



DOI: <https://doi.org/10.29298/rmcf.v13i69.1088>

Artículo

Establecimiento de novo de un cultivo *in vitro* de una línea celular derivada del intestino de moscas sierra (Hymenoptera: Diprionidae)

De novo establishment of an *in vitro* cell line culture derived from the intestine of sawflies (Hymenoptera: Diprionidae)

Tania Rocío Tapia-Uriza¹, Raquel Cossío-Bayúgar¹, Ernesto González-Gaona², Karla Vanessa De Lira-Ramos², Yahaira Elizabeth Rodríguez-Cruz², Estefhan Miranda-Miranda^{1*}

Abstract

Pines, cedars and oaks forests are affected by different arthropod pests, one of which are the wasps of the family Diprionidae commonly known as sawflies. Swarms of these organisms cause defoliation on large extensions of pines and oaks along the national territory, and there is an urgent need to implement measures for the control of sawflies. One successful measure applied in other countries with similar forest pest control issues is the use of specific baculoviruses for the control of Diprionidae wasps, which has proved to be effective in the biological control of sawflies by infecting the larval stage of these wasps, and thus increasing their mortality. However, there are no current projects in México that evaluate the identification and isolation of *gamma-baculovirus* destined to the biological control of forest pests. Our study addresses the technical difficulties of obtaining an intestinal cell line from Diprionidae sawflies, and we report the isolation and *in vitro* culture of intestinal cells.

Keywords: Biological control, cellular culture, *in vitro* culture, intestinal epithelial, sawflies, Nuclear Polyhedrosis Virus.

Resumen

En México, los bosques de pino son afectados por plagas insectiles, dentro de las cuales destacan las avispa de la familia Diprionidae, conocidas como moscas sierra —insectos causantes de defoliaciones en grandes extensiones de pinos y *juniperus* a lo largo del territorio nacional—, por lo que existe la necesidad de implementar medidas de control. Una estrategia es el uso de baculovirus que ha mostrado efectividad en varios países, con problemas similares, en donde se ha demostrado que los *gamma-baculovirus* infectan a las larvas de estas avispa, aumentan su mortalidad y con ello regulan sus poblaciones. En México se carece de estudios sobre la identificación, aislamiento y cultivo *in vitro* de *gamma-baculovirus* específicos para moscas sierra. En el presente escrito se analiza el establecimiento de una línea celular del hospedero de los virus, las moscas sierra, en especial de células epiteliales del intestino de las larvas; ya que, según las fuentes bibliográficas, el virus no es capaz de replicarse en otro tipo de órganos. El desarrollo de una línea celular resulta ser un poco laborioso, en particular cuando no se tienen antecedentes; por ello, se desarrolló un protocolo de establecimiento celular, con el cual se obtuvieron tanto las células requeridas, como cultivos primarios de diferentes órganos del estadio larval de las moscas sierra.

Palabras clave: Control biológico, cultivo celular, cultivo *in vitro*, epitelio intestinal, líneas celulares, moscas sierra.

Fecha de recepción/Reception date: 2 de marzo de 2021

Fecha de aceptación/Acceptance date: 21 de septiembre de 2021

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad. México.

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Pabellón, CIR-Norte Centro. México.

Autor para correspondencia; correo-e: miranda.estefhan@inifap.gob.mx

Introducción

El uso de Baculovirus para el control de plagas agrícolas se ha extendido a nivel comercial, y en la actualidad se aplica exitosamente en el control biológico de plagas del maíz, soya y algodón (Beas-Catena *et al.*, 2014). Estos casos justifican la investigación sobre el uso de Baculovirus para controlar diferentes artrópodos que actúan como plagas forestales, y que causan graves daños en los bosques de pinos, cedros y encinos en distintas regiones de México.

Tal es el caso de las avispas de la familia Diprionidae, mejor conocidas como moscas sierra, estos insectos provocan la defoliación de miles de hectáreas de bosques de clima templado dentro del territorio mexicano, lo que origina cuantiosas pérdidas en recursos madereros (González *et al.*, 2014). En los últimos siete años se han registrado brotes epidémicos en Chihuahua, Durango, Guerrero, Jalisco, Oaxaca y San Luis Potosí, entre otros (González y Sánchez, 2018).

Los principales hospederos de las moscas sierra son especies de la familia Pinaceae y Cupresaseae, sus larvas ocasionan defoliaciones de los árboles al alimentarse de las acículas; aunque los daños provocados no causan la muerte de su hospedero, pero lo deja susceptible a otro tipo de plagas y enfermedades que podrían inducir severas afectaciones, incluso la muerte del árbol (González y Sánchez, 2018). La familia Diprionidae presenta varios géneros, en los bosques de México se han citado: *Neodiprion* spp., *Monoctenus* spp. y *Zadiprion* spp., como los principales responsables de las defoliaciones (González *et al.*, 2014).

En la actualidad, se utilizan distintos métodos para controlar este tipo de plagas, uno de ellos es el químico que, aunque es eficiente, causa severos daños al ambiente y afecta a otros organismos, por lo que se ha buscado implementar el uso del control biológico (García-Robles *et al.*, 2001). Al respecto, hay estudios en los que se utilizan hongos o bacterias entomopatógenas, pero estos afectan tanto a las moscas sierra, como a otras especies por lo que su uso no es recomendable para el biocontrol de esos insectos (González y Sánchez, 2018); por el contrario, los

Baculovirus son específicos y eficientes para el control de las moscas sierra en los bosques de Canadá (Moreau *et al.*, 2005).

Este tipo de virus pertenecen a la familia Baculoviridae, que poseen un genoma de ADN circular de doble cadena, cuyo tamaño varía desde 80 hasta 180 kpb. Los Baculovirus presentan dos fenotipos de viriones: los virus ocluidos (ODV) y los viriones brotantes (BV) que corresponden a su forma infectiva (Wang y Hu, 2019). Los que infectan a las moscas sierra pertenecen al género *Gammabaculovirus*, el cual se caracterizan por formar cuerpos de oclusión (OB) en el núcleo de las células del epitelio intestinal de las larvas, estas oclusiones también llamados poliedros son agregados de una proteína viral denominada poliedrina en el caso de los virus de poliedrosis nuclear (NPV), y granulina en los virus de granulosis (GV); ambas matrices proteicas brindan resistencia y estabilidad a las condiciones ambientales.

El insecto ingiere los OB y después de la ingesta, la matriz que los rodea es digerida en el intestino de la larva, debido a las condiciones alcalinas liberando a los BV, que son los que inician la infección sistémica del insecto, la cual desencadena su muerte.

Los Baculovirus se clasifican en cuatro géneros: *Alphabaculovirus* (NPV) y *Betabaculovirus* (GV) que afectan a lepidópteros; *Gammabaculovirus* (NPV) a Himenópteros y *Deltabaculovirus* (NPV) a Dípteros (Rohrmann, 2019; King *et al.*, 2012). En Canadá se logró desarrollar una suspensión concentrada de NPV llamada Abietiv[®], cuyo ingrediente activo es el virus de poliedrosis nuclear de *Neodiprion abietis* que se aplica de manera aérea en las zonas forestales afectadas por estos organismos. En bosques de abeto balsámico [*Abies balsamea* (L.) Mill.], se demostró la efectividad de este producto en el control de moscas sierra (Lucarotti *et al.*, 2012).

El protocolo para la obtención de la suspensión viral consiste en la concentración del virus a partir de larvas infectadas, producto que se genera de manera cíclica; ya que en la región forestal donde se esparce, y una vez que se constata que las larvas

mueren por la infección viral, se colectan los cadáveres que se consideran material infectante para la elaboración de un nuevo lote de la suspensión viral, esto se realiza sucesivamente cada que se requiere utilizar el biopesticida; sin embargo, los costos de producción son grandes (Moreau *et al.*, 2005).

Una solución para evitar el procedimiento antes descrito es el cultivo *in vitro* del Baculovirus. Para ello, se necesita implementar un cultivo celular capaz de replicar el virus y obtener cantidades considerables del mismo (Rohrmann, 2019).

Actualmente, se han establecido distintos cultivos de células hospederas de *AlphaBaculovirus*, pero dada su alta especificidad es muy difícil utilizarlos para cultivar *Gammabaculovirus* (Lucarotti *et al.*, 2012), por lo que es necesario el desarrollo de líneas celulares de diferentes géneros de moscas sierra destinadas a la obtención y propagación de un *Gammabaculovirus* que afecte a especies mexicanas de avispas dipriónidas y que sea útil para su control biológico. Estos Baculovirus comienzan la fase infectiva y su replicación en el intestino de las larvas, y acorde a los antecedentes bibliográficos es el único órgano susceptible de infectarse, por esa razón el cultivo celular tiene que derivarse de células intestinales epiteliales (Lucarotti *et al.*, 2012).

El objetivo del presente trabajo es implementar una técnica de obtención de un cultivo celular de diferentes especies de moscas sierra a partir de larvas de los géneros de *Neodiprion spp.* y *Monoctenus spp.*; para lo cual se siguieron técnicas de cultivos celulares aplicadas en otros artrópodos (Cossio-Bayugar y Miranda-Miranda, 2007; Mosqueda *et al.*, 2008), en lepidópteros y para *Alfabaculovirus* (Summers y Smith, 1987).



Materiales y Métodos

Obtención y manejo de las muestras

Las larvas de avispas diprionidas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Sanidad Forestal y Agrícola del Campo Experimental Pabellón en Aguascalientes (INIFAP-CIR Norte Centro-Cepab), recolectadas en bosques de pino y de cedro blanco en Hidalgo y Guerrero, respectivamente durante actividades del proyecto Conafor 2017 C02 Núm. 291304. Se recibieron lotes de aproximadamente 50 larvas, las correspondieron a dos géneros: *Neodiprion* sp. y *Monoctenus* sp. Se guardaron en botes de plástico a 4 °C hasta su uso.

Lavado y disección de las muestras

Se seleccionaron cinco larvas de cada género, que se lavaron con distintas soluciones desinfectantes, consistentes en una solución de Benzal al 100 %. Posteriormente, se colocaron en un tubo cónico de 15 mL con 5 mL de Benzal y se dejaron en agitación durante 10 min; después, se desechó el Benzal y se agregaron 5 mL de Etanol al 70 %, nuevamente se colocaron en agitación durante 10 min; por último, se realizó un lavado con agitación durante 30 min en 5 mL de ABAM (antibiótico-antimicótico Gibco®; concentración final Penicilina 100 U mL⁻¹, estreptomycin U mL⁻¹ y Fungizona (anfotericina B) 0.25 µg mL⁻¹) (Cossio-Bayugar y Miranda-Miranda, 2007). Se disectaron los órganos con una navaja bisturí estéril, se realizaron dos cortes: uno en el abdomen posterior y el otro en el anterior, este corte provocó la exposición del intestino, el cual se tomó con unas pinzas en medio y se colocaron en microtubos de 1500 µL con ABAM. Para la identificación del intestino de las larvas, se realizó una comparación con fotografías de *Neodiprion abietis* (Lucarotti *et al.*, 2011). Una vez identificado el tracto intestinal y órganos

accesorios, se continuó con el protocolo para la obtención de líneas celulares que se describe a continuación.

Glándulas salivales y red intersticial celular

Estos órganos accesorios del intestino, se colocaron por separado en un tubo de *Eppendorf* de 1.5 mL y se realizó un lavado con 500 μ L de ABAM, durante 10 min en agitación; enseguida, se decantó el ABAM 1X y se les agregó 500 μ L de solución balanceada de *Hank's (HBSS, ThermoFisher Scientific)* 1X.; posteriormente, se centrifugaron a 2 000 rpm durante dos min; por último, se retiró la solución *HBSS* 1X y se añadieron 500 μ L de un medio de cultivo preparado con partes iguales de medio mínimo esencial (MEM; *ThermoFisher Scientific*), medio *Leibovitz L-15 (ThermoFisher Scientific)*, suplementado con 20 % de suero fetal de bovino (*FBS; Gibco™, ThermoFisher Scientific*), 10 % caldo soya tripticaseína (*TSB; Sigma*), una solución antibiótico antimicótico (ABAM, *Gibco™, ThermoFisher Scientific*; concentración final Penicilina 100 U mL⁻¹, estreptomina 100 U mL⁻¹ y anfotericina B 0.25 μ g mL⁻¹) (Cossio-Bayugar y Miranda-Miranda, 2007).

Los órganos fueron suspendidos en el medio y se añadieron a placas de cultivo de 12 pozos (*Corning*), cada uno contenía 2.5 mL de MEM suplementado fresco, el volumen final del cultivo fue de 3 mL en cada pozo de una placa de 12 pozos; la placa se mantuvo a una temperatura de 28 °C y una atmosfera de 5 % de CO₂ (Mosqueda *et al.*, 2008; Cossio-Bayugar *et al.*, 2011).



Intestino

Los intestinos obtenidos de la disección se colocaron en un tubo *Eppendorf* de 1.5 mL con 500 μ L de ABAM 1X durante 10 min; terminado el tiempo de incubación se centrifugó a 2 000 rpm por dos min, para sedimentar los intestinos; se decantó el ABAM 1X y se les agregó 500 μ L de *HBSS* para realizar un lavado, se repitió la centrifugación e igualmente se decantó el *HBSS* 1X; una vez que estuvieron limpios los intestinos, se adicionaron 500 μ L de medio de cultivo y se procedió a realizar la disgregación mecánica con una punta de micropipeta de 1 000 μ L, mediante una presión ligera de los intestinos. Finalmente, las células disgregadas se suspendieron en 2.5 mL de MEM suplementado que estaba en cajas de cultivo celular de 12 pozos, el volumen total de cultivo fue de 3mL por pozo; los cultivos se mantuvieron a 28 °C en una atmosfera de 5 % de CO₂ (Mosqueda *et al.*, 2008; Cossio-Bayugar *et al.*, 2011; Lucarotti *et al.*, 2011).

Los cultivos se verificaron diariamente en un microscopio invertido *Zeiss Axiovert* 40.

Resultados

Morfología de los intestinos de las larvas de moscas sierra

Se identificaron diferentes órganos de las moscas sierra de la zona torácica-abdominal, entre los que destacan: el intestino, las glándulas salivales y la red intersticial de células (Figura 1a).



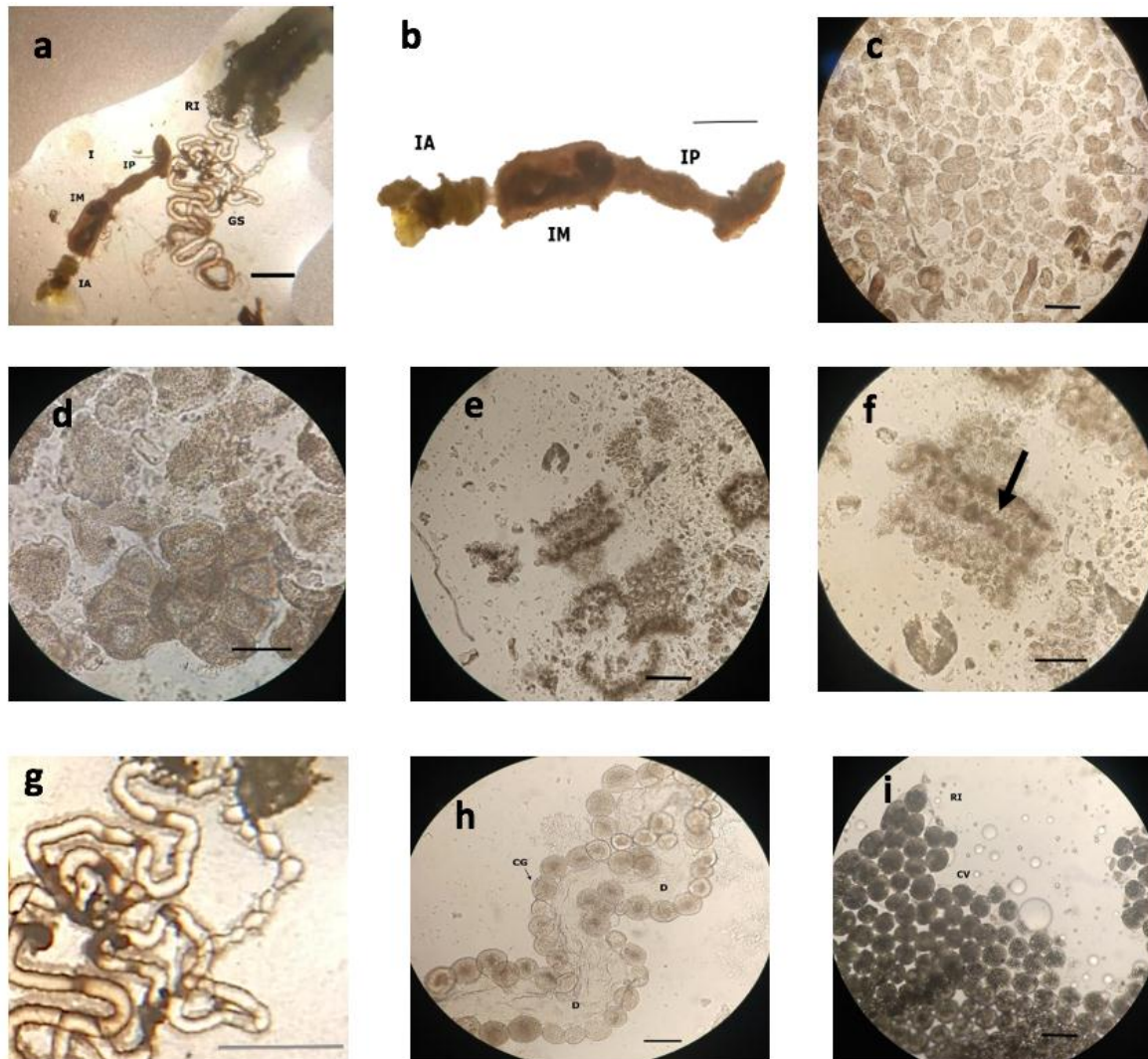


Figura 1. a. Aspecto del intestino de una larva de *Monoctenus* sp., Intestino o canal alimentario de larva (I), intestino anterior (IA), intestino medio (IM), intestino posterior (IP), glándulas salivales (GS), red intersticial celular (RI), barra escala 2mm. b. Intestino de larva *Monoctenus* sp., intestino anterior (IA), intestino medio (IM) e intestino posterior (IP). Las flechas señalan la unión que delimita cada sección del intestino. En el intestino medio se diferencia el bolo alimenticio de la larva, barra escala 2 mm. c. Células epiteliales del intestino de larvas del género *Neodiprion* sp., son células de morfología cilíndrica con núcleo definido, barra escala 100 μ m. d. Aglomerado de células epiteliales intestinales de larvas de *Neodiprion* sp., núcleo celular definido (flecha), barra escala 50 μ m. e. Células epiteliales del intestino de larvas del género *Monoctenus* sp., son células de morfología cubica con

núcleo definido, barra escala 100 μm . f. Aglomerado de células epiteliales del intestino de larvas del género *Monoctenus* sp., núcleo celular definido (flecha), barra escala 25 μm . g. Glándulas Salivales (GS) de larvas del género *Monoctenus* sp. barra escala 2 mm. h. Cultivo celular de glándulas salivales de *Monoctenus* sp., célula granulada (CG), ductos alargados (D). Las células rodean los ductos transparentes a lo largo de todas las glándulas celulares, barra escala 100 μm . i. Cultivo celular de red intersticial de *Monoctenus* sp., red intersticial formada por la unión de las células (RI), célula vacuolada granulada (CV), barra escala 100 μm .
Imágenes tomadas al microscopio óptico usando objetivo 40X.

Intestinos

El intestino se caracteriza por ser un tubo seccionado en tres partes: intestino anterior, medio y posterior (Figura 1b); una sección se diferencia por el angostamiento del inicio de cada porción. La parte anterior del intestino se conecta a la cavidad bucal, seguida por el intestino medio que es la porción más ancha del intestino y donde se encuentra la mayor cantidad de bolo alimenticio, por lo que se le atribuye la función de digerir el alimento, y finalmente, la región posterior que es el ducto más delgado, en comparación con las otras secciones (Figura 1b).

Cultivo celular de intestino del género *Neodiprion* sp.

Las células epiteliales del intestino tienen características muy distintivas y comunes a la estructura celular del epitelio intestinal de los artrópodos; poseen un núcleo definido y tienen una morfología cúbica, plana o cilíndrica (Lucarotti *et al.*, 2011). Los cultivos celulares obtenidos demostraron tener esas características (figuras 1c y 1d); las células se revisaron cada tercer día y se observó que no había proliferación

ni crecimiento celular. El tiempo aproximado de duración para este cultivo fue de un mes; debido a que no se registró una proliferación o crecimiento se consideró como un cultivo primario de intestino de la larva. El cultivo mostró una buena adaptación al medio MEM y a las condiciones de cultivo establecidas. La formación de aglomerados (Figura 1d) de las células y los residuos celulares del cultivo se deben al tipo de disgregación aplicada.

Cultivo celular de intestino del género *Monoctenus* sp.

Los cultivos mostraron las mismas características morfológicas que las células epiteliales; sin embargo, en comparación con las células de *Neodiprion* sp. son más pequeñas y alargadas (Figura 1f). También, destacaron las aglomeraciones de pequeños grupos de células que no se disgregaron correctamente, el tiempo de cultivo celular se aproximó a un mes.

Glándulas salivales

Las glándulas salivales (Figura 1g) se observaron en una gran proporción, flanqueando el canal alimentario de la larva; son un par de ductos transparentes alargados que están rodeados por un gran número de células granuladas.

Cultivo celular de glándulas salivales de *Neodiprion* sp.

Es un órgano resistente a la manipulación y mostró tener una excelente tolerancia al medio de cultivo, se consideró como un cultivo primario ya que no presentó proliferación celular; la duración del cultivo fue mayor a los 3 meses y las células no

presentaron adhesión a las placas de cultivo; y debido a su longevidad *in vitro* se consideran ideales para ensayos de infección (Figura 1h).

Red intersticial de células

Está formada por un conjunto de células granuladas unidas, rodea al intestino y a las glándulas salivales, su función podría ser fundamental en el cambio de muda de la larva (Figura 1a).

Cultivo celular de red intersticial de *Neodiprion* sp.

El cultivo celular se mantuvo alrededor de 1 mes con medio de cultivo, no hubo adhesión celular a la placa de cultivo y las células no evidenciaron ningún tipo de proliferación, ni crecimiento debido a que es un cultivo primario (Figura 1i).

Discusión

Las moscas sierra son himenópteros de la familia Diprionidae que ocasionan defoliaciones de hasta sesenta mil ha al año (González y Sánchez, 2018). Es por esta razón que se buscan métodos de control biológico eficientes y seguros que no provoquen daño al ambiente, o a especies endémicas no objeto de control. El uso de Baculovirus es eficiente para tratar este tipo de plagas; al respecto, hay numerosos ejemplos sobre la producción comercial de Alfa Baculovirus destinados al control de plagas agrícolas (Grzywacz *et al.*, 2014; Grzywacz y Moore 2017), pero solo algunos ejemplos en la producción de suspensiones virales para el control de moscas sierra; un ejemplo es el uso del *Gammabaculovirus* NeabNPV que fue

purificado y secuenciado por investigadores canadienses, cuyo uso aumentó la mortalidad de *Neodiprion abietis* y redujo los niveles de afectación a nivel endémico (Moreau *et al.*, 2005).

Durante el presente estudio se establecieron varias líneas celulares de moscas sierra a partir de los intestinos y órganos accesorios intestinales que se consideran como una herramienta esencial para la obtención, caracterización y propagación de un *Gammabaculovirus* utili en el control biológico y en estudios de metabolismo celular de estas plagas forestales en México.

La producción de un cultivo celular puede tardar meses e incluso años; actualmente, no existe ningún registro de una línea celular de las moscas sierra de la familia Diprionidae en México. Los resultados obtenidos reflejan un gran avance para el establecimiento de una línea celular de epitelio intestinal. Este tipo de células es el único que puede incubar un virus para su replicación y propagación (Lucarotti *et al.*, 2012), por lo que es importante tener un método para su cultivo y definir las condiciones adecuadas para la incubación de las células.

Existen diferencias celulares entre los distintos géneros de moscas (*Neodiprion* y *Monoctenus*), especialmente en la forma y el tamaño. Las células de *Monoctenus* son más pequeñas y de forma cúbica; mientras que, las células del género *Neodiprion* son cilíndricas y de mayor tamaño, ambos cultivos celulares presentaron una duración de aproximadamente un mes, las condiciones establecidas fueron adecuadas para su mantenimiento, y aunque no hubo proliferación o crecimiento celular son buenos candidatos para la infección con el Baculovirus, debido a que los virus pueden multiplicarse en los núcleos celulares de las células epiteliales intestinales; lo anterior se observó de manera notable, ya que un núcleo definido abarcaba gran parte de la célula.

Las aglomeraciones de células formadas en los cultivos podrían deberse a la deficiencia en la disgregación mecánica; por lo que no se descarta el uso de un método químico para la separación de las células, mediante el uso de enzimas como la colagenasa, tripsina, elastasa, papaína o pronasa (Beltrán y González, 2016).

Este tipo de enzimas ayudarían con la correcta disgregación de los tejidos y se utilizarían junto con la disgregación mecánica. Debido al tipo de disgregación empleada el cultivo mostró una gran cantidad de sedimentos celulares, por lo que se considera que podría implementarse el uso de un filtro que ayuda en la separación de las células con los sedimentos celulares, ya que con ello se obtendría un cultivo más limpio, sin sedimentos en el fondo de la placa de cultivo.

Los lavados después de la disección de los órganos es un paso importante para evitar alguna contaminación en el cultivo; aunque estos se realizaron de manera estricta y siempre en condiciones estériles, los cultivos de intestino presentaron contaminación por levaduras no identificadas, es importante resaltar que el antimicótico estaba al doble de concentración en el medio utilizado. La contaminación de los cultivos del intestino podría atribuirse a la flora intestinal de la larva; lo cual se evitaría con la separación por filtración de las células, con ello se impediría que los organismos responsables de la contaminación se cultiven junto con las células epiteliales intestinales. El medio utilizado se emplea para cultivo de artrópodos (Cossio-Bayugar y Miranda-Miranda, 2007).

A pesar de que no se presentan resultados sobre el funcionamiento de los cultivos obtenidos de glándulas salivales y de la red intersticial celular, no se descarta que pudiesen utilizarse en investigaciones posteriores para entender cuestiones biológicas de las larvas de la familia Diprionidae. Estos cultivos son más fáciles de manejar que los de intestino, ya que tienen menor probabilidad de contaminación. Sin embargo, en comparación con la fijación estos tejidos permanecen flotando en el medio; por ello, se propone reducir el volumen del medio de cultivo MEM, o bien disminuir el área de la placa de cultivo.



Conclusiones

El establecimiento de un cultivo celular de células epiteliales intestinales es posible siguiendo el protocolo descrito en este trabajo. Cada género de larva podría tener células con diferencias morfológicas, por lo que se propone el estudio de los tres géneros de mosca cierra registrados para la república mexicana (*Monoctenus*, *Neodiprion* y *Zadiprion*). Las condiciones de incubación de las células son adecuadas para el mantenimiento de los cultivos: 28 °C de temperatura y atmosfera de 5 % de CO₂. El medio de cultivo MEM- *Leibovitz* L-15 (1:1) suplementado al 20 % con SFB y 10 % caldo soya tripiticaseina es adecuado para el mantenimiento y nutrición de las células; el cambio o agregación de las células se requiere para prolongar la vida de los cultivos celulares. Los cultivos primarios establecidos son candidatos para la identificación, caracterización, proliferación y mantenimientos de un *Gammabaculovirus* debido a las características morfológicas de las células.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por fondo Sectorial Conacyt-Conafor, proyecto CONAFOR 2017 CO2 núm. 291304.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribuciones por autor

Tania Rocío Tapia-Uriza, Raquel Cossío-Bayúgar y Estefhan Miranda-Miranda: diseño del estudio, ejecución experimental y elaboración de manuscrito; Ernesto González-

Gaona, Karla Vanessa De Lira-Ramos y Yahaira Elizabeth Rodríguez-Cruz: muestreo, revisión, análisis y discusión del documento.

Referencias

Beas-Catena, A., A. Sánchez-Mirón, F. García-Camacho, A. Contreras-Gómez and E. Molina-Grima. 2014. Baculovirus biopesticides: An overview. *Journal of Animal and Plant Sciences* 24(2): 362–373. <http://www.thejaps.org.pk/docs/v-24-2/02.pdf> (6 de junio 2021).

Beltrán V., N. E. y C. H. Gonzáles de R. 2016. Técnicas de cultivos celulares e ingeniería de tejidos. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa Ciudad de México, Mexico. pp. 74-89.

Cossio-Bayugar, R. and E. Miranda-Miranda. 2007. Heterologus gene expression in a cattle tick *Rhipicephalus microplus* embryonic cell culture. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 6: 1214–1218.

<https://medwelljournals.com/abstract/?doi=javaa.2007.1214.1218> (6 de junio de 2021).

Cossio-Bayugar, R., C. Rojas Martinez, E. Miranda-Miranda, J. A. Alvarez- Martinez, J. V. Figueroa Millan, y C. A. Vega y Murguia. 2011. Cultivo in vitro Células Animales y sus Aplicaciones. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícola y Pecuarias, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, Jiutepec, Mor., México. Libro técnico 3. pp. 82-95.

Garcia-Robles, I., J. Sánchez, A. Gruppe, A. C. Martínez-Ramírez, C. Rausell, M. D. Real and A. Bravo. 2001. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* PS86Q3 strain in hymenopteran forest pests. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 849–856. Doi: 10.1016/s0965-1748(01)00030-3.

- González G., E. y G. Sánchez M. 2018. Identificación y manejo de moscas sierrade la familia Diprionidae presentes en el centro norte de México. Comisión Nacional Forestal. Folleto técnico, pp 1-98
<http://sivicoff.cnf.gob.mx/ContenidoPublico/09%20Manuales%20t%C3%A9cnicos/Manual%20moscas%20sierra.pdf> (6 de junio de 2021).
- González G., E., F. Bonilla T., S. Q. Quiñones B., G. S. Sánchez M., F. Tafoya R., M. P. España L., J. Lozano G. y S. Robles U. 2014. Guía para la identificación de moscas sierra de la familia diprionidae presentes en el centro norte de México. Centro de Investigación Regional Norte Centro, Campo Experimental Pabellón, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias., Aguascalientes, Ags., Mexico. Publicación especial Núm. 41. pp. 1-33.
- Grzywacz, D. and S. Moore. S. (2017). Production, Formulation, and Bioassay of Baculoviruses for Pest Control. *In*: Lacey, L. A. (ed.). Microbial Control of Insect and Mite Pests. Elsevier. San Diego, CA, USA. pp. 109–124.
- Grzywacz, D., D. Moore and J. R. Rabindra. 2014. Mass production of entomopathogens in less industrialized countries. *In*: Morales-Ramos, J. A., G. M. Rojas and I. D. Shapiro-Ilan (eds.). Mass production of beneficial organisms. Londo, UK. Academic Press. pp. 519–553.
- King, A. M. Q., M. J. Adams, E. B. Carstens and E. J. Lefkowitz (eds.). 2012. Family - Baculoviridae. *In*: Virus Taxonomy. Elsevier. San Diego, CA, USA. pp. 163–173. Doi: 10.1016/B978-0-12-384684-6.00013-6.
- Lucarotti, C. J., B. H. Whittome-Waygood and D. B. Levin. 2011. Histology of the Larval Neodiprion abietis (Hymenoptera: Diprionidae) Digestive Tract. *Psyche: A Journal of Entomology* e910286. Doi: 10.1155/2011/910286.
- Lucarotti, C. J., B. H. Whittome-Waygood, R. Lapointe, B. Morin and D. B. Levin. 2012. Pathology of a Gammabaculovirus in its natural balsam fir sawfly (Neodiprion abietis) host. *Psyche: A Journal of Entomology* e646524. Doi: 10.1155/2012/646524.

Moreau, G., C. J., Lucarotti, E. G., Kettela, G. S., Thurston, S., Holmes, C., Weaver, D. B. Levin and B. Morin. 2005. Aerial application of nucleopolyhedrovirus induces decline in increasing and peaking populations of *Neodiprion abietis*. *Biological Control* 33: 65–73. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2005.01.008.

Mosqueda, J., R. Cossío-Bayugar, E. Rodríguez, A. Falcón, A. Ramos, J. V., Figueroa, and A. Alvarez. 2008. Primary midgut, salivary gland, and ovary cultures from *Boophilus microplus*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1149: 49–52. Doi: 10.1196/annals.1428.050.

Rohrmann, G. F. 2019. *Baculovirus Molecular Biology*. 4th Edition. National Center for Biotechnology Information. Bethesda, MD, USA.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK543458/> (6 junio de 2021).

Summers, M. D. and G. E. Smith. 1987. *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures*. Texas Agricultural Experiment Station, College Station. Texas, USA. Bulletin 1555: 1-60.
<https://oaktrust.library.tamu.edu/handle/1969.1/145892> (6 de junio de 2021).

Wang, M. and Z. Hu. 2019. Cross-talking between baculoviruses and host insects towards a successful infection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 374: 20180324. Doi: 10.1098/rstb.2018.0324.



Todos los textos publicados por la **Revista Mexicana de Ciencias Forestales** –sin excepción– se distribuyen amparados bajo la licencia *Creative Commons 4.0 Atribución-No Comercial (CC BY-NC 4.0 Internacional)*, que permite a terceros utilizar lo publicado siempre que mencionen la autoría del trabajo y a la primera publicación en esta revista.