua (wells 4A and 4B; 8A and 8B; and 12A and 12B in Figure 2). The remaining samples did not show consistent responses between replications; therefore, they were considered negative.

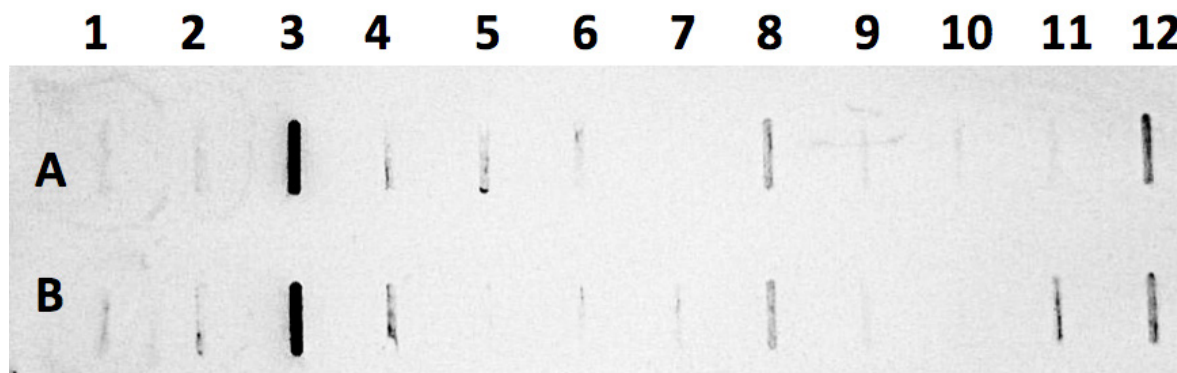
### Detection of baculoviral infection by light microscopy

Small shiny bodies were found in frotises of larval abdominal tissue observed under the microscope (Figure 3); their brightness, shape and abundance made them compatible with baculoviral polyhedra and different from other shiny objects also present in the frotises. These baculoviral polyhedra were detected in cadavers from 11 field samples (4, 7, 8, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 and 22) taken from five Mexican states: Chihuahua, Durango, Guerrero, San Luis Potosí and Tamaulipas (Table 1). The cadavers with polyhedra also presented other microorganisms such as bacteria (cocci

y Tamaulipas), cuya ubicación se indica en la (Figura 1). De dichas infestaciones se colectaron 23 muestras de larvas sospechosas de portar infección baculovírica (Cuadro 1). Estas muestras incluyeron, al menos, nueve especies de moscas sierra (*Z. falsus* Smith, *Z. ojedae*, *Z. borjai*, *Zadiprion* spp., *M. sanchezii* Smith, *M. cuauhtemoci*, *Neodiprion. omosus* Smith, *N. autumnalis* Smith y *Neodiprion* spp.). Es posible que haya más especies en las cuatro muestras en las que no se determinó el género ni la especie porque no se obtuvieron adultos de la población correspondiente o en las otras cinco muestras cuyos adultos no se ajustaron a las descripciones de las claves taxonómicas, probablemente porque se trata de especies nuevas (Figura 1).

### Detección molecular

La sonda DIG-NeabNPVPolh hibridó con su secuencia homóloga del control positivo (secuencia NeabNPVPolh) colocada en los pozos 3A y 3B de la Figura 2, pero no produjo señal significativa en los dos controles negativos: el ADN de garrapata (1A y 1B) y el ADN del cultivo celular de *Zadiprion* spp. sano (pozos 2A y 2B). La prueba mostró reacción significativa consistente con el ADN de tres muestras de *Z. ojedae* de Guachochi, Chihuahua (pozos 4A y 4B; 8A y 8B; y 12A y 12B en la Figura 2). Las muestras restantes no mostraron respuestas consistentes entre réplicas, por lo tanto, se consideraron negativas.



**Figure 2.** Hybridization assay of DNA from Diprionidae larval cadavers on a nitrocellulose membrane. The sequence of the NeabNPV Polh gene (741 bp), replicated in the PucIDT plasmid and labeled with digoxigenin, was used as a probe. 100 ng of DNA was used in each well. Each sample was formed from 10 cadavers of *Zadiprion ojedae* and *Z. borjai* larvae collected in the field and suspected of carrying baculoviral infection. Hybridization was detected by enzyme-linked immunosorbent reaction using a chromogenic substrate that produces a dark staining.

**Figura 2.** Ensayo de hibridación de ADN procedente de cadáveres de larvas de Diprionidae realizado en una membrana de nitrocelulosa. Como sonda se utilizó la secuencia del gen Polh de NeabNPV (741 pb), replicado en el plásmido PucIDT y marcado con digoxigenina. Se utilizaron 100 ng de ADN en cada pozo. Cada muestra se formó con 10 cadáveres de larvas de *Zadiprion ojedae* y *Z. borjai* recolectadas en el campo y sospechosas de portar infección baculovírica. La hibridación se detectó mediante una reacción inmunoenzimática utilizando un sustrato cromogénico que produce una coloración oscura.

or bacilli) (Figure 3), microsporidia, or fungi. Frequently, two or more of these groups of microorganisms were found in each cadaver concomitant with polyhedra.

### Biological activity of cadaveric inocula

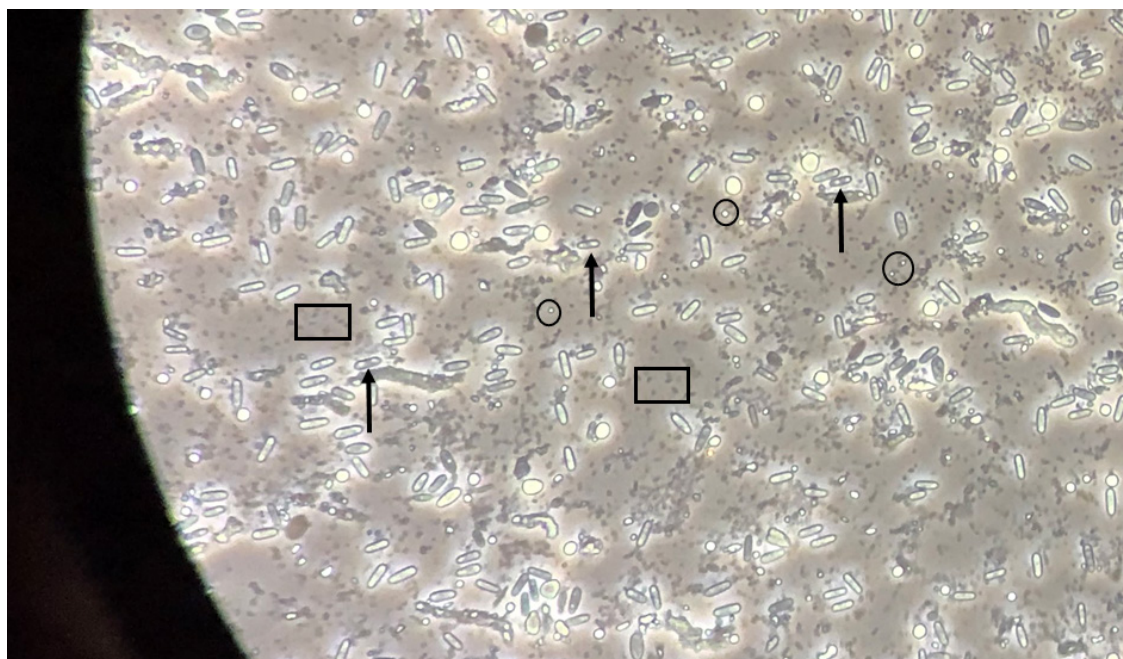
The cadaveric inocula explored induced symptoms and signs of disease compatible with baculoviral or bacterial infections: test larvae stopped feeding, gradually lost motility and died with generalized darkening of the body or localized in their abdominal area. In contrast, about 85 % of the larvae in the control groups reached the pupal stage or remained healthy until the last treated larva died. Microscopic examination of most of the cadavers resulting from larvae treated with inocula 4 and 14 showed abundant polyhedra (in 17 of 19 and 22 of 22, respectively). According to Table 3, inocula 7 and 8 induced sparse polyhedra in few cadavers (in 1 of 20 and in 6 of 20, respectively). Inoculum 16 induced a moderate frequency of polyhedra in the resulting cadavers (33 out of 145). All macerates induced, in addition to polyhedra, proliferation of other microorganisms distinguishable under light

### Detección de la infección baculovírica por microscopía óptica

Se encontraron pequeños cuerpos brillantes en los frotis de tejido abdominal de larvas observados en el microscopio (Figura 3); su brillo, forma y abundancia los hicieron compatibles con poliedros baculovíricos y diferentes de otros objetos brillantes también presentes en los frotis. Esos poliedros baculovíricos se detectaron en cadáveres de 11 muestras de campo (4, 7, 8, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 22) tomadas de cinco estados mexicanos: Chihuahua, Durango, Guerrero, San Luis Potosí y Tamaulipas (Cuadro 1). Los cadáveres con poliedros también presentaron otros microorganismos como bacterias (cocos o bacilos) (Figura 3), microsporidios u hongos. Con frecuencia dos o más de estos grupos de microorganismos fueron encontrados en cada cadáver.

### Actividad biológica de inóculos cadavéricos

Los inóculos cadavéricos explorados indujeron síntomas y signos de enfermedad compatibles con infecciones



**Figure 3.** Macrophotographic section taken from a frotis of the abdominal region of a cadaver of *Monoctenus cuauhtemoci* from Ixcateopan de Cuauhtémoc, Guerrero (sample 16 in Table 1). Phase contrast illumination and 400X magnification were used for this image. The circles surround small shiny bodies interpreted as baculoviral polyhedra. Arrows point to bacillary bacterial cells with a shiny body at each end, suggesting that they may belong to some variant of *Bacillus thuringiensis*. Rectangles surround cocci-like bacteria.

**Figura 3.** Sección de macrofotografía tomada a un frotis de la región abdominal de un cadáver de *Monoctenus cuauhtemoci* de Ixcateopan de Cuauhtémoc, Guerrero (muestra 16 en el Cuadro 1). Para esta imagen se utilizó iluminación de contraste de fases con 400X. Los círculos rodean pequeños cuerpos brillantes interpretados como poliedros baculovíricos. Las flechas señalan células bacterianas bacilares con un cuerpo brillante en cada uno de sus extremos, lo que sugiere que pueden pertenecer a alguna variante de *Bacillus thuringiensis*. Los rectángulos rodean bacterias similares a los cocos.

**Table 3. Inoculation of *Zadiprion* spp. and *Monoctenus cuauhtemoci* larvae with macerate from polyhedra-bearing cadavers. Most of the treated larval cadavers had more than one type of microorganism simultaneously.**

**Cuadro 3. Inoculación de larvas de *Zadiprion* spp. y *Monoctenus cuauhtemoci* con macerado de cadáveres con poliedros baculovíricos. La mayoría de los cadáveres de larvas tratadas presentaron más de un tipo de microorganismo de forma simultánea.**

Inoculum source/ Fuente de inóculo	Characteristics of resulting cadavers/ Características de los cadáveres resultantes	Cadaver diagnosis (n/treated)/ Diagnóstico de los cadáveres (n/tratados)
Inoculation of <i>Zadiprion</i> spp. de <i>Xicotés</i> larvae, Atzalán, Veracruz/ Inoculación de larvas de <i>Zadiprion</i> spp. de <i>Xicotés</i> , Atzalán, Veracruz		
<i>Zadiprion falsus</i> El Pochón, Pueblo Nuevo, Durango (Sample 4 from Table 1)/ (muestra 7 del Cuadro 1).	Flat dark bodies/ Cuerpos aplanados y oscuros	Abundant polyhedra (17/19) Bacilli: small (10/19) and medium (8/19)/ Poliedros abundantes (17/19) Bacilos pequeños (10/19) y medianos (8/19)
<i>Zadiprion</i> spp. "Virus" Zerahuaran, Guachochi, Chihuahua (Sample 7 from Table 1)	Some with liquified bodies and others flat/ Algunos con cuerpos licuados y otros aplanados	Very few polyhedra (1/20) Bacilli: small (6/20), medium (5/20) and large (8/20) Fungal hyphae (13/20), and cocci (2/20)/ Muy pocos poliedros (1/20) Bacilos pequeños (6/20), medianos (5/20) y grandes (8/20) Hifas fúngicas (13/20) y cocos (2/20)
<i>Zadiprion falsus</i> "Virus" cage 16, El Pochón, Pueblo Nuevo, Durango (Sample 8 from Table 1)/ (muestra 8 del Cuadro 1)	Bodies flat and dark, some liquefied/ Cuerpos aplanados y oscuros, algunos licuados	Scarce polyhedra (6/20) Bacilli: small (20/20), medium (9/20) cocci (1/20)/ Poliedros escasos (6/20)/ Bacilos pequeños (20/20) y medianos (9/20) Cocos (1/20)
<i>Zadiprion</i> spp. Hard cadaver. Ixtapa, Guerrero (Sample 14 from Table 1)/ (muestra 14 del Cuadro 1)	Flat bodies/ Cuerpos aplanados	Polyhedra (22/22) Bacilli: small (2/22), medium (6/22), large (10/22)/ Poliedros (22/22) Bacilos pequeños (2/22), medianos (6/22) y grandes (10/22)
Inoculation of <i>Monoctenus cuautemoci</i> larvae from Ixcateopan de Cuauhtemoc, Guerrero/ Inoculación en larvas de <i>Monoctenus cuauhtemoci</i> de Ixcateopan de Cuauhtémoc, Guerrero		
<i>Monoctenus cuauhtemoci</i> Ixcateopan de Cuauhtémoc, Guerrero. Hard cadaver (Sample 16 from Table 1)/ (muestra 16 del Cuadro 1)	Flat bodies. Inoculum incremented in <i>M. cuauhtemoci</i> from Ixcateopan, Guerrero/ Cuerpos aplanados. Incremento del inóculo en <i>Monoctenus</i> de Ixcateopan, Guerrero	Polyhedra (33/145) Small bacilli (54/145) Medium bacilli (22/145) Hyphae (18/145)/ Poliedros (33/145) Bacilos pequeños (54/145) y medianos (22/145) Hifas (18/145)

microscopy at 400X or 1000X and phase contrast or darkfield illumination. Such microorganisms were bacilli (small, medium or large), cocci, microsporidia or fungal hyphae. All of these constituted the accompanying microbiota of the polyhedra in the field samples and in the cadavers resulting from this assay, part of which is shown in Figure 3. The accompanying microbiota in most of the larvae treated with inocula

baculovíricas o bacterianas: las larvas de prueba dejaron de alimentarse, perdieron gradualmente la movilidad y murieron con un oscurecimiento generalizado del cuerpo o localizado en su zona abdominal. En contraste, alrededor de 85 % de las larvas de los grupos de control alcanzaron el estado de pupa o se mantuvieron sanas hasta el momento en que murió la última larva tratada. En el examen microscópico de la mayoría de

4 and 14 were bacilli. Thirteen of the 20 larvae treated with inoculum 7 showed proliferation of fungal hyphae similar to those observed in the inoculum donor cadaver and bacteria (Table 3). Three other cadavers from larvae treated with inoculum 7 or 8 showed cocci-like bacteria (Table 3). Most of the larvae treated with inoculum 16 showed small to medium-sized bacilli or fungal hyphae.

## Discussion

Positive evidence in favor of the working hypothesis was obtained: baculoviral infections were detected in 11 of the 23 sawfly samples explored; inocula were obtained from the infected samples; five inocula were tested, of which two showed great potential for developing bioinsecticides based on baculoviruses. In this study, the appearance of sawfly larvae affected by baculovirus differed from that observed in lepidopteran larvae. Other pathogenic microorganisms such as bacilli, cocci, microsporidia, and fungi were also present in the cadavers together with the viruses.

### Detection of baculoviral infections

The microscopic diagnosis of larval cadaveric frotises at 400X and 1000X indicated the presence of small shiny bodies in 11 of the 23 field samples, which were interpreted as baculoviral polyhedra based on their brightness, shape, and relative abundance (Table 1). The samples harboring baculoviral infections comes from 6 of the 11-collection region explored, into five Mexican states. Eight sawfly species were represented in the samples harboring baculoviral polyhedra: *Z. falsus*, *Z. ojedae*, *Zadiprion borjai*, *Zadiprion* spp., *M. sanchezii*, *M. cuauhtemoci*, *N. omosus*, and *N. autumnalis* (Table 1), which are distributed in three genera.

The interpretation of those shiny bodies as baculoviral polyhedra is supported by two pieces of evidence provided in this study. 1) Successful induction of disease in healthy larvae inoculated with any of five macerates of cadavers harboring polyhedra and the subsequent proliferation of polyhedra in the cadavers resulting from such inoculations (Table 3). 2) Hybridization of three DNA subsamples from the *Z. ojedae* population located in Guachochi, Chihuahua (locus 4, 8, and 12 in Figure 2) with the DIG-NeabNPVPolh probe, indicating the presence of baculoviral DNA in the samples. Other larvae from Guachochi's *Z. ojedae* population showed polyhedra on microscopic examination (sample 18, Table 1). In agreement with this evidence, the small shiny bodies observed in cadavers of the other 10 samples (Table 1) not used in this hybridization test were also interpreted as baculoviral polyhedra: 4 and 8 (*Zadiprion falsus*); 7, 14, 15 (*Zadiprion* spp.); 19 (*Z. borjai*); 16 and 17 (*M. cuauhtemoci*); 20 (*M. sanchezii*); and 22 (*N. autumnalis*).

los cadáveres resultantes de las larvas tratadas con los inóculos 4 y 14 se observaron abundantes poliedros (en 17 de 19 y en 22 de 22, respectivamente). De acuerdo con el Cuadro 3, los inóculos 7 y 8 indujeron poliedros escasos en pocos cadáveres (en 1 de 20 y en 6 de 20, respectivamente). El inóculo 16 indujo una frecuencia moderada de poliedros en los cadáveres resultantes (33 de 145). Todos los macerados indujeron, además de los poliedros, proliferación de otros microorganismos diferenciables bajo el microscopio óptico a 400X o 1000X con contraste de fases o campo oscuro. Tales microorganismos fueron bacilos (pequeños, medianos o grandes), cocos, microsporidios o hifas de hongos. Todos ellos constituyeron la microbiota acompañante de los poliedros en las muestras de campo y en los cadáveres resultantes de este ensayo, parte de la cual es mostrada en la Figura 3. La microbiota acompañante en la mayoría de las larvas tratadas con los inóculos 4 y 14 fueron bacilos. Trece de las 20 larvas tratadas con el inóculo 7 mostraron proliferación de hifas fúngicas similares a las observadas en el cadáver donante del inóculo y las bacterias (Cuadro 3). Otros tres cadáveres de las larvas tratadas con los inóculos 7 u 8 mostraron bacterias tipo cocos (Cuadro 3). La mayoría de las larvas tratadas con el inóculo 16 presentaron bacilos pequeños o medianos o hifas fúngicas.

## Discusión

Se obtuvieron pruebas positivas a favor de la hipótesis de trabajo: se detectaron infecciones baculovíricas en 11 de las 23 muestras de moscas sierra exploradas; se obtuvieron inóculos de las muestras infectadas; se probaron cinco inóculos, de los cuales dos mostraron gran potencial para el desarrollo de bioinsecticidas basados en baculovirus. En este estudio, el aspecto de las larvas de moscas sierra afectadas por baculovirus difirió del observado en larvas de lepidópteros. Otros microorganismos patógenos como bacilos, cocos, microsporidios y hongos estuvieron presentes en los cadáveres junto con los virus.

### Detección de infecciones por baculovirus

El diagnóstico microscópico de los frotis de cadáveres larvarios a 400X y 1000X indicó la presencia de pequeños cuerpos brillantes en 11 de las 23 muestras de campo, los cuales fueron interpretados como poliedros de baculovíricos por su brillo, forma y abundancia relativa (Cuadro 1). Ocho especies de moscas sierra están representadas en las muestras portadoras de poliedros baculovíricos: *Z. falsus*, *Z. ojedae*, *Z. borjai*, *Zadiprion* spp., *M. sanchezii*, *M. cuauhtemoci*, *N. omosus* y *N. autumnalis* (Cuadro 1), las cuales se distribuyen en tres géneros.

La interpretación de esos cuerpos brillantes como poliedros baculovíricos está respaldada por dos pruebas aportadas en este estudio. 1) La inducción exitosa de la

The DIG-NeabNPVPolh probe is considered highly specific for detecting the sawfly nucleopolyhedrovirus polyhedrin gene, as its sequence, the same as that of the NeabNPV Polh gene, only differs by 5 % from the homologous sequence of any of the other known nucleopolyhedroviruses in Diprionidae; for example, those of *N. lecontei* (NeleNPV) and *N. sertifer* (NeseNPV) (Lauzon et al., 2006). That maximum expected divergence between the probe used here and its target DNA does not represent an impediment to hybridization, as suggested by the successful use of other probes in detecting their respective DNA targets with divergences >20 % (Meier-Kolthoff et al., 2014).

### Cadaver appearance (*rictus mortem*)

In the literature, the only description found of baculovirus-induced *rictus mortem* in these insects indicates that larvae hang from their hind legs (Dixon, 2019). Based on that description and this working group's experience with baculoviral infections in Lepidoptera, we searched for sawfly larval cadavers with that appearance in field. They were expected to be dark, and flattened with liquefied internal tissues, as described for lepidopteran larvae killed by baculoviruses (Federici, 1997). Although larvae with liquefied internal tissues were observed in three of the first samples with polyhedra, subsequent samples showed that this appearance is the least frequent in baculovirus-killed diprionids. Two samples from the same population of *Zadiprion* spp. (14 and 15; Table 1 and Figure 4) clearly show that the most common consistency of Diprionidae cadavers with polyhedra differs from that commonly observed in Lepidoptera (hanging from their hind legs, liquefied, and flattened).

The first of these samples, number 14 (Table 1; Figures 4A and 4B), consisted of cadavers found on needles of low branches of pine trees. They were either hanging by their hind legs or fell from the highest branches; their bodies were flattened, black in color and had a leathery or hard consistency. Only one of them showed abundant polyhedra, while the other 40 showed few or scarce polyhedra. About 97 % of the cadavers in this sample presented bacilli as the dominant microorganism, so their death was attributed to bacillus and not to virus, despite the presence of the latter in the cadavers.

Cadavers in sample 15 (Table 1; Figures 4C, 4D and 4E) were found on the ground at the foot of pine trees. It is assumed that they climbed down the trunk before dying, possibly to pupate. The cadavers were found dry and hard (not liquefied), retaining their cylindrical shape and, most of them, even their natural color (yellowish), while others showed black areas on their body. Because these characteristics suggest a fungal death, the first 145 cadavers examined from that

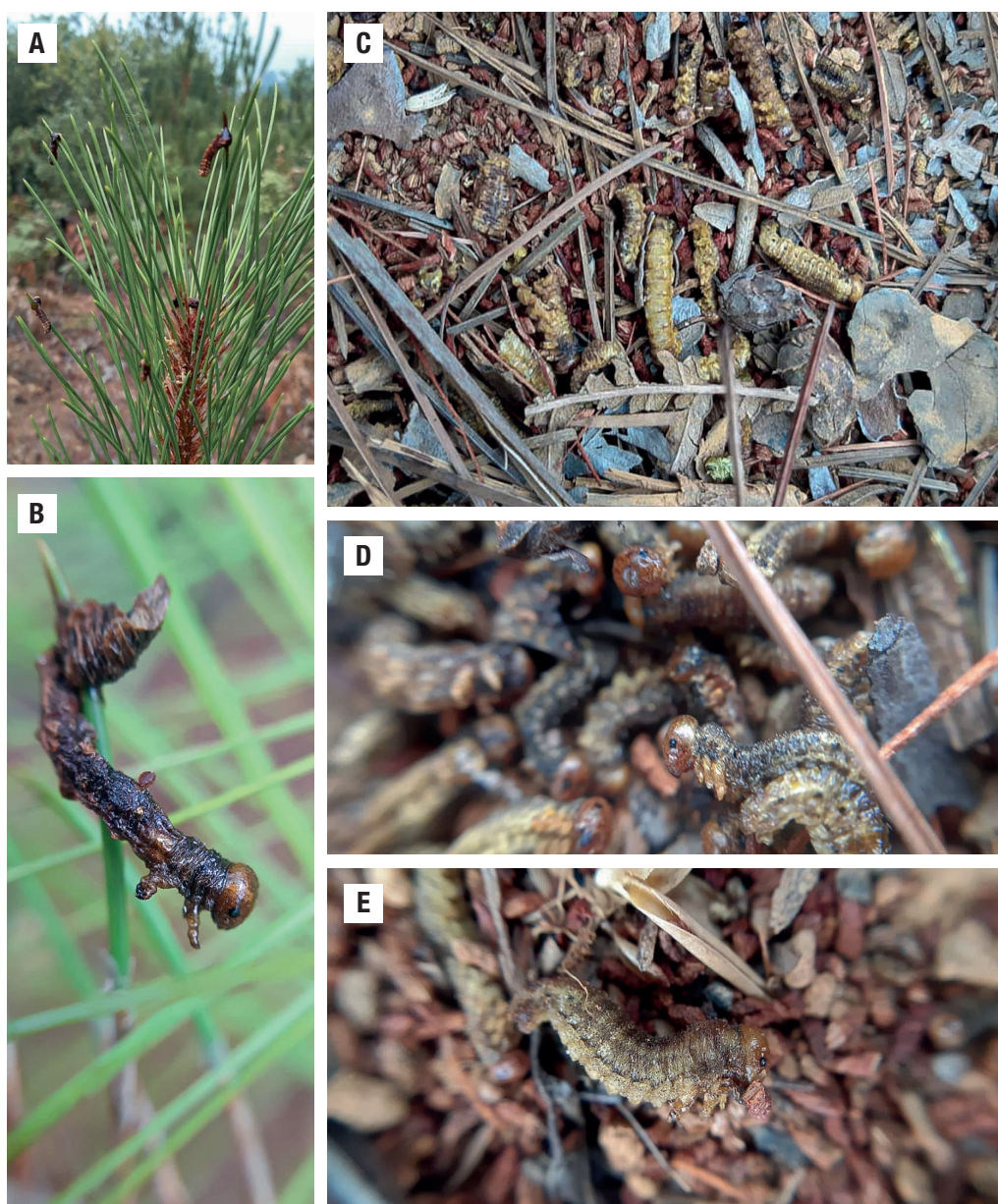
enfermedad en larvas sanas mediante la inoculación de cualquiera de los cinco macerados de cadáveres larvales portadores de poliedros y la proliferación posterior de estos en los cadáveres resultantes de dichas inoculaciones (Cuadro 3). 2) La hibridación de tres submuestras de ADN de la población de *Z. ojedae*, localizada en Guachochi, Chihuahua (locus 4, 8 y 12 de la Figura 2) con la sonda DIG-NeabNPVPolh, que indica la presencia de ADN baculovírico en las muestras. Otras larvas de esta población mostraron poliedros en un examen microscópico (muestra 18, Cuadro 1). De acuerdo con esta evidencia, los pequeños cuerpos brillantes observados en los cadáveres de las otras 10 muestras (Cuadro 1) no incluidas en la hibridación, también se interpretaron como poliedros baculovíricos: 4 y 8 (*Zadiprion falsus*); 7, 14, 15 (*Zadiprion* spp.); 19, *Z. borjai*; 16 y 17 (*Monoctenus cuauhtemoci*); 20 (*M. sanchezii*) y 22 (*Neodiprion autumnalis*).

La sonda DIG-NeabNPVPolh se considera altamente específica para detectar el gen de la poliedrina del nucleopoliedrovirus de las moscas sierra, ya que su secuencia, la misma del gen Polh del NeabNPV, solo difiere 5 % de la secuencia homóloga de cualquiera de los otros nucleopoliedrovirus conocidos en Diprionidae; por ejemplo, las de *N. lecontei* (NeleNPV) y *N. sertifer* (NeseNPV) (Lauzon et al., 2006). Esa máxima divergencia esperada entre la sonda aquí utilizada y su ADN objetivo no representa un impedimento para la hibridación, como sugiere el uso exitoso de otras sondas en la detección de sus respectivos blancos de ADN con divergencias >20 % (Meier-Kolthoff et al., 2014).

### Aspecto de los cadáveres (*rictus mortem*)

En la literatura, la única descripción encontrada sobre el *rictus mortem* inducido por baculovirus en estos insectos simplemente indica que las larvas cuelgan de sus patas traseras (Dixon, 2019). Con base en esa descripción y en la experiencia de nuestro grupo de trabajo con infecciones baculovíricas en lepidópteros, al principio de este trabajo se buscaron cadáveres con esa apariencia en campo. Se esperaba que fueran oscuros, aplanados con tejidos internos licuados, tal como se ha descrito para las larvas de lepidópteros que mueren por baculovirus (Federici, 1997). No obstante que se observaron larvas con tejidos internos licuados en tres de las primeras muestras con poliedros, las muestras posteriores mostraron que esa apariencia es la menos frecuente en los diprionidos muertos por baculovirus. Dos muestras de la misma población de *Zadiprion* spp. (14 y 15; Cuadro 1 y Figura 4) claramente muestran que la consistencia más común de los cadáveres de Diprionidae con poliedros difiere de la observada en lepidópteros (colgados de las patas traseras, con tejidos licuados y cuerpo aplanados).

La primera de estas muestras, la número 14 (Cuadro 1; Figuras 4A y 4B), consistió en cadáveres encontrados



**Figure 4.** Appearance of sawfly (*Zadiprion* spp.) larval cadavers in the field (La Unión de San Isidro Montes de Oca, Sierra de Ixtapa, Guerrero), which carried baculoviral polyhedra. A and B are typical in sample 14; C, D, and E are typical in sample 15 in Table 1. The formers are fully or partially obscured. The latter are only partially obscured, depending on the relative abundance of the accompanying microbiota in the cadavers.

**Figura 4.** Aspecto de cadáveres de larvas de moscas sierra (*Zadiprion* spp.) en campo (Unión de San Isidro de Montes de Oca, Sierra de Ixtapa, Guerrero), las cuales portaban poliedros baculovíricos. A y B son los típicos en la muestra 14; C, D y E son los típicos en la muestra 15 del Cuadro 1. Los primeros se encuentran total o parcialmente oscurecidos. Los segundos están oscurecidos solo parcialmente, dependiendo de la abundancia relativa de la microbiota acompañante en los cadáveres.

sample were placed in a humid chamber or small pieces of them were directly deposited on PDA culture media. Subsequently, for the next 42 cadavers, frotises were prepared from their abdominal region; under light microscopy it was observed that polyhedra dominated over concurrent microbiota in more than 90 % of them (38 of 42), and only four cadavers had cocci and bacilli as dominant microbiota.

en acículas de ramas bajas de los pinos. Los cadáveres estaban colgados de las patas traseras o bien cayeron de las ramas más altas; sus cuerpos estaban aplanados, de color negro y con consistencia correosa o dura. Solo uno de ellos presentó poliedros abundantes, mientras que los otros 40 mostraron pocos o escasos poliedros. Alrededor del 97 % de los cadáveres de esta muestra presentaron bacilos como microorganismo dominante,

When comparing the appearance of *Zadiprion* spp. cadavers in samples 14 and 15 and their accompanying microbiota, it was clear that the flat body and dark color observed in sample 14 were related to the bacilli and not to the virus. Similarly, the hard, cylindrical body of the cadavers in sample 15 was associated with the virus and not with the accompanying microbiota. Another piece of evidence suggesting that baculovirus-killed sawfly larvae remain hard or leathery, but not liquefied, comes from Lucarotti et al. (2007), who describe how they preserve and process large quantities of baculovirus-killed *N. abietis* larvae for the formulation of a bioinsecticide.

The liquefied appearance of the cadavers was observed in one individual from sample 4, in 10 from sample 7 and in 10 from sample 8. The liquefied cadaver from sample 4 showed few cocci and many bacteria and polyhedra; while those from samples 7 and 8 showed few polyhedra, but a lot of accompanying microbiota (Table 1). Subsequently, when the macerate of a cadaver from sample 4 was inoculated into healthy larvae, it induced a high frequency of cadavers with polyhedra (17 out of 19) and a large amount of polyhedra in each cadaver; while a macerate from sample 7 induced only one cadaver with very few polyhedra, but abundant accompanying microbiota in all treated larvae (Table 3). Therefore, in cadavers carrying polyhedra, characteristics such as liquefaction, flattening and darkening of the body, and hanging from the hind legs, appear to be associated with the presence, type, and relative abundance of the accompanying microbiota, but not with baculovirus.

When the baculovirus was the predominant death agent in the sawfly cadavers, most cadavers conserved its cylindrical shape, their bodies were hard and did not hang from their hind legs. This *rictus mortem* is different from that induced by the baculovirus in lepidopteran species: which get liquefied, flattened, torn, and commonly, hang from their hind legs (Federici, 1997). The differences most likely arise from the fact that, in diprionids, only mesenteron cells are attacked (Harrison et al., 2018), leaving the rest of the tissues intact (unless degraded by other microorganisms); while in Lepidoptera, almost all tissues are colonized by the virus, which became liquefied by (Federici, 1997). This description of the *rictus mortem* of sawfly larvae killed by baculoviruses may be useful in future searches for these viruses for controlling forest pests.

### Bioinsecticidal potential of baculoviruses

The five inocula tested showed differential potential as bioinsecticides. Although all of them produced death in all treated larvae, the identification of the agent causing death provides a first appreciation of the relative potential of each inoculum as a bioinsecticide.

por lo que su muerte se atribuyó al bacilo y no al virus, a pesar de la presencia de estos últimos en los cadáveres.

Los cadáveres en la muestra 15 (Cuadro 1; Figuras 4C, 4D y 4E) se encontraron en el suelo, al pie de los pinos. Se asume que bajaron caminando por el tronco antes de morir, posiblemente para pupar. Los cuerpos se encontraron secos y duros (no licuados), conservando su forma cilíndrica y, la mayoría de ellos, incluso su color natural (amarillento), mientras que otros mostraron zonas negras en su cuerpo. Debido a que estas características sugieren una muerte por hongos, los primeros 145 cadáveres examinados de esa muestra se colocaron en una cámara húmeda o pequeños trozos de ellos fueron depositados directamente en medios de cultivo PDA. Posteriormente, para los siguientes 42 cadáveres se prepararon frotis de su región abdominal; bajo microscopio óptico se observó que los poliedros dominaban sobre la microbiota concurrente en más de 90 % de ellos (38 de 42) y solo cuatro cadáveres tuvieron cocos y bacilos como microbiota dominante.

Al comparar el aspecto de los cadáveres en las muestras 14 y 15 de *Zadiprion* spp. y la microbiota acompañante, queda claro que el cuerpo aplanado y el color oscuro observados en la muestra 14 están relacionados con los bacilos y no con el virus. Del mismo modo, el cuerpo duro y cilíndrico de los cadáveres de la muestra 15 se asocia con el virus y no con la microbiota acompañante. Otro dato sugerente de que las larvas de mosca sierra muertas por baculovirus permanecen duras o coriáceas, pero no licuadas, proviene de Lucarotti et al. (2007), quienes describen la manera en la que conservan y procesan grandes cantidades de larvas de *N. abietis* muertas por baculovirus para la formulación de un bioinsecticida.

El aspecto licuado de los cadáveres se observó en un individuo de la muestra 4, en 10 de la muestra 7 y en 10 de la muestra 8. El cadáver licuado de la muestra 4 presentó pocos cocos y muchas bacterias y poliedros; mientras que los de las muestras 7 y 8 mostraron pocos poliedros, pero mucha microbiota acompañante (Cuadro 1). Posteriormente, cuando el macerado del cadáver de la muestra 4 se inoculó en larvas sanas, indujo una frecuencia alta de cadáveres con poliedros (17 de 19) y una gran cantidad de poliedros en cada cadáver; mientras que el macerado de la muestra 7 indujo pocos poliedros en un solo cadáver y abundante microbiota acompañante en todas las larvas tratadas (Cuadro 3). Por lo tanto, en los cadáveres que portan poliedros, características como la licuefacción de tejidos, el cuerpo aplanado y oscurecido y el hecho de que cuelguen de las patas traseras, parecen estar asociadas con la presencia, el tipo o la abundancia relativa de la microbiota acompañante, pero no con el baculovirus.

Cuando el baculovirus fue el agente de mortalidad predominante en los cadáveres de moscas sierras,



Inocula from samples 4 and 14 caused numerous polyhedra to appear on each cadaver and a high proportion of cadavers with polyhedra (17 of 19 and 22 of 22, respectively; Table 3). Samples 7 and 8 caused a small number of polyhedra in each resulting cadaver and only a few cadavers with polyhedra (1 of 20 and 6 of 20, respectively; Table 3).

Inoculum from sample 16 caused polyhedra proliferation in a moderate frequency of cadavers (33 of 145; Table 3). It was assumed that dead larvae that did not show polyhedra were killed by the microbiota that accompanied the virus in the donor cadavers. The ability of, at least one part of the microbiota accompanying the baculovirus to cause death is discussed below. No species of that microbiota was identified, but it was evident that the fungal hyphae observed on the cadavers in this trial do not belong to *Metarhizium* or *Beauveria* genera.

The abundance of polyhedra in the inoculum donor cadavers of samples 4 and 14, on the one hand, and 7 and 8, on the other, maintained a clear correspondence with the abundance of the polyhedra in the cadavers resulting from this test and with the frequency of cadavers bearing polyhedra (Table 3). This correspondence suggests that inocula from samples 4 and 14 have a high potential to be developed as bioinsecticides due to their high infectivity.

The inoculum of sample 14 provided also evidence of having high potential as a natural biocontrol factor in the field where it was collected (La Unión de San Isidro Montes de Oca, Sierra de Ixtapa, Guerrero). Since sample 15 (Table 1) (not included in this test) was taken from the same group of pine trees as sample 14, it is reasonable to assume that both samples harbor the same virus strain and that pathogens found in them performed together at the scene of good control of their host observed in the field. It was, the sawfly population was virtually eliminated by pathogens prior to sampling, and that happened very early in the development of this pest outbreak as suggested both by the appearance of the pupal cocoons found scratching in the ground, and by the evidently reduced extension of the infestation. Only two generations of the pest would have occurred in that place by the sampling time. So early elimination of the outbreak clearly suggests that this inoculum is highly infective on its host.

Both the owner of the field where the sample was collected and the CONAFOR technician (the official in charge of supervising forest health in that area) assured that there was no human intervention in the development of this epizootic. Although several pathogens were detected acting simultaneously (virus,

la mayoría de ellos conservó su forma cilíndrica, su cuerpo fue duro y no colgaban de las patas traseras. Este *rictus mortem* es diferente del inducido por baculovirus en especies de Lepidoptera, los cuales se licúan, se aplanan, se rompen y cuelgan y, comúnmente, cuelgan de sus patas traseras (Federichi, 1997). Las diferencias, muy probablemente, emergen del hecho de que, en diprionidos, solo son atacadas las células del mesenterón (Harrison et al., 2018) dejando el resto de los tejidos intactos (a menos que otros microorganismos los degraden); mientras que en Lepidoptera, casi todos los tejidos son colonizados y licuados por estos virus. Esta descripción del *rictus mortem* causado por baculovirus en moscas sierra puede ser útil en futuras búsquedas de baculovirus de este tipo de plagas forestales.

### Potencial bioinsecticida de baculovirus

Los cinco inóculos analizados mostraron potencial diferenciado como bioinsecticidas. A pesar de que todos ellos produjeron la muerte en todas las larvas tratadas, la identificación del agente causante de la muerte proporciona una primera apreciación del potencial relativo de cada inóculo como bioinsecticida. Los inóculos de las muestras 4 y 14 provocaron la aparición de numerosos poliedros en cada uno de los cadáveres y una proporción elevada de cadáveres con poliedros (17 de 19 y 22 de 22, respectivamente; Cuadro 3), mientras que los de las muestras 7 y 8 provocaron un número reducido de poliedros en cada cadáver y pocos cadáveres con poliedros (1 de 20 y 6 de 20, respectivamente; Cuadro 3).

El inóculo de la muestra 16 provocó la proliferación de poliedros con una frecuencia moderada (33 de 145 larvas; Cuadro 3). Se asumió que las larvas muertas que no mostraban poliedros fueron eliminadas por la microbiota que acompañaba a los virus en los cadáveres de los donantes. Más adelante se analiza la capacidad de provocar la muerte, de al menos parte de la microbiota que acompaña a los baculovirus en las moscas de sierra. No se identificaron especies de la microbiota que acompañaba a los poliedros, pero fue evidente que las hifas fúngicas observadas en los cadáveres de este ensayo no pertenecen a *Metarhizium* ni a *Beauveria*.

La abundancia de poliedros en los cadáveres donantes de inóculo de las muestras 4 y 14, por un lado, y 7 y 8, por otro, mantuvo una correspondencia clara con la abundancia de dichos poliedros en los cadáveres resultantes de esta prueba y con la frecuencia de estos cadáveres portando poliedros (Cuadro 3). Esta correspondencia sugiere que los inóculos de las muestras 4 y 14 tienen alto potencial para ser desarrollados como bioinsecticidas debido a su alta infectividad.

bacteria, and at least one fungus), the virus turned out to be the most frequent in the cadavers collected there.

Regarding the inocula of samples 7, 8, and 16, in the first perception, this test suggests that they have a relatively low potential as bioinsecticides, because they produced a low frequency of cadavers with polyhedra. However, after a detailed look at the result, the expectation of good potential of these inocula as bioinsecticides is maintained for the following reasons: 1) the low frequency of cadavers with polyhedra may be due to the reduced number of polyhedra in donor cadavers; 2) larvae that received inocula 7 or 8 and, most of those receiving inoculum 16, showed abundant accompanying microbiota, but only a few showed some polyhedra suggesting pathogenic capacity in the microbiota; therefore, 3) inevitably, it competed with the virus and could displace it, either due to being more competitive or more abundant.

Based on this reasoning, it seems necessary to carry out further tests to adequately measure the potential of all the inocula obtained, that of the pathogenic microbiota accompanying the viruses, and the interactions between them. Such interactions seem very interesting for the management of these pests because they may involve synergies that should be exploited to achieve greater control of the pest, or antagonisms that should be avoided. In such new trials, it would be desirable to test the viral inocula and the accompanying microbiota, properly purified.

Another reasonable precaution would be to thoroughly search for and evaluate all existing virus strains of each sawfly species. Such evaluation of strains should be done in the stands where their host species is found, and the strain that provides the best control in each location could be used as a means of control in such areas. Failure to do so would run the risk of using, in some areas, a strain with less control potential than that of the resident strain and, due to the flooding application of a less potent exotic strain, the resident strain with greater potential would be displaced. Thus, virus strains with superior potential could be lost due to not having been discovered in a timely manner.

## Conclusions

The results of this study clearly suggest the following three conclusions: 1) there are abundant baculoviral infections in Mexican sawfly populations, as they were present in 11 of 23 field samples; 2) several of the inocula obtained are pathogenic enough to make them promising for developing bioinsecticides based on them; 3) an exhaustive search for the existing baculoviral strains in all sawfly species and a proper selection of the best against each pest species would

El inóculo de la muestra 14 proporcionó también evidencia de tener alto potencial como factor de control natural en el campo donde se recolectó (Unión de San Isidro de Montes de Oca, Sierra de Ixtapa, Guerrero). Debido a que la muestra 15 (Cuadro 1) (no incluida en este ensayo) fue colectada del mismo grupo de pinos que la muestra 14, es razonable asumir que ambas muestras portan la misma cepa viral y que los patógenos encontrados en ellas ejecutaron juntos la escena de buen control de su huésped observada en campo, la cual consistió en eliminar la población huésped antes de la toma de muestras. Dicho control ocurrió muy temprano en el desarrollo de esta infestación, como lo sugiere el aspecto de los cocones pupales encontrados al rasgar el suelo y la evidente poca extensión de la infestación. Se estimó que solo dos generaciones de la plaga habrían ocurrido en esa infestación antes de la toma de muestras. Tan temprana eliminación de la población sugiere, claramente, que este inóculo es altamente infectivo en su huésped.

Tanto el propietario del predio donde se colectaron las muestras 14 y 15, como el técnico de la CONAFOR (el funcionario encargado de supervisar la sanidad forestal de la zona) aseguraron que no hubo intervención humana en el desarrollo de esta epizootia. Aunque varios patógenos fueron detectados actuando simultáneamente (virus, bacteria y al menos un hongo), el virus resultó el más frecuente en esta población.

En lo que respecta a los inóculos de las muestras 7, 8 y 16, en una primera percepción, el resultado de este ensayo sugiere que ellos poseen un potencial relativo bajo como bioinsecticidas, debido a que produjeron baja frecuencia de cadáveres con poliedros. Sin embargo, luego de una mirada detallada del resultado de este ensayo se mantiene la expectativa sobre un buen potencial de dichos inóculos como bioinsecticidas, por las razones siguientes: 1) la baja frecuencia de cadáveres con poliedros puede deberse al número reducido de poliedros en los cadáveres donantes; 2) las larvas que recibieron los inóculos 7 u 8 y, la mayoría de las que recibieron el inóculo 16, mostraron abundante microbiota acompañante, pero solo unas cuantas mostraron algunos poliedros sugiriendo capacidad patogénica en dicha microbiota; por lo tanto, 3) inevitablemente, esta microbiota compitió con el virus y pudo desplazarlo, bien por ser más competitiva o más abundante.

Partiendo de esos razonamientos, parece necesario realizar nuevos ensayos para medir adecuadamente el potencial de dichos inóculos, el de la microbiota patógena que los acompaña y la interacción entre ellos. Esa interacción parece muy interesante para el manejo de estas plagas, porque puede implicar sinergias que conviene aprovechar para conseguir un mayor control

prevent the risk of losing local strains with high control potential as a consequence of flooding its niche with a foreign competitively inferior strain.

### Acknowledgments

We thank the funding from the CONACYT-CONAFOR Sectorial fund, project CONAFOR 2017 CO2 no. 291304. We are also grateful for the facilities provided by the H. Ayuntamiento de Ixcateopan de Cuauhtémoc, Guerrero, and the regidores of Ecología: Víctor Leyva Guerrero and María Dolores Bustamante Cirilo. We thank Dr. Miguel Ángel González González, Dr. Arturo Corrales Suastegui and M. C. Jorge Valdez Carrazco.

### End of English version

### References / Referencias

- Arthurs, S., & Dara, S. K. (2019). Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*, 165, 13–21. doi: 10.1016/j.jip.2018.01.008
- Balla, A., Silini, A., Cherif-Silini, H., Chenari Bouket, A., Moser, W. K., Nowakowska, J. A., ...Belbahri, L. (2021). The threat of pests and pathogens and the potential for biological control in forest ecosystems. *Forests*, 12(11), 1579. doi: 10.3390/f12111579
- De Lira Ramos, K. V., González Gaona, E., & Sánchez Martínez, G. (2021). Características generales de las moscas sierra de las coníferas. In E. González G., & K. V. De Lira R. (Eds.), *Moscas sierra: Taxonomía, fenología, distribución y manejo* (pp. 35–82). Aguascalientes, México: INIFAP-CIRNOC-Campo Experimental Pabellón.
- De Lira-Ramos, K. V., González-Gaona, E., Rodríguez-Cruz, Y. E., Piza-Núñez, E. G., & Gómez-Núñez, J. C. (2022). Nueva especie de *Monoctemus* (Hymenoptera: Diprionidae) ataca *Juniperus flaccida* Schltld. (Cupressaceae) en Guerrero, México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 13(69), 73–94. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v13i69.1093>
- Dixon, W. (2019). Pine sawflies, *Neodiprion* spp. (Insecta: Hymenoptera: Diprionidae). Retrieved from <https://edis.ifas.ufl.edu/pdf%5CIN%5CIN59200.pdf>
- Federici, B. A. (1997). Baculovirus pathogenesis. In L. K. Miller (Ed.), *The Baculoviruses. The Viruses* (pp. 33–59). Springer, Boston, MA: Springer. doi: 10.1007/978-1-4899-1834-5\_3
- González-Gaona, E., Bonilla, T. F., Quiñones, B. S., Sánchez, M. G., Tafoya, R. F., España, L. M. P., ...Robles, U. S. (2014). *Guía para la identificación de moscas sierra de la familia Diprionidae presentes en el centro norte de México*. Mexico: INIFAP. Retrieved from <https://docplayer.es/46918897-Guia-guia-para-la-identificacion-la-identificacion-moscas-sierra-la-familia-diprionidae-de-presentes-moscas-en-el-centro-norte-sierra.html>
- González-Gaona, E., Borja-Nava, H. E., Lira-Ramos, D., Karla, V., Rodríguez-Cruz, Y. E., & Arriola-Padilla, V. J. (2022). Nueva

de la plaga o antagonismos que conviene evitar. En tales nuevos ensayos, sería deseable probar los inóculos virales y la microbiota acompañante, adecuadamente purificados.

Otra precaución razonable sería buscar de manera exhaustiva y evaluar todas las cepas existentes del virus de cada especie de mosca sierra. Dicha evaluación de las cepas debería realizarse en los rodales donde se encuentra su especie hospedadora y la cepa que mejor control proporcione en cada lugar podría utilizarse como medio de control en esas zonas infestadas. De no hacerlo, se corre el riesgo de usar, en algunas zonas, una cepa con menor potencial de control que la residente y, debido a la aplicación inundativa de la cepa exótica menos potente, se desplazaría a la cepa residente con mayor potencial. De este modo, las cepas del virus con potencial superior podrían perderse por no ser descubiertas oportunamente.

### Conclusiones

Los resultados de este estudio sugieren las siguientes tres conclusiones: 1) Hay abundantes infecciones baculovíricas en las poblaciones mexicanas de moscas sierra, ya que estuvieron presentes en 11 de 23 muestras de campo; 2) varios de los inóculos obtenidos son patogénicos, por lo que son prometedores para el desarrollo de bioinsecticidas; y 3) una búsqueda exhaustiva de las cepas baculovíricas en todas las especies de moscas sierra y su apropiada selección contra cada especie plaga prevendría el riesgo de perder cepas locales con alto potencial de control, debido a la inundación de su nicho con cepas exóticas competitivamente inferiores.

### Agradecimientos

Se agradece el apoyo económico del fondo Sectorial CONACYT-CONAFOR, proyecto CONAFOR 2017 CO2 núm. 291304. Así como también se agradece las facilidades prestadas por el H. Ayuntamiento de Ixcateopan de Cuauhtémoc, Guerrero y de los regidores de Ecología: Víctor Leyva Guerrero y María Dolores Bustamante Cirilo. Se agradece al Dr. Miguel Ángel González González, al Dr. Arturo Corrales Suastegui y al M.C. Jorge Valdez Carrazco.

Fin de la versión en español

- especie de mosca sierra del género *Zadiprion* Rohwer (Hymenoptera: Diprionidae) atacando a *Pinus cembroides* (Zucc.) en Tamaulipas, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales*, 28(3), 399–409. doi: 10.5154/r.rchscfa.2021.10.061
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning. A laboratory manual (4th ed)*. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Harrison, R. L., Herniou, E. A., Jehle, J. A., Theilmann, D. A., Burand, J. P., Becnel, J. J., Krell, ...Bauchan, G. R. (2018). ICTV virus taxonomy profile: Baculoviridae. *Journal of General Virology*, 99(9), 1185–1186. Retrieved from <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.001107?crawler=true>
- Hughes, D. S., Possee, R. D., & King, L. A. (1997). Evidence for the presence of a low-level, persistent baculovirus infection of *Mamestra brassicae* insects. *Journal of General Virology*, 78(7), 1801–1805. doi: 10.1099/0022-1317-78-7-1801
- Il'inykh, A. V., & Ul'yanova, E. G. (2005). Latency of baculoviruses. *Biology Bulletin*, 32(5), 496–502. doi: 10.1007/s10525-005-0131-1
- Lauzon, H. A., Garcia-Maruniak, A., Paolo, M. D. A., Clemente, J. C., Herniou, E. A., Lucarotti, C. J., ... Maruniak, J. E. (2006). Genomic comparison of *Neodiprion sertifer* and *Neodiprion lecontei* nucleopolyhedroviruses and identification of potential hymenopteran baculovirus-specific open reading frames. *Journal of General Virology*, 87(6), 1477–1489. doi: 10.1099/vir.0.81727-0
- Lucarotti, C. J., Morin, B., Graham, R. I., & Lapointe, R. (2007). Production, application, and field performance of Abietiv™, the balsam fir sawfly nucleopolyhedrovirus. *Virologica sinica*, 22(2), 163. doi: 10.1007/s12250-007-0018-z
- Meier-Kolthoff, J. P., Hahnke, R. L., Petersen, J., Scheuner, C., Michael, V., Fiebig, A., ... Klenk, H. P. (2014). Complete genome sequence of DSM 30083 T, the type strain (U5/41 T) of *Escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy. *Standards in Genomic Sciences*, 9(1), 1–19. doi: 10.1186/1944-3277-9-2
- Moreau, G., & Lucarotti, C. J. (2007). A brief review of the past use of baculoviruses for the management of eruptive forest defoliators and recent developments on a sawfly virus in Canada. *The Forestry Chronicle*, 83(1), 105–112. doi: 10.5558/tfc83105-1
- Moreau, G., Lucarotti, C. J., Kettela, E. G., Thurston, G. S., Holmes, S., Weaver, C., ...Morin, B. (2005). Aerial application of nucleopolyhedrovirus induce decline in increasing and peaking populations of *Neodiprion abietis*. *Biological Control*, 33(1), 65–73. doi: 10.1016/j.biocontrol.2005.01.008
- Nolasco-Gumeta, A. (2014). *Defoliadores de coníferas de los géneros Zadiprion spp. y Neodiprion spp. existentes en México*. Tesis profesional. Departamento Forestal, División de Agronomía, UAAAN. Saltillo, Coahuila, México.
- Retrieved from <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/3887>
- Olivo, M. J. A. (2011). Brotes epidémicos de diprionidos en la sierra Tarahumara de Chihuahua. M. A. Equihua, & V. Estrada E., J. A. Acuna S., & M. P. Cháires G. (Eds.), *XV Simposio Nacional de Parasitología Forestal*. Oaxaca, México: CONAFOR. Retrieved from [https://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icap/LI\\_IntGenAmb/Juana\\_Fons/8.pdf](https://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icap/LI_IntGenAmb/Juana_Fons/8.pdf)
- Qinghua Wang, Enjie Li, Na Li, Yuzhu Wang, Zhilin Zhang, & Yongan Zhang. (2018). Infection of a nucleopolyhedrovirus to *Neodiprion zhejiangensis* Zhou & Xiao (Hymenoptera: Diprionidae). *Biocontrol Science and Technology*, 28(8), 761–771. doi: 10.1080/09583157.2018.1493089
- Smith, D. R. (1988). A synopsis of the sawflies (Hymenoptera: Symphyta) of America south of the United States: introduction, Xyelidae, Pamphiliidae, Cimbicidae, Diprionidae, Xiphidiidae, Siricidae, Orussidae, Cephidae. *Systematic Entomology*, 13(2), 205–261. doi: 10.1111/j.1365-3113.1988.tb00242.x
- Smith, D. R. (1993). Systematics, life history and distribution of sawflies. In M. R. Wagner, & K. F. Raffa (Eds.), *Sawfly life history adaptations to wood plants* (pp. 3–32). California, USA: Academic Press. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/260798522\\_Systematics\\_life\\_history\\_and\\_distribution\\_of\\_sawflies#fullTextFileContent](https://www.researchgate.net/publication/260798522_Systematics_life_history_and_distribution_of_sawflies#fullTextFileContent)
- Smith, R. D., Sánchez-Martínez, G., & Ordaz-Silva, S. (2010). A new *Monoctenus* (Hymenoptera: Diprionidae) damaging *Juniperus flaccida* (Cupressaceae) in San Luis Potosí, México. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 112(3), 444–450. doi: 10.4289/0013-8797.112.3.444
- Tapia-Uriza, T. R., Cossío-Bayúgar, R., González-Gaona, E., Lira-Ramos, K. V. D., Rodríguez-Cruz, Y. E., & Miranda-Miranda, E. (2022). Establecimiento de novo de un cultivo in vitro de una línea celular derivada del intestino de moscas sierra (Hymenoptera: Diprionidae). *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 13(69), 95–111. doi: 10.29298/rmcf.v13i69.1088
- Thompson, C. G., Scott, D. W., & Wickman, B. E. (1981). Long-term persistence of the nuclear polyhedrosis virus of the Douglas-fir tussock moth, *Orgyia pseudotsugata* (Lepidoptera: Lymantriidae), in forest soil. *Environmental Entomology*, 10(2), 254–255. doi: 10.1093/ee/10.2.254
- van Frankenhuyzen, K., Lucarotti, C., & Lavallée, R. (2016). Canadian contributions to forest insect pathology and to the use of pathogens in forest pest management. *The Canadian Entomologist*, 148(S1), S210–S238. doi: 10.4039/tce.2015.20
- Williams, T., Virto, C., Murillo, R., & Caballero, P. (2017). Covert infection of insects by baculoviruses. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1337. doi: 10.3389/fmicb.2017.01337