

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



EFFECTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Metarhizium rileyi* Y LOS NEMATODOS  
*Heterorhabditis* spp. Y *Steinernema* spp. CONTRA EL GUSANO COGOLLERO DEL  
MAÍZ, *Spodoptera frugiperda* EN LABORATORIO E INVERNADERO.

Tesis

Que presenta FERNANDO SÁNCHEZ PEDRAZA  
como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASIOLOGÍA AGRÍCOLA

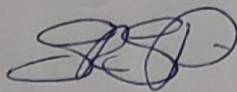
Saltillo, Coahuila

Septiembre 2019

EFFECTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Metarhizium rileyi* Y LOS NEMATODOS  
*Heterorhabditis* spp. Y *Steinernema* spp. CONTRA EL GUSANO COGOLLERO DEL  
MAÍZ, *Spodoptera frugiperda* EN LABORATORIO E INVERNADERO.

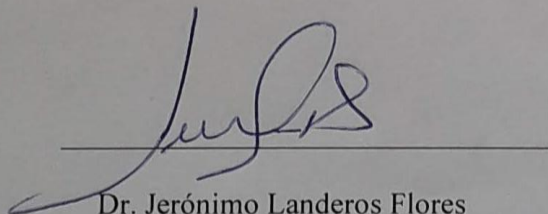
Tesis

Elaborada por FERNANDO SÁNCHEZ PEDRAZA como requisito parcial para obtener el  
grado de Maestro en Ciencias Parasitología Agrícola con la supervisión y aprobación del  
Comité de Asesoría



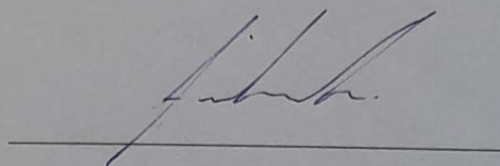
Dr. Sergio René Sánchez Peña

Asesor principal



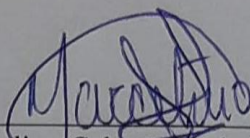
Dr. Jerónimo Landeros Flores

Asesor



M. C. Diego Alejandro Treviño Cueto

Asesor



Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente

Subdirector de Postgrado

UAAAN

## **Agradecimientos**

**A CONACYT**, por haberme otorgado con la beca, pues sin este apoyo no pude haber logrado esta meta.

**A la UAAAN**, por haberme permitido realizar un logro más en mi vida.

**Al Dr. Sergio Rene Sanchez Peña**, por ser un gran profesor, investigador, amigo, guía.

**Al M.C. Diego Alejandro Treviño Cueto**, por ayudarme en este proyecto, por su amistad.

**Al Dr. Jerónimo Landeros Flores** por su apoyo, por sus consejos.

## **Dedicatorias**

### **A mis padres**

*Bertha Pedraza Olivares*

*Fernando Sánchez Rivera (Donde quiera que te encuentres, DEP)*

### *A mis hermanos*

*Iris Vanesa Sánchez Pedraza*

*Verónica Sánchez Pedraza*

*Briseida Sánchez Pedraza*

*Miguel Sanchez Pedraza*

*Aldo Sanchez Pedraza*

### **A mis amigos**

*Todos y cada uno de ustedes que formaron parte e hicieron esta etapa más fácil, más amena, más divertida, fueron parte esencial, nunca olvidare todos los momentos agradables que vivimos.*

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIAS.....	IV
RESUMEN.....	IX
ABSTRAC.....	X
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b> Antecedentes <i>Metarhizium rileyi</i> .....	<b>2</b>
<b>1.2</b> Hipótesis .....	<b>3</b>
<b>1.3</b> Objetivos específicos .....	<b>3</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1</b> El maíz.....	<b>4</b>
<b>2.1.1</b> Clasificación taxonómica del maíz .....	<b>4</b>
<b>2.1.2.</b> Principales plagas del maíz.....	<b>5</b>
<b>2.2</b> El gusano cogollero <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith) .....	<b>5</b>
<b>2.2.1</b> Biología y ciclo de vida .....	<b>6</b>
<b>2.2.2</b> Huevecillo .....	<b>7</b>
<b>2.2.3</b> Larva .....	<b>7</b>
<b>2.2.4</b> Pupa .....	<b>7</b>
<b>2.2.5</b> Adulto .....	<b>8</b>
<b>2.2.6</b> Daños que ocasiona .....	<b>8</b>
<b>2.3</b> Métodos de control de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	<b>9</b>
<b>2.3.1</b> Control cultural .....	<b>9</b>
<b>2.3.2</b> Control químico.....	<b>10</b>
<b>2.3.3</b> Control físico.....	<b>10</b>
<b>2.3.4</b> Control biológico.....	<b>10</b>
<b>2.4</b> Resistencia a insecticidas .....	<b>11</b>
<b>2.5</b> Nematodos entomopatógenos.....	<b>11</b>
<b>2.6</b> Bacterias entomopatógenas.....	<b>12</b>
<b>2.7</b> Virus entomopatógenos .....	<b>12</b>
<b>2.8</b> Hongos entomopatógenos.....	<b>13</b>
<b>2.9</b> Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos .....	<b>13</b>

3.	<b>MATERIAL Y METODOLOGÍA</b> .....	16
3.1	Crianza de <i>Spodoptera frugiperda</i> en laboratorio .....	16
3.2	Aislamiento de <i>Metarhizium rileyi</i> .....	16
3.3	Aislamiento del nematodos entomopatogenos .....	17
3.4	Efectividad biológica de seis cepas de nematodos; <i>Steinenerma</i> spp. y <i>Heterorabditis sp.</i> contra el gusano cogollero del maíz <i>Spodoptera frugiperda</i> en laboratorio. ....	18
3.5	Evaluación de la mortalidad de <i>Spodoptera frugiperda</i> causada por suspensiones de <i>Metarhizium rileyi</i> aplicados en el dorso de la larva en laboratorio.....	19
3.6	Evaluación de la mortalidad de <i>Spodoptera frugiperda</i> causada por <i>Metarhizium rileyi</i> y <i>Heterorhabditis</i> spp. en infestación artificial en plantas de maíz en invernadero.....	21
3.7	Análisis estadístico .....	23
4	<b>RESULTADOS</b> .....	24
4.1	Efectividad biológica de seis cepas de nematodos; <i>Steinenerma</i> spp. y <i>Heterorabditis sp.</i> contra el gusano cogollero del maíz <i>Spodoptera frugiperda</i> en laboratorio.....	24
4.2	Evaluacion de la mortalidad de <i>Spodoptera frugiperda</i> causada por suspensiones de <i>Metarhizium rileyi</i> aplicados en el dorso de la larva en laboratorio.....	25
4.3	Evaluación de la mortalidad de <i>Spodoptera frugiperda</i> causada por <i>Metarhizium rileyi</i> y <i>Heterorhabditis</i> spp. en una infestación artificial en plantas de maíz.....	28
5.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	31
6.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	32
7.	<b>LITERATURACITADA</b> .....	33

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Concentraciones de tratamientos, 5 tratamientos de conidas y tratamiento (Agua + Biobex), cepa NrFs1 obtenida en Saltillo, México.....	20
<b>Tabla 2.</b> Concentraciones de hongos (en esporas/ml) y nematodos en los diferentes tratamientos, nombre de la cepa, obtenidas en Saltillo, México.....	23
<b>Tabla 3.</b> Análisis de varianza (ANVA), a la variable independiente: Mortalidad entre tratamientos.....	25
<b>Tabla 4.</b> Mortalidad media de <i>S. frugiperda</i> 72 horas después de la aplicación de cepas de <i>Stinenerma</i> sp. y <i>Heterorabditis</i> sp. IJs en laboratorio. Las medias seguidas de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) (prueba de Tukey).....	25
<b>Tabla 5.</b> Análisis de varianza (ANVA), a la variable independiente: Mortalidad entre tratamientos en la prueba de mortalidad de <i>Spodoptera frugiperda</i> por <i>Metarhizium rileyi</i> .....	27
<b>Tabla 6.</b> Mortalidad media en larvas de <i>S. frugiperda</i> 168 horas después de la aplicación directa de conidios de <i>M. rileyi</i> al dorso de las larvas. Las medias seguidas de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) (prueba de Tukey).....	28
<b>Tabla 7.</b> Análisis de varianza (ANVA), a la variable dependiente Mortalidad entre tratamientos de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> en plantas de maíz después de la aplicación de <i>Metarhizium rileyi</i> y <i>Heterorhabditis</i> spp.....	29
<b>Tabla 8.</b> Mortalidad media de <i>S. frugiperda</i> siete días después de la aplicación de <i>M. rileyi</i> conidios y <i>Heterorhabditis</i> (IJs) en plantas de maíz infestadas en el invernadero. Las medias seguidas de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) (prueba de Tukey).....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Larva del 5to estadio de <i>S. frugiperda</i> alimentándose del cogollo del maíz, INIFAP, 2008.....	6
<b>Figura 2.</b> Ciclo biológico de <i>S. frugiperda</i> , mostrando larvas neonatas, larva 6° estadio; Pupa, Adulto y huevecillos.....	8
<b>Figura 3.</b> Daño avanzado de <i>S. frugiperda</i> en hojas y cogollo de plantas de maíz, Saltillo, México.....	9
<b>Figura 4.</b> Formulación de los diferentes tratamientos con conidios de <i>M. rileyi</i> , Cámara bioclimática número 7, Departamento de Parasitología, UAAAN, Saltillo, Mexico.....	20
<b>Figura 5.</b> Aplicación de los diferentes tratamientos a larvas de <i>S. frugiperda</i> , usando una micropipeta, Cámara bioclimática número 7, departamento de Parasitología, UAAAN, Saltillo, Mex.....	20
<b>Figura 6.</b> A; Infestacion artificial de <i>S. frugiperda</i> a plantas de maíz, B; Semillas pregerminadas de maíz sembradas en recipientes, UAAAN, Saltillo, Mex.....	22
<b>Figura 7.</b> Aplicación de los diferentes tratamientos a plantas de maíz, UAAAN, Saltillo, Mex.....	23
<b>Figura 8.</b> El porcentaje de mortalidad de <i>Spodoptera frugiperda</i> causado por <i>Metarhizium rileyi</i> , tomado cada 24 horas hasta las 72 horas.....	24
<b>Figura 9.</b> El porcentaje de mortalidad de <i>Spodoptera frugiperda</i> por <i>Metarhizium rileyi</i> , tomado cada 24 horas, hasta las 168 horas.....	26
<b>Figura 10.</b> Porcentaje de larvas micosadas, infectadas por <i>Metarhizium rileyi</i> , (T1 = $1 \times 10^9$ , T2 = $1 \times 10^8$ , T3 = $1 \times 10^7$ , T4 = $1 \times 10^6$ , T5 = $1 \times 10^5$ , T6 = Agua + Bionex).....	27
<b>Figura 11.</b> Porcentaje medio de mortalidad de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> en plantas de maíz después de la aplicación de <i>Metarhizium rileyi</i> y <i>Heterorhabditis</i> spp. * = conidios de <i>M. rileyi</i> / planta; 500 = <i>Heterorhabditis</i> IJs / planta; Test. Abs. = control absoluto; Test = control, sólo agua + surfactante).....	29



## RESUMEN

El gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*) es una de las plagas de maíz más importantes; Los entomopatógenos podrían desempeñar un papel importante en el manejo del gusano cogollero. *Metarhizium* (= *Nomuraea*) *rileyi* y *Heterorhabditis* son patógenos de los lepidópteros. Los bioensayos se llevaron a cabo para evaluar la mortalidad causada por cepas nativas (Saltillo, Coahuila) de estos patógenos en larvas del tercer estadio, en el laboratorio y en plantas en el invernadero. En el laboratorio, las esporas de *M. rileyi* se suspendieron en agua con Bionex (0,3%), los tratamientos fueron T1 =  $1 \times 10^9$ , T2 =  $1 \times 10^8$ , T3 =  $1 \times 10^7$ , T4 =  $1 \times 10^6$ , T5 =  $1 \times 10^5$  (todas las esporas / ml). El tratamiento T4 causó una rápida mortalidad después de entre 72-120 horas, matando a casi el 100% de las larvas; los tratamientos 2, 3 y 4 también mataron a casi el 100% de las larvas entre las 72-168 h; pero se observó más esporulación en larvas muertas en concentraciones más bajas, especialmente en  $1 \times 10^6$  esporas / ml. (60% de esporulación). En la prueba de invernadero en plantas de maíz infestadas con una larva de *S. frugiperda*, asperjamos tres concentraciones de esporas de *M. rileyi* / ml (T1 =  $1 \times 10^6$ , T2 =  $1 \times 10^7$ , T3 =  $1 \times 10^8$ ) y se aplicó una suspensión de nematodos *Heterorhabditis* (700 nematodos / ml) utilizando una micropipeta. . Todos se aplicaron a 5 ml / planta (n = 32 plantas / tratamiento). Los tratamientos fueron evaluados cada 24 horas. Los tratamientos 2 ( $1 \times 10^7$ ) y 3 ( $1 \times 10^8$ ) indujeron la mayor mortalidad (72 y 82% respectivamente) sin diferencias significativas. Los nematodos *Heterorhabditis* indujeron el 39% de la mortalidad. Estas cepas nativas son agentes de control biológico interesantes del gusano cogollero que deben probarse en campo abierto.

Palabras clave: *Metarhizium rileyi*, *Heterorhabditis*, Control biológico, Gusano cogollero

## ABSTRAC

The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, is one of the most important corn pests; entomopathogens could play an important role in fall armyworm management. *Metarhizium* (= *Nomuraea*) *rileyi* and *Heterorhabditis* nematodes are pathogens of lepidopterans. Bioassays were carried out to evaluate the mortality caused by native strains of these pathogens on 3rd instar fall armyworm larvae, in the laboratory and on plants in the greenhouse. In the laboratory, *M. rileyi* spores were suspended in water with Bionex (0.3%), the treatments were T1=1x10<sup>9</sup>, T2=1x10<sup>8</sup>, T3=1x10<sup>7</sup>, T4=1x10<sup>6</sup>, T5=1x10<sup>5</sup> (all spores/ml). The treatment T4 caused quick mortality after between 72-120 hours, killing almost 100% of larvae; the treatments 2, 3 and 4 also killed almost 100% of larvae between 72-168 h; but more sporulation was observed on killed worms at lower concentrations, especially in Treatment 4 (60 % sporulation). In the greenhouse test on corn plants, we sprayed three concentrations of *M. rileyi* spores/ml (T1=1x10<sup>6</sup>, T2=1x10<sup>7</sup>, T3=1x10<sup>8</sup>), and one suspension of *Heterorhabditis* nematodes (700 nematodes/ml) was applied using a micropipette. All were applied at 5 ml/plant (n=32 plants/treatment). Treatments were evaluated every 24 hours. Treatments 2 and 3 induced the highest mortality (72 and 82 % respectively) with no significant differences. *Heterorhabditis* induced 39 % of mortality, having the lowest mortality. These native strains are interesting biological control agents of fall armyworm that should be tested in open field.

Key words: *Metarhizium rileyi*, *Heterorhabditis*, Biological control, Fall armyworm

## 1. INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es el cultivo más producido en todo el mundo (USDA-FAS 2013). México es el quinto productor más grande de este cultivo (Matsuoka et al. 2002). Desde el punto de vista alimentario, político, económico y social, el maíz es el cultivo más importante del país (SIAP, 2007). El consumo por persona de maíz en México es, en promedio, 10 veces (168 kg) mayor que el de Estados Unidos (16.8 kg) (Serna-Saldívar y Amaya-Guerra, 2008).

El gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), es una especie polífaga que infesta al menos a 186 plantas hospedadoras, ahora en todo el mundo (Sidana et al. 2018). Es activo todo el año en áreas tropicales, ya que es un insecto que no produce diapausa (Raulston et al. 1986).

El método más utilizado para el control mundial del gusano cogollero es el control químico; sin embargo, la aplicación de insecticidas biológicos se ha desarrollado y probado en programas de manejo integrado de plagas (MIP) (Alves 1986). Entre los organismos de control biológico utilizados para controlar las poblaciones de cogolleros, los hongos y los nematodos entomopatógenos han sido ampliamente estudiados (Ferraz 1998, Grewal et al. 2001).

El hongo entomopatógeno *Metarhizium rileyi* (= *Nomuraea rileyi*) es una especie cosmopolita que infecta específicamente especies en el orden Lepidóptera, particularmente noctuidos (Lacey y Kaya, 2007). Se han detectado diferencias en la virulencia entre cepas aisladas de diferentes insectos hospedadores (Ignoffo et al., 1976; Tigano-Milani et al., 1995; Zhou et al., 2012). Con el renovado interés en el control biológico de plagas de insectos, *M. rileyi* ha demostrado un valor potencial para su aplicación en el Manejo Integrado de Plagas (de Faria y Wraight, 2007; Devi y Prasad, 2001; Lawrence et al., 2012 y un producto de control microbiano sobre *M. rileyi* se ha desarrollado en Colombia (Shah y Goettel, 1999).

La clasificación de *M. rileyi* a nivel genérico y de especie ha sufrido muchos cambios: los sinónimos incluyen *Botrytis rileyi*, *Nomuraea prasina*, *Spicaria prasina*, *Spicaria rileyi*, *Beauveria rileyi* y *Nomuraea rileyi* (Kish et al., 1974). En 2014, el análisis filogenético de múltiples genes indicó que las cepas fúngicas identificadas como *N. rileyi* deben transferirse al género *Metarhizium* (Kepler et al., 2014).

Otros organismos probados para controlar las poblaciones de *S. frugiperda* incluyen nematodos entomopatógenos como *Heterorhabditis* spp. (Ferraz 1998, Grewal et al. 2001). *Heterorhabditis* spp. se han encontrado para controlar las especies de lepidópteros; se cree que tienen un potencial excelente para ciertas plagas en hábitats crípticos (como el y el suelo (Gaugler, 1981).

### 1.1 ANTECEDENTES DE *Metarhizium rileyi*

Los hongos entomopatógenos tienen un gran potencial como agentes controladores, constituyendo un grupo con más de 750 especies, diseminados en el medio ambiente y provocando infecciones fungosas a poblaciones de artrópodos.

Primero descrito como *Botritis rileyi* por Farlow; en 1936 fue trasladado a *Spicaria* por Charles; posteriormente las especies de *Spicaria* fueron ubicadas en *Paecilomyces*, sin embargo por la característica de la fialide atípicas y su coloración, impidieron que fuera transferida a ese Género y se ubicó en *Penicillium*, sin embargo, muchos investigadores continuaron usando el nombre de *Spicaria* y hasta 1974 se reestructura el género *Nomuraea*; cambiando de *Spicaria rileyi* a *Nomuraea rileyi*.

Cuando un larva es infectada por *N. rileyi*, los primeros síntomas en manifestarse se presentan a los dos o tres días después del contacto con la conidia; los primeros síntomas en manifestarse son: diminutos puntos de color amarillentos a marrón sobre el integumento; consecuentemente la larva pierde movimiento y deja de alimentarse; se torna pálida y muestra una hinchazón en los segmentos posteriores del abdomen. Al paso de cinco a siete días ocurre la muerte de la larva. Se da una momificación causada por el crecimiento de micelio de color blanco; dos o tres días después, se lleva a cabo la producción de esporas, tornándose de un color verde pálido (Bustillos y Posada, 1986).

*Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera : Noctuidae), descrito en 1852 por J. E. Smith el cual al paso de los años y tras una serie de caracterizaciones, se colocó dentro del género *Spodoptera*; dentro del cual podemos encontrar especies de importancia tales como : *S. exigua* Hubner, *S. dolichos* S.F., *S. cosmioides* Walker (Levyet *et al.*, 1976). El gusano cogollero es una plaga altamente voraz, la cual puede causar daños desde 20 % o en caso extremo la pérdida total del cultivo, desde plántula hasta floración (Del rincón *et al.*, 2006).

*Spodoptera* se encuentra ampliamente distribuida en la región mexicana y a lo largo de América (Morva *et al.*, 2004)

### *Steinernema carpocapse*

Fue aislado por Weiser de una larva enferma de *Cydia pomonella* y descrito como *Neoapectana carpocapsae* en 1955; desde entonces es uno de los nematodos entomopatógenos más estudiado.

El parasitismo de insectos por nematodos es actualmente bien conocido. Durante los últimos 10 años ha crecido el interés por utilizar especies de la familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*, en el control biológico de insectos en varias regiones y países del mundo (Norte américa, Australia, China, y Europa (Deseo, 1989; Georgis y Hom, 1992).

El nematodo *Steinernema carpocapsae* Weiser (Rhabditida: Steinernematidae) (Wounts *et al.*, 1982) es un agente de control biológico prometedor (Fuxa *et al.*, 1988; Ritcher y Fuxa, 1990); presenta gran distribución geográfica y un amplio rango de hospederos (Poinar, 1976, 1986; Zimmerman, 1978).

## **1.2 HIPÓTESIS**

Los entomopatógenos *Metarhizium rileyi*, *Heterorhabditis* spp. y *Steinernema* spp matarán hasta un 95% de larvas de *Spodoptera frugiperda*.

## **1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar la mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* causado por *Metarhizium rileyi* en laboratorio.
2. Evaluar la mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* causado por 6 cepas de nematodos; 3 de *Heterorhabditis* spp. y 3 de *Steinernema* spp. en laboratorio.
3. Evaluar la mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* causadas por *Nomuraea rileyi* y el nematodo *Heterorhabditis* spp. en plantas de maíz.

## 2 REVISIÓN DE LITERATURA

### 3.1 El maíz

El maíz del género *Zea* y especie *mays*, fue descrito por Carlos Linneo, actualmente no se sabe con certeza la época y lugar de descubrimiento, por lo que, se le considero nativo principalmente de dos lugares, Asia y América. Destaca más América como su lugar de origen debido a los numerosos hallazgos sobre este (Reyes, 1990). Actualmente en México se conocen 60 variedades nativas reconocidas, lo que lo convierte en el centro del origen más importante, principalmente en los estados de Oaxaca y Puebla (Reyes, 1990; Conabio, 2006; Kato et al., Benavides et al., 2010).

#### 2.1.1 Clasificación taxonómica del maíz

**Reino: Plantae**

**Subreino: Tracheobiota**

**Superdivision: Spermatophyta**

**División: Magnoliophyta**

**Clase: Liliopsida**

**Subclase: Commelinidae**

**Orden: Cyperales**

**Familia: Poaceae**

**Tribu: Maydeae**

**Género: *Zea***

**Especie: *mays* L.**

El maíz es una planta monoica de flores unisexuales, que presenta flores masculinas y femeninas bien diferenciadas en la misma planta: la inflorescencia masculina es terminal,

largamente pedunculada, conocida como panícula (o espiga) que consta de un eje central o raquis y ramas laterales; a lo largo del eje central se distribuyen los pares de espiguillas de forma polística y en las ramas con arreglo dístico y cada espiguilla esta protegida por dos brácteas o glumas, que a su vez contiene en forma apareada las flores estaminadas; en cada florecilla componente de la panícula hay tres estambres donde se desarrolla el polen.

La coloración de la panícula esta en función de la tonalidad de las glumas y anteras, que pueden ser de coloración verde, amarilla, rojiza o morada (Jugenheimer, 1988; Reyes, 1990; Benavides *et al.*, 2010).

### **2.1.2. Principales plagas del maíz**

Uno de los factores más importantes que limitan la producción de maíz, son las plagas; capaces de infestar el maíz en cualquier etapa de su desarrollo o en el almacén y además, pueden atacar cualquier parte de la planta, a menudo con graves consecuencias (Ortega, 1987), entre las principales encontramos: gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), Trips (*Frankliniella wiliamsi*), gusano soldado (*Spodoptera exigua*), gusano trozador (*Agrotis* sp.), gusano elotero (*Agrotis* sp.), barrenador del tallo (*Diatraea* sp.), frailecillo (*Macroductylus mexicanus*), picudos (*Geraeus senilis*, *Nicentrites testaceipes*), araña roja (*Olygonychus mexicanus* y *Tetranychus* sp.), chapulines (*Sphenarium* sp., *Melanoplus* sp.), gallina ciega (*phyllophaga* sp., *Cyclocephala* sp., *Diplotaxis* sp., *Macroductylus* sp., y *Anomala* sp.), diabrotica (*Diabrotica virgifera zea*), catarina del maíz (*Colaspis* sp.), gusano de alambre (*Agriotes* sp.), (cesaveg.org.mx).

### **2.2 El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**

Este insecto del orden lepidóptera es descrito por primera vez en 1852 como *Phalaena frugiperda* por Smith y Abbot, luego Guenée lo coloca bajo el género *Laphygma*, y Zimmerman en 1958 reemplaza *Laphygma* por *Spodoptera* (Severini, 1985).

*S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) se reconoce como la plaga americana más importante de las regiones tropicales y de las zonas templadas (Sparks, 1979; Andrews, 1980; Foott y Timmins, 1982; Abbas Ali *et al.*, 1989).

La gran importancia que tiene este insecto es debido a su hábito polífago, presenta preferencia hacia 80 especies de plantas dentro de 23 familias diferentes (Pashley, 1988); dentro de las

que se encuentran las gramíneas (maíz, sorgo, arroz, caña de azúcar y pastos forrajeros), cultivos de oleaginosas, y algodón, entre otros. Esta importancia agrícola ha hecho que muchos países lleven a cabo programas de investigación para conocer con precisión su biología, su comportamiento, y posibles métodos de control.

El gusano cogollero del maíz, es una plaga agrícola que pasa el invierno en zonas tropicales y causa daños costosos al maíz, arroz, maní, algodón, soya, alfalfa y pastos forrajeros (Knipling 1980, Pashley 1986, Lu y Adang 1996). Hay a las menos dos cepas de gusano cogollero específicas de la planta hospedadora morfológicamente indistinguibles. Una cepa se alimenta de maíz y sorgo (cepa de maíz) y la otra de arroz y bermuda (cepa de arroz).



**Figura 1.** Larva del 5to estadio de *S. frugiperda* alimentándose del cogollo del maíz, INIFAP, 2008.

### 2.2.1 Biología y ciclo de vida

El adulto de *S. frugiperda* presenta hábito nocturno, durante el crepúsculo, inician sus movimientos cerca de la planta seleccionada para su alimentación, oviposición y apareamiento; si la población se localiza cerca de una plantación de maíz, estas se dirigen hacia ella, colocándose junto al cogollo. Dos horas después de la emergencia de la palomilla (dependiendo de la temperatura y la época del año), las hembras vírgenes inician el llamado del macho, extendiendo su ovipositor y emitiendo feromonas sexuales para indicar su disposición para el apareamiento (Sparks, 1979).



### **2.2.2 Huevecillo**

Posee un ciclo de vida de aproximadamente 30 días en verano, 60 días en primavera 90 días en invierno (All *et al.*, 1988). Para su propagación los adultos realizan ovoposiciones en el envés de las hojas, depositando alrededor de 100-200 huevecillos cubiertos de escamas, las cuales sirven como protección contra depredadores y parasitoides; el proceso de eclosión de huevo a larva dura aproximadamente de 3-4 días.

### **2.2.3 Larva**

Las larvas al nacer se alimentan del corion, más tarde se trasladan a diferentes partes de la planta o las vecinas, evitando así la competencia por el alimento y el canibalismo. Su color varía según el alimento pero en general son oscuras con tres rayas pálidas estrechas y longitudinales; en el dorso se distingue una banda negruzca más ancha hacia el costado y otra parecida pero amarillenta más abajo; en la frente de la cabeza se distingue una “Y” blanca invertida, (Angulo, 2000).

Las larvas pasan por seis o siete estadios o mudas, siendo de mayor importancia para tomar las medidas de control los dos primeros; en el primero estas miden hasta 2-3 mm y la cabeza es negra completamente, el segundo mide de 4-10 mm y la cabeza es café claro; las larvas pueden alcanzar hasta 35 mm en su último estadio.

### **2.2.4 Pupa**

Dentro del ciclo de vida de *S. frugiperda* se encuentra la fase de pupa o latencia; esta fase la lleva a cabo en el suelo, donde la larva de último estadio se entierra y al llegar a esta fase, toma forma de capullo al cual se le denomina pupa. Posee un color café-rojizo, llega a medir de 10-18 mm de longitud; los factores más importantes para llevar a cabo este ciclo biológico son la humedad y la temperatura; son altamente afectados por los climas fríos o muy calientes; el rango óptimo de temperatura para su desarrollo oscila entre los 28-30 °C; este proceso puede durar en completarse de 20-30 días en verano y de 89 días en invierno (Vivas, 2003).

### 2.2.5 Adulto

En esta fase se puede observar al adulto ya en forma de palomilla que tiene hábitos nocturnos; por lo regular prefiere clima templado con alto porcentaje de humedad relativa y puede trasladarse a largas distancias. Las palomillas machos y hembras pueden ser identificadas mediante variaciones fisiológicas (Dimorfismo sexual). Para la identificación de un macho se observa una coloración gris a café en las alas con manchas triangulares en las puntas y en el centro. Para la identificación de las hembras se considera a las alas mismas que poseen un color más homogéneo, de gris y café, sin manchado, ambos sexos poseen un ciclo de vida de 10-13 días.



**Figura 2.** Ciclo biológico de *S. frugiperda*, mostrando larvas neonatas, larva 6° estadio; Pupa, Adulto y huevecillos.

### 2.2.6 Daños que ocasiona

Los primeros daños que se observan en la planta se dan con la aparición de los primeros ciclos larvarios; en los primeros instares la larva causa daños en forma de raspaduras en hojas y cogollo, dejando heridas transparentes. En los instares más grandes la larva comienza a alimentarse de follaje, principalmente de partes tiernas y succulentas; al alimentarse del cogollo causa orificios de pequeños a grandes y de no ser controlado causa la muerte del cogollo y siendo éste el medio de crecimiento de la planta y, al no existir la planta muere; en las hojas causa orificios grandes interrumpiendo con esto el ciclo de la fotosíntesis.



**Figura 3.** Daño avanzado de *S. frugiperda* en hojas y cogollo de plantas de maíz, Saltillo, México.

### **2.3 Métodos de control de *Spodoptera frugiperda***

Actualmente existen diferentes métodos con los cuales se puede llevar a cabo un control de este insecto plaga, de esta manera, se puede concluir con algunas prácticas necesarias para prevenir la infestación del mismo: (Gladstone y Hruska, 2003); los métodos más comúnmente utilizados son de tipo cultural, químico y biológico.

#### **2.3.1 Control cultural**

Las medidas que ayudan a reducir el daño incluyen una buena fertilidad del suelo para asegurar un desarrollo rápido de la planta, minimizar la exposición de las plantas jóvenes al ataque y permitir una recuperación del daño. También la siembra en densidades mayores permite compensar las pérdidas, así como la rotación con una leguminosa para reducir la reinfestación y el control de malezas gramíneas (García et al. 2002).

### 2.3.2 Control químico

El gusano cogollero del maíz es una plaga comúnmente controlada con plaguicidas químicos, presentándose una alta dependencia de los agricultores a este medio de control. Si la aplicación se realiza en forma oportuna y bien dirigida al sitio donde está la plaga, el control puede ser satisfactorio pero no deja de ser un control temporal, siendo necesario repetir la aplicación cuando se presente otra generación del insecto (García & Pulido, 1984). Existe una gran variedad de insecticidas tales como metomil, clorpirifos y cipermetrina, plaguicidas de categorías toxicológicas I, II y III respectivamente (I = extremadamente tóxico, II = altamente tóxico, III = moderadamente tóxico). Sin embargo, su uso continuo provoca disturbios en la dinámica de la plaga al destruir sus enemigos naturales, además de problemas de resistencia a estos compuestos, intoxicación en operarios que aplican los productos en campo, contaminación del ambiente y un incremento notable en los costos de producción (García & Pulido 1984).

### 2.3.3 Control físico

Las lluvias continuas, especialmente en las primeras tres semanas de sembrado el maíz, época en la cual ocurre la mayor oviposición y el nacimiento de las larvas; , contribuyen a la reducción del daño por la alta mortalidad de larvas pequeñas, muchas de las cuales mueren por ahogamiento en el cogollo. Actividades como el riego, interfiere con la oviposición de las hembras y contribuye con la mortalidad de las larvas pequeñas (García, 2000).

### 2.3.4 Control biológico

El gusano cogollero del maíz *S. frugiperda* es un insecto que posee una amplia gama de enemigos naturales, como especies de parasitoides y organismos entomopatógenos como hongos, virus y bacterias (Rodríguez 1984). Entre las especies de parasitoides se encuentran *Cotesia marginiventris* (Cresson) y *Chelonus texanus* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae), especies que también están asociados con otras especies de noctuidos. Los depredadores del gusano cogollero son los mismos que atacan generalmente a otras plagas como *Labidura riparia* (Pallas) (Dermaptera: Labiduridae), *Podisus maculiventris* (Say) (Hemiptera: Pentatomidae), y *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae) (Hoballah et al. 2004).

Se conocen numerosos agentes patógenos, incluyendo virus, hongos, protozoos, nematodos, y bacterias que afectan al gusano cogollero del maíz (Gardner & Fuxa 1980), pero sólo unos pocos causan epizootias. Entre los microorganismos más importantes se encuentra el virus de la poliedrosis nuclear (NPV), los hongos entomopatógenos *Entomophaga aulicae*, *Nomuraea rileyi* e *Isaria* spp. y la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Hoballah et al. 2004).

#### **2.4 Resistencia a insecticidas**

La resistencia del gusano cogollero a insecticidas fue primeramente reportada por Young y McMillian, quien encontró que una población de este insecto colectado de campos de maíz en Tifton, Georgia, (EE.UU.) fue resistente al carbaril. Las larvas resistentes fueron capaces de detectar y evitar alimentarse de hojas tratadas con este carbamato lo que resulta en baja mortalidad (J. R. Young y W. W. McMillian 1979).

Las bases bioquímicas de resistencia fue encontrado después se debe principalmente a la desintoxicación mejorada de carbaril por oxidasas microsómicas (a través de la hidroxilación y epoxidación) en este insecto (E. McCord, Jr., y S. J. Yu, 1987).

#### **2.5 Nematodos entomopatógenos**

En el manejo mediante nematodos entomopatógenos para el control de insectos, encontramos como los más importantes a los géneros: *Steinernema* y *Heterorhabditis*. Los cuales son efectivos en actividades en suelo y actúan en simbiosis con bacterias (*Xenorhabdus* y *Photorhabdus*); del suelo (Bustillos, 1976). Los nematodos tienen un tiempo de acción mortal de alrededor de 24-48 horas y son de fácil aplicación y manejo.

#### **2.6 Bacterias entomopatógenas**

Este tipo de microorganismos actúan dentro del cuerpo de la larva, en el cual realizan el proceso de incubación y producción de toxinas; la larva al ser infectada por una bacteria muestra una lentitud en movimientos y expulsa líquidos por el ano y la boca. Al poco tiempo

de la infección, las larvas presentan una consistencia blanda del cuerpo y al momento de su muerte se muestra una coloración negra (Gladstone *et al.*, 2003). Entre las bacterias más importantes y utilizadas tenemos a *Bacillus thuringiensis* (Bt), debido a su grado de toxicidad (Vergara, 2004).

Bt, es una bacteria gram-positiva; que en su fase de crecimiento vegetativo presenta una duplicación por bipartición y esporulación; puede ser aislada de diferentes lugares tales como: suelo, agua, hojas de plantas e insectos muertos. Se le caracteriza por la producción de cristales los cuales con de naturaleza proteica y poseen propiedades insecticidas (Tomasino *et al.*, 1995).

### **2.7 Virus entomopatógenos**

Entre los virus entomopatógenos más utilizados en el control de insectos encontramos a los de las familias: *Baculoviridae* y *Reoviridae*, los cuales presentan una envoltura proteica (Faulkner y Boucias, 1985).

Dentro del control biológico el más utilizado son los Baculovirus, debido a su especificidad por especies de los órdenes; Lepidoptera, Himenóptera, Díptera, Coleópteros, Tricópteros. Quizá de los virus entomopatógenos el más destacado es el de la poliedrosis nuclear, utilizado principalmente para el control de noctuidos.

### **2.8 Hongos entomopatógenos**

Según Pucheta Díaz *et al.*, (2006), los hongos entomopatógenos tienen un gran potencial como agentes controladores, constituyendo un grupo con más de 750 especies, diseminados en el medio ambiente y provocando infecciones fungosas a poblaciones de artrópodos.

Dentro de los patógenos más usados en el control microbial, se encuentran los hongos entomopatógenos, los cuales deben su eficiencia a la capacidad que poseen de penetrar la cutícula de los insectos, invadir el hemocele y ocasionar la muerte rápida debido a la liberación de toxinas. Cuando el hongo esporula, frecuentemente ocasionan epizootias que reducen significativamente las poblaciones de los insectos plaga (Gullan y Cranston, 2010).

Se conocen más de 100 géneros y 700 especies, pero poco más de 10 sido empleadas en el control biológico de insectos. Entre los más importantes se destacan; *Beauveria*, *Metarhizium*, *Nomuraeae*, *Entomophthora*, *Aschersonia*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Isaria* y *Lecanicillum* (Hajek y S. Leger, 1994).

## 2.9 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos inician su proceso infectivo en los insectos hospederos cuando las esporas viables son retenidas por contacto en la superficie del integumento, mientras encuentran un espacio propicio para establecer la asociación patógeno-hospedero (Jones, 1994) y formar los túbulos germinales y a veces el apresorio, que facilitarán la invasión del hongo. (Hajek, 1997; Deshpande, 1999; Milner, 2000; Asaff et al., 2002; Barranco et al., 2002). Se ha sugerido que iones divalentes como el  $\text{Ca}^{+2}$  y el  $\text{Mg}^{+2}$  reducen las fuerzas de repulsión electrostática de la superficie de la del insecto, por lo que pueden afectar su hidrofobicidad y promover la adhesión a la pared celular fúngica-cutícula, creando condiciones favorables para el establecimiento de la espora y la subsecuente invasión del hospedero (Barnes y Moore, 1997; Jeffs et al., 1997; Kershaw y Talbot, 1998; Wessels, 1999).

La germinación de la espora se inicia con el hinchamiento de la misma, que es favorecido por una humedad alta (70% durante 14h); la germinación es disparada por mensajeros que generalmente son carbohidratos presentes en las proteínas cuticulares del insecto (Hegedus y Khachatourians, 1995; Khachatourians, 1996). La hidratación de la espora es favorecida por la acción antidesecante de su cubierta mucilaginosa, que además funciona como protector ante la presencia de polifenoles tóxicos y enzimas, secretadas por el sistema inmune del insecto. Sin embargo, se han encontrado esterases y proteasas en conidias no germinadas, lo que sugiere una modificación de la superficie cuticular previa a la germinación, ya que durante la hidratación la espora no solo absorbe agua, sino también nutrientes (Jones, 1994; Kershaw y Talbot, 1998).

Después del hinchamiento de la espora tiene lugar la formación del tubo germinativo mediante el proceso de polarización típico del crecimiento apical de los hongos, que estimula la síntesis de la pared celular. Los iones  $\text{H}^{+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  entran en la punta de la hifa a través de un mecanismo de transporte pasivo y son expulsados por mecanismos dependientes de energía.

Este flujo transcelular permanece constante y mantiene el desarrollo del tubo germinativo y la formación del apresorio, una estructura especializada formada en el tubo germinativo (Riquelme et al., 1998; Harold, 1999; Wessels, 1999). El tubo germinativo rastrea y reconoce la superficie del insecto para la localización de sitios receptores, habilitando a la hifa para la

penetración de la cutícula (Wessels, 1999). El apresorio sirve para el anclaje de la espora y ejerce una presión hacia el interior del insecto. Paralelamente, el hongo excreta una gran cantidad de enzimas entre las que se incluyen proteasas, quitinasas, quitobiasas, lipasas, lipooxigenasas y otras enzimas hidrolíticas, que van degradando la cutícula y proporcionan a su vez nutrientes al hongo (Monzón, 2001).

Una vez dentro del insecto, el hongo se reproduce formando cuerpos hifales secundarios, que se ramifican en la procutícula formada principalmente de fibras lameladas de quitina embebidas en una matriz proteica que actúa como cubierta física protectora frente a las secreciones extracelulares del patógeno. Posteriormente, los cuerpos hifales se encuentran con la capa epidérmica y con su respectiva membrana basal y se diseminan a través del hemocele (Deshpande, 1999). Así, invaden diversas estructuras como tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi, mitocondrias, hemocitos, retículo endoplásmico y membrana nuclear.

Al agotarse los nutrientes, el hongo inicia un crecimiento miceliar invadiendo todos los órganos del hospedero. Finalmente, las hifas perforan la cutícula desde el interior del insecto y emergen al exterior del mismo iniciando la formación de esporas cuando la humedad relativa es apropiada (Gillespie y Claydon, 1989).

Cabe mencionar que durante la penetración del hongo desde la cutícula del insecto hasta el hemocele, la hifa queda sumergida en proteínas, quitina, lípidos, melanina, difenoles y carbohidratos; algunos de ellos son nutrientes pero otros pueden inhibir su desarrollo, ya que el insecto activa su sistema inmunitario a través de procesos como nodulación, melanización, fagocitosis, y encapsulamiento (St. Leger y Roberts, 1997). Sin embargo, los hongos desarrollan una serie de procesos que les permiten evitar este tipo de defensas, tales como cambios en la pared celular y producción de sustancias inmunomoduladoras o toxinas fúngicas (Khachatourians, 1991).



### 3 MATERIALES Y METODOLOGÍA

Estos bioensayos se realizaron en el Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y en invernaderos de la misma universidad.

#### 3.1 Crianza de *Spodoptera frugiperda* en laboratorio

Toda la cría y pruebas de laboratorio se realizaron a temperatura ambiente (23-27°C, luz fluorescente difusa superior, 30-50% HR). Las larvas de *S. frugiperda* se recolectaron de los campos de maíz y se mantuvieron individualmente en vasos de plástico de 20 ml; las larvas fueron alimentadas con pasto Bermuda (*Cynodon dactylon*) hasta que puparon. Se colocaron grupos de 20-25 pupas en jaulas de 1 litro, cubiertas con tela tipo malla y se les colocó papel secante, para generar un ambiente más favorable para cuando emergieran los adultos; . Después de aproximadamente una semana, emergieron adultos y se les alimentó con bolas de algodón empapadas con bebidas azucaradas (Coca-Cola) o agua con azúcar. Después de que los adultos pusieron masas de huevos, estos se incubaron a temperatura ambiente para obtener larvas. En estas condiciones, una generación tardó aproximadamente un mes. En todas las pruebas, las larvas se manejaron individualmente debido a sus hábitos caníbales. Utilizamos larvas de una colonia criada en el laboratorio durante al menos cinco generaciones.

#### 3.2 Aislamiento de *Metarhizium rileyi*

La cepa fúngica se obtuvo de parcelas de maíz en el campo experimental "El Bajío", parte de las instalaciones de la Universidad. Recolectamos larvas muertas de *S. frugiperda* infectadas con *M. rileyi*. Estas muestras se colocaron en cámaras húmedas (placas de Petri selladas, con bolas de algodón ligeramente humedecido) durante 24-48 h. Cuando apareció o se incrementó el crecimiento de hongos y se observó una gran cantidad de conidios en las larvas, los conidios se transfirieron a agar para obtener cultivos de hongos puros. Se utilizó agar de soya (200 ml de extracto de soya + 5gr de extracto de levadura + 18gr de agar; completado en 1L de agua) (Felipe-Victoriano, 2013). El extracto de soya se obtuvo de 200 gr de soya hervida durante 20 minutos en 1.2 litros de agua purificada; luego se usó el caldo de soya

(Felipe-Victoriano 2013). Para la producción de esporas a bajo costo, utilizamos un medio nutritivo líquido a base de este extracto de soya complementado con extracto de levadura comercial (5gr / l). Este caldo se inoculó con conidias de *M. rileyi* y se incubó durante 5-7 días a  $22 \pm 18^{\circ}\text{C}$  en un agitador (Orbit 1000®) a una velocidad de 150 rpm hasta que el micelio creció durante siete días. El micelio en caldo se inoculó en bolsas de polietileno con arroz blanco en autoclave (Aquino et al. 1977; Feng et al. 1994; Felipe-Victoriano 2013). Las bolsas se incubaron durante 10 días, hasta que el arroz estuvo completamente cubierto con conidias de *M. rileyi*.

### **3.3 Aislamiento del nematodos entomopatógenos**

Los nematodos se obtuvieron de muestras de suelo recolectadas también en los campos experimentales "El Bajío". La técnica de insecto cebo se utilizó según lo informado por Sánchez-Peña et al (2011). Se colocaron cincuenta muestras de suelo (300 ml cada una) en recipientes de plástico (500 ml). Se agregaron larvas de gusanos de la harina (*Tenebrio molitor* L.; Coleoptera: Tenebrionidae) (cinco larvas / contenedor) en contacto directo con el suelo. Las larvas se obtuvieron de una colonia de laboratorio. Las muestras de suelo con larvas se mantuvieron en el laboratorio a temperatura ambiente durante 10 días; después del quinto día y diariamente a partir de entonces, las larvas muertas fueron removidas del suelo. Las larvas que presentaron síntomas de ataque de nematodos (flacidez y cambios de color) (Poinar 1979) se colocaron en trampas blancas modificadas por Kaya y Stock (1997) para la recuperación de nematodos entomopatógenos. Las larvas infectadas se mantuvieron durante 15 días en las trampas, mientras que los nematodos entomopatógenos se colectaron del agua mediante inspección y detección diarias (Molina et al., 2006). El nematodo de *Heterorhabditis* (cepa M26) utilizado en estos experimentos se había mantenido en el laboratorio durante más de dos años, criado en larvas de *T. molitor*.

### **3.4 Efectividad biológica de seis cepas de nematodos; *Steinenerma* spp. y *Heterorabditis* sp. contra el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* en laboratorio.**

Este experimento se realizó en el laboratorio del departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Para el bioensayo se tomaron larvas de *S. frugiperda* de la colonia descrita anteriormente, el estadio en el que se utilizó las larvas fueron en el estadio tres, unas larvas de aproximadamente 3cm de largo se utilizaron en este bioensayo.

Se utilizaron vasos (350) de 20ml, se recortaron pequeños círculos de papel secante húmedo para cubrir el fondo de cada vaso, esto para preservar la humedad.

Una a una, las larvas fueron separadas y puestas en los vasos, también se les agregó una pequeña porción de comida (pasto), el cual se colectó en los jardines de la universidad.

Los vasos con larvas se colocaron en charolas (30 vasos en cada una), hasta tener un total de 350 larvas.

Ya habiendo contabilizado los nematodos, utilizando la cámara de Neubauer, se procedió a la aplicación de nematodos a los vasos, se aplicó 1.5 ml de solución con nematodos, contabilizando aproximadamente 80 nematodos por aplicación.

Ya habiendo aplicando a todos los vasos, estos se pusieron en un lugar con temperatura aproximada de 18-24 grados, y a una humedad relativa de 70-80 %, pero difiere la humedad que se registró en los vasos, pues éste provoca un microclima, que hace que aumente la temperatura y la humedad relativa.

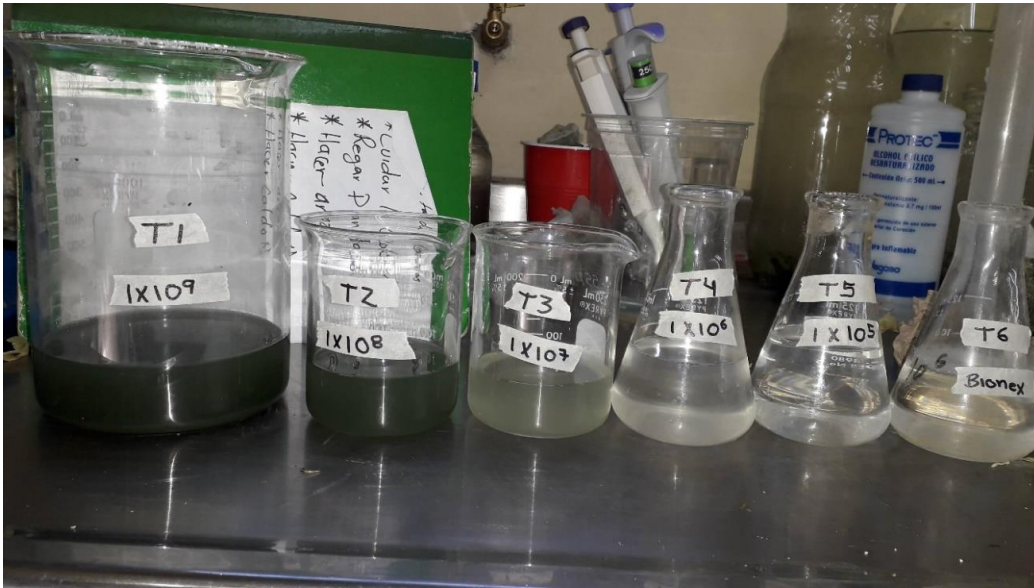
### 3.5 Evaluación de la mortalidad de *Spodoptera frugiperda* causada por suspensiones de *Metarhizium rileyi* aplicados en el dorso de la larva en laboratorio.

Las larvas del tercer estadio de *S. frugiperda* se tomaron de la colonia, se colocaron individualmente en vasos de 25 ml y se alimentaron con pasto fresco Bermuda cortado en trozos pequeños. Las esporas de *M. rileyi* se suspendieron en agua potable purificada con 0.03% de tensoactivo (Bionex® !!!! Arysta LifeScience, Saltillo, México). Los conidios de la suspensión madre se cuantificaron en una cámara Neubauer y las diluciones produjeron cinco concentraciones ( $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^5$  conidios / ml). Cada tratamiento (concentración) se aplicó individualmente a las larvas usando una micropipeta (Hamilton®, Reno, Nevada), aplicando 10  $\mu$ L al dorso abdominal de cada larva de tercer estadio (**Figuras 5 y 6**). Por lo tanto, las cantidades de conidias aplicadas a las larvas en los tratamientos fueron las siguientes:  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  y 0 conidias / larva (todas suspendidas en agua + surfactante Bionex® al 0.03%). Hubo cinco repeticiones de 10 larvas cada una por tratamiento. Las larvas individuales en vasos de plástico se mantuvieron a 80-90% de humedad relativa y 23-26°C; La mortalidad se registró cada 24 horas durante 8 días.

Las larvas muertas se transfirieron individualmente a cámaras húmedas y se incubaron a temperatura ambiente en el laboratorio durante siete días, para registrar la esporulación (desarrollo de hongos y producción de esporas verdes de *M. rileyi*) en las larvas, por cada dosis conidial aplicada a las larvas.

**Tabla 1.** Concentraciones de tratamientos, 5 tratamientos de conidas y tratamiento (Agua + Biobex), cepa NrFs1 obtenida en Saltillo, México.

Tratamientos
1 ( $1 \times 10^9$ )
2 ( $1 \times 10^8$ )
3 ( $1 \times 10^7$ )
4 ( $1 \times 10^6$ )
5 ( $1 \times 10^5$ )
6 (Water+Bionex) (testigo)



**Figura 4.** Formulación de los diferentes tratamientos con conidios de *M. rileyi*, Cámara bioclimática número 7, Departamento de Parasitología, UAAAN, Saltillo, Mexico.



**Figura 5.** Aplicación de los diferentes tratamientos a larvas de *S. frugiperda*, usando una micropipeta, Cámara bioclimática número 7, departamento de Parasitología, UAAAN, Saltillo, Mex.

### **3.6 Evaluación de la mortalidad de *Spodoptera frugiperda* causada por *Metarhizium rileyi* y *Heterorhabditis* spp. en infestación artificial en plantas de maíz en invernadero.**

Las plantas de maíz se sembraron en pequeños recipientes de plástico (1 L) utilizando tierra para macetas como sustrato (10 semillas por recipiente). Se dejaron cinco plantas en macetas para infestaciones y bioensayos. Se utilizaron plantas de 15-20 cm de altura (25 días de edad). Las plantas se infestaron artificialmente colocando manualmente una larva de tercer estadio en el cogollo de cada planta con un pincel suave número 1. Se infestó un total de 192 recipientes con cinco plantas cada uno (un total de 960 plantas); Se asignaron 32 recipientes y 160 plantas a cada tratamiento (es decir, 8 réplicas con 4 recipientes con 5 plantas cada uno) en un diseño aleatorio. Los diferentes tratamientos se enumeran en la **Tabla 2**.

Los tratamientos y el testigo, se prepararon suspendiendo conidios en agua potable purificada con 0,03% de tensioactivo (Bionex<sup>®</sup>); los tratamientos (concentraciones) fueron 0,  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$  y  $5 \times 10^8$  / planta; se aplicaron usando un atomizador (Satul<sup>®</sup>, Modelo: S-7273), comenzando con el testigo (solo agua + surfactante). La cantidad aplicada fue de 5 ml / planta, dirigida al cogollo de las plantas de maíz, donde se encuentran las larvas. El tratamiento con nematodos se aplicó a 500 IJ nematodos en 5 ml (500 IJ) directamente en el cogollo de plantas, usando una pipeta. También se incluyó un control absoluto. Las plantas infestadas y tratadas se mantuvieron en el invernadero del Laboratorio de Control Biológico a una temperatura de  $25 \pm 2$  ° C y  $75 \pm 5\%$  de humedad. Los datos de mortalidad se recolectaron cada 24 horas durante 8 días.



**Figura 6.** A; Infestacion artificial de *S. frugiperda* a plantas de maíz, B; Semillas pregerminadas de maíz sembradas en recipientes, UAAAN, Saltillo, Mex.

**Tabla 2.** Concentraciones de hongos (en esporas/ml) y nematodos en los diferentes tratamientos, nombre de la cepa, obtenidas en Saltillo, México.

Tratamientos	Cepa
1 (Testigo)	NrFs1
2 ( $1 \times 10^6$ )	NrFs1
3 ( $1 \times 10^7$ )	NrFs1
4 ( $1 \times 10^8$ )	NrFs1
5 (nematodos)	<i>Heterorhabditis</i> spp.
6 (Testigo absoluto)	-----



**Figura 7.** Aplicación de los diferentes tratamientos a plantas de maíz, UAAAN, Saltillo, Mex.

### **3.7 Análisis estadístico**

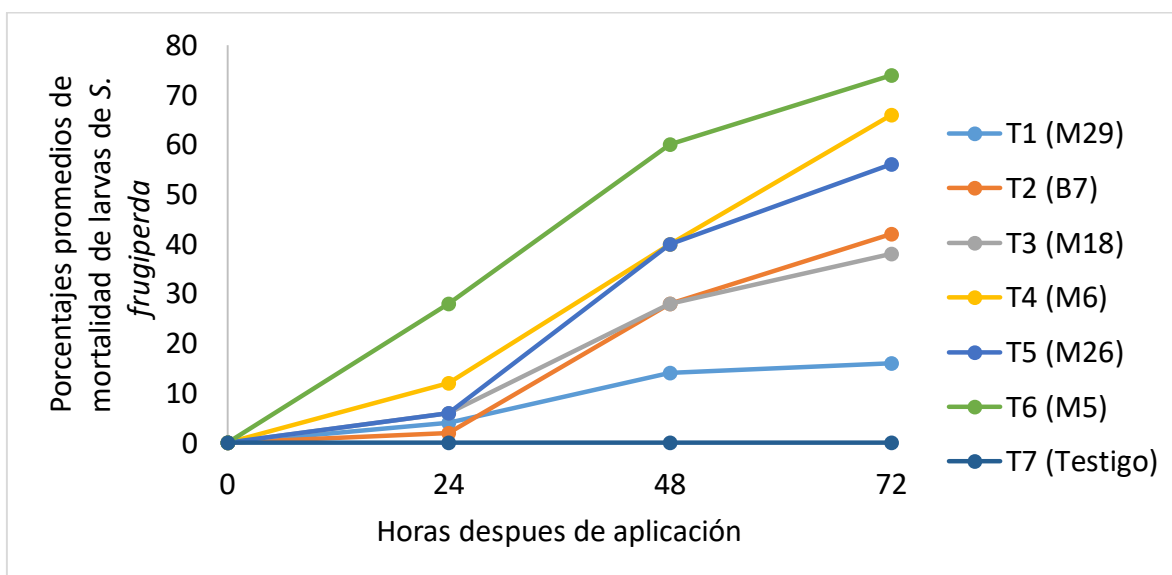
Para ambos bioensayos (datos de mortalidad) se utilizaron el análisis de varianza (ANVA) y una prueba de Tukey para separación de medias.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efectividad biológica de seis cepas de nematodos; *Steinenerma* spp. y *Heterorabditis* sp. contra el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* en laboratorio.

La mortalidad causada por los diferentes tratamientos en este bioensayo fue un tanto diferentes, por ejemplo el tratamiento con mayor mortalidad fue para la cepa M5 de *Heterorabditis* sp. con un 74% de mortalidad y el tratamiento con una menor mortalidad fue para la cepa M29, con un 16% de mortalidad. El tratamiento 4 con la cepa M6 no tuvo diferencia significativa con el tratamiento 6 y esta misma no tiene diferencia significativa con el tratamiento 5. Los tratamientos 2 y 3 no tuvieron diferencia significativa entre ellos, pero si con el tratamiento 5. El testigo no reporto mortalidad alguna con un porcentaje del 0% (Figura 8). El ANVA indicó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) (Tabla 3). En la separación de medias con la prueba Tukey, tenemos al tratamiento T6 con la mejor respuesta de mortalidad, contrastando con el testigo (T1), que no tuvo respuesta alguna (Tabla 4).



**Figura 8.** El porcentaje de mortalidad de *Spodoptera frugiperda* causado por *Metarhizium rileyi*, tomado cada 24 horas hasta las 72 horas.

**Tabla 3.** Análisis de varianza (ANVA), a la variable independiente: Mortalidad entre tratamientos.

<b>Respuesta: Porcentaje de Mortalidad</b>						
	<b>Df</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>de Cuadrados medios</b>	<b>Valor F</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>Tratamientos</b>	<b>7</b>	<b>1322</b>	<b>2343</b>	<b>13.43</b>	<b>0.00032</b>	<b>***</b>
<b>Residuales</b>	<b>22</b>	<b>4000</b>	<b>12.1</b>			

**Tabla 4.** Mortalidad media de *S. frugiperda* 72 horas después de la aplicación de cepas de *Stinenerma* sp. y *Heterorabditis* sp. IJs en laboratorio. Las medias seguidas de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) (prueba de Tukey).

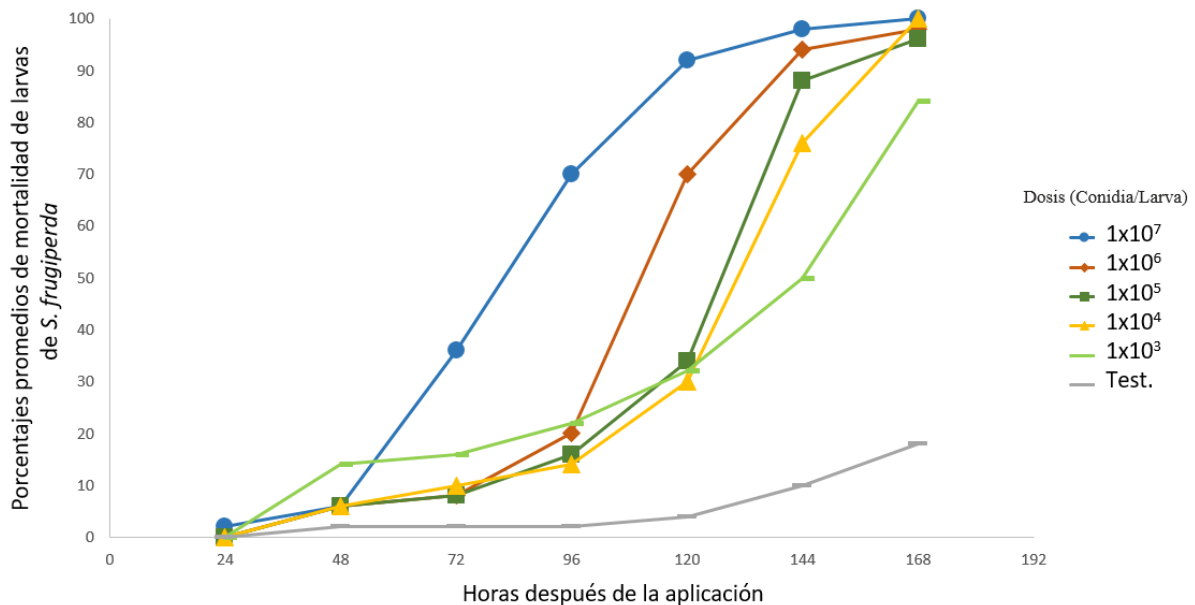
<b>Grupos</b>		
<b>Conidios/ml</b>	<b>Medias</b>	<b>Grupos</b>
<b>T6 (M5)</b>	<b>74</b>	<b>a</b>
<b>T4 (M6)</b>	<b>66</b>	<b>ab</b>
<b>T5 (M26)</b>	<b>56</b>	<b>c</b>
<b>T2 (B7)</b>	<b>42</b>	<b>cd</b>
<b>T3 (M18)</b>	<b>38</b>	<b>d</b>
<b>T1 (M29)</b>	<b>16</b>	<b>e</b>
<b>T7 (Testigo)</b>	<b>0</b>	<b>e</b>

#### **4.2 Evaluación de la mortalidad de *Spodoptera frugiperda* causada por suspensiones de *Metarhizium rileyi* aplicados en el dorso de la larva en laboratorio.**

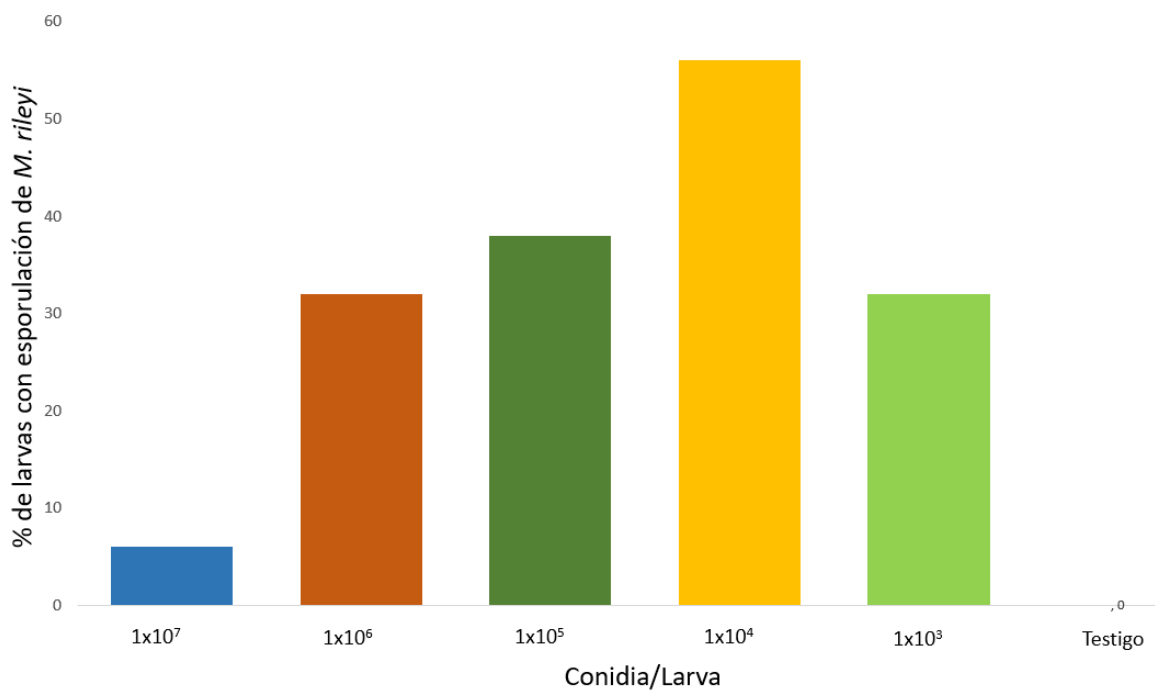
El porcentaje de mortalidad larval difirió entre tratamientos (Fig. 1). El análisis de varianza indicó diferencias muy altamente significativas en el modelo ( $df = 5$ ,  $F = 23.12$ ,  $p = 1.866 \times 10^{-8}$ ). La prueba de Tukey (**Tabla 5**) separó los tratamientos en cinco grupos. Los tratamientos

$1 \times 10^7$  hasta  $1 \times 10^4$  conidias / larva, mataron del 96-100% de las larvas al final del experimento (168 horas = 7 días). Entre todos los tratamientos, el tratamiento con la concentración de  $1 \times 10^3$  conidias / larvas causó el nivel más bajo (84%) de mortalidad larval. Todos los tratamientos fueron diferentes del control que registró solo un 18% de mortalidad después de 7 días (**Tabla 6**).

El porcentaje de larvas micosadas (es decir, larvas que muestran abundante esporulación de conidias de *M. rileyi*) se evaluó después de 172 horas. Una dosis de  $1 \times 10^4$  conidias / larva (la segunda dosis más baja) tuvo el porcentaje más alto de larvas micosadas con 56% (**Figura 9**); en general, se observó una relación inversamente proporcional entre la dosis de conidias aplicada a las larvas y la producción de conidias patente en las larvas.



**Figura 9.** El porcentaje de mortalidad de *Spodoptera frugiperda* por *Metarhizium rileyi*, tomado cada 24 horas, hasta las 168 horas.



**Figura 10.** Porcentaje de larvas micosadas, infectadas por *Metarhizium rileyi*, (T1 = 1x10<sup>9</sup>, T2 = 1x10<sup>8</sup>, T3 = 1x10<sup>7</sup>, T4 = 1x10<sup>6</sup>, T5 = 1x10<sup>5</sup>, T6 = Agua + Bionex).

**Tabla 5.** Análisis de varianza (ANVA), a la variable independiente: Mortalidad entre tratamientos en la prueba de mortalidad de *Spodoptera frugiperda* por *Metarhizium rileyi*.

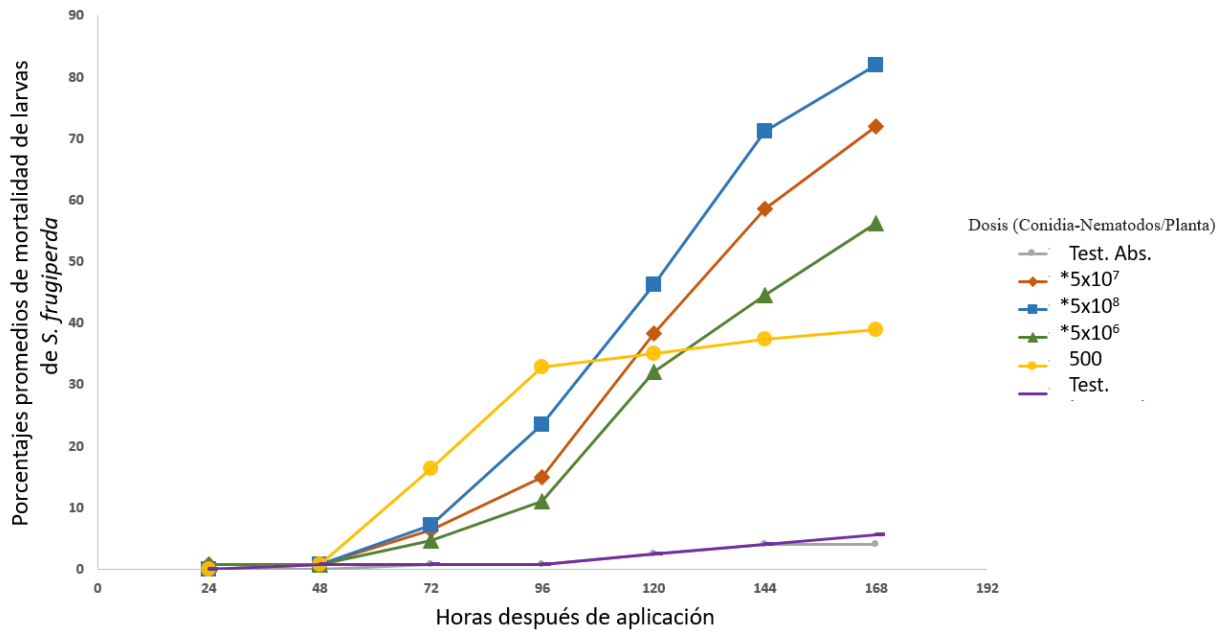
Respuesta: Porcentaje de Mortalidad						
	Df	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr(>F)	
Tratamientos	5	19267	3853.3	23.12	0.00000018	***
Residuales	24	4000	166.7			

**Tabla 6.** Mortalidad media en larvas de *S. frugiperda* 168 horas después de la aplicación directa de conidios de *M. rileyi* al dorso de las larvas. Las medias seguidas de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) (prueba de Tukey).

<b>Grupos</b>		
<b>Conidios/larva</b>	<b>Medias</b>	<b>Grupos</b>
<b>T1</b> ( $1 \times 10^9$ )	<b>92</b>	<b>a</b>
<b>T2</b> ( $1 \times 10^8$ )	<b>74</b>	<b>ab</b>
<b>T3</b> ( $1 \times 10^7$ )	<b>66</b>	<b>bc</b>
<b>T4</b> ( $1 \times 10^6$ )	<b>54</b>	<b>bc</b>
<b>T5</b> ( $1 \times 10^5$ )	<b>42</b>	<b>c</b>
<b>T6</b> (Agua+Biobex)	<b>12</b>	<b>d</b>

#### **4.3 Evaluación de la mortalidad de *Spodoptera frugiperda* causada por *Metarhizium rileyi* y *Heterorhabditis* spp. en una infestación artificial en plantas de maíz.**

El tratamiento con nematodos (500 IJ *Heterorhabditis* / planta) inicialmente indujo la mortalidad más rápida de *S. frugiperda* entre todos los tratamientos, alcanzando el 32% después de 96 horas (**Figura 11**); sin embargo, los incrementos en la mortalidad se redujeron después de este punto, alcanzando solo el 39% después de siete días. Observamos la típica coloración rojiza en las larvas de gusano cogollero, infectadas por *Heterorhabditis*; la posterior reproducción de nematodos en estas larvas (Poinar 1979). Con respecto a los tratamientos de *M. rileyi*, la dosis más alta ( $5 \times 10^8$  conidios / planta) tuvo el mayor porcentaje de mortalidad (82%). Los tratamientos de conidios ( $5 \times 10^7$  y  $5 \times 10^6$  conidios / planta) indujeron un 72% y un 56% de mortalidad respectivamente. La prueba ANVA indicó diferencias muy significativas en el modelo ( $df = 5$ ,  $F = 80.711$ ,  $p = 2.2 \cdot 10^{-16}$ ). (**Tabla 7**). El análisis de la prueba de Tukey indicó diferencias significativas entre todos los tratamientos y los grupos de control ( $p < 0.05\%$ ) (**Tabla 8**).



**Figura 11.** Porcentaje medio de mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* en plantas de maíz después de la aplicación de *Metarhizium rileyi* y *Heterorhabditis* spp. \* = conidios de *M. rileyi* / planta; 500 = *Heterorhabditis* IJs / planta; Test. Abs. = control absoluto; Test = control, sólo agua + surfactante).

**Tabla 7.** Análisis de varianza (ANVA), a la variable dependiente Mortalidad entre tratamientos de larvas de *Spodoptera frugiperda* en plantas de maíz después de la aplicación de *Metarhizium rileyi* y *Heterorhabditis* spp.

Respuesta: Porcentajes de mortalidad					
	Df	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr(>F)
Tratamientos	5	43044	8608.8	80.711	2.2e-16
Residuales	42	4480	106.7		

**Tabla 8.** Mortalidad media de *S. frugiperda* siete días después de la aplicación de *M. rileyi* conidios y *Heterorhabditis* (IJs) en plantas de maíz infestadas en el invernadero. Las medias seguidas de letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) (prueba de Tukey).

<b>Tratamientos</b>	<b>Medias <math>\pm</math> SD</b>	<b>Grupos</b>
<b>T1</b> ( $1 \times 10^8$ )	<b>82 <math>\pm</math> 34</b>	<b>a</b>
<b>T2</b> ( $1 \times 10^7$ )	<b>71 <math>\pm</math> 29</b>	<b>ab</b>
<b>T3</b> ( $1 \times 10^6$ )	<b>56 <math>\pm</math> 23</b>	<b>b</b>
<b>T4</b> (Nematodos)	<b>39 <math>\pm</math> 17</b>	<b>c</b>
<b>T5</b> (Testigo)	<b>5 <math>\pm</math> 2</b>	<b>d</b>
<b>T6</b> (Testigo absoluto)	<b>4 <math>\pm</math> 2</b>	<b>d</b>

## 5. DISCUSIÓN

Bosa et al. (2004) enfatizaron que en el segundo estadio de *S. frugiperda* eran los más susceptibles a los entomopatógenos, pero en esta prueba se utilizaron las larvas 3ro estadio, con una buena mortalidad. Ignoffo et al. (1975) postularon que los hongos entomopatógenos se deben aplicar en larvas de primeros instares del gusano cogollero para minimizar el daño al cultivo.

Estos ensayos biológicos para controlar el gusano cogollero fué un paso exitoso para demostrar la eficacia de los agentes entomopatógenos, especialmente *N. rileyi*, que tienen un alto nivel de mortalidad en las plantas en el invernadero (82%) y un 100% de mortalidad en el laboratorio. Con respecto a los nematodos, la mortalidad que se mostró en el bioensayo con plantas, tuvo una mortalidad baja y por lo tanto, no tuvo una eficacia alta; Molina-Ochoa et al. (1996) estudiaron la eficacia de diferentes especies de nematodos entomopatógenos en *S. frugiperda* y confirmaron que *Heterorhabditis* spp. fue más eficiente que las cepas de *Steinernema* spp., cuando se está considerando la etapa larvaria, causando un 65% de mortalidad en segundos estadios.

Los entomopatógenos pueden complementar y ser parte de MIP; sin embargo, Clark et al. (1982), Anderson y Roberts (1983) y Aguda et al. (1984) indicaron que los pesticidas pueden inhibir algunos hongos como *Beauveria bassiana* y *M. anisoplae*, pero no existen pruebas o estudios reales sobre pesticidas que inhiban a *M. rileyi*.

Los resultados de *S. frugiperda* en plantas de maíz en el invernadero fueron más reales para aplicaciones de campo, demostrando la efectividad de los conidios de *M. rileyi*, que pueden llegar sin problemas al cogollo, infectando y matando a las larvas.

Según se informa, el hongo es seguro para varios parasitoides y depredadores, como *Chrysopa carnea*, *Apanteles* sp., *Camponotus* sp., *Telenomus proditor*, *Coccinella* sp. y *Microplitis croceipes* (Ignoffo, 1981). Este hongo entomopatógeno puede funcionar como una herramienta en el MIP con otros agentes de control biológico, como los depredadores.



## 6. CONCLUSIONES

Se muestran unos resultados muy favorables para el entomopatógeno *N. rileyi* pues en los bioensayos en los que se evaluó, presentaron altos porcentajes de mortalidad con 100% de mortalidad en laboratorio y 82% en campo, convirtiéndolo en una excelente opción para el control integrado. En comparación con los nematodos, estos tuvieron una eficacia baja tanto en laboratorio, como en campo, esto debido a las condiciones especiales que requieren, aunque si hubo mortalidad, esta no es suficiente para considerarse como un buen control. Se debe hacer más investigación sobre nematodos, y encontrar cepas más agresivas que puedan dar mejores resultados.

## 8. REFERENCIAS

- Aguda R.M., Saxena, R.C.; Litsinger, J. A.; Roberts, D. W. 1984. Inhibitory effects on insecticides on entomogenous fungí *Metarrhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* IRR. News 9 (6): 16-17.
- Anderson T.E., Roberts, D.W. 1983. Compatibility of *Beauveria bassiana* isolates with insecticide formulations used in Colorado potato beetle (Coleóptera: Compatibilidad de *Beauveria bassiana* con triflumuron Chrysomelidae), control. Journal of Economical Entomology 76:1437-1441.
- Aquino L.N., Vital A.F, Cavalcanti L.B., Nascimento M.G. 1977. Cultura de *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin en sacos de polipropileno. Boletim Técnico CODECAP 5: 7-11.
- Asaff T.A., Reyes V.Y., López L.V.E., De la Torre M.M. 2002. Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. Avance y Perspectiva (México) 21: 291-295.
- Alatorre R., Guigón C., Guzmán M., Barajas G. 2001. Hongos entomopatógenos. En: Actas XII Curso Nacional de Control Biológico, Sociedad Mexicana de Control Biológico: 2001. 9-10 de Agosto, Chihuahua, México; 2001. p. 169-179.
- Banda T. J. F. 1981. Importancia económica de *Heliothis zea* Boddie y determinación del umbral económico. Distribución matemática y muestreo de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) en maíz criollo. Tesis (Doctor en ciencias), ITESM, División de ciencias agropecuarias y marítimas Monterrey, México, pp. 55-60.
- Barnes S.E., Moore D. 1997. The effect of fatty, organic or phenolic acids on the germination of conidia of *Metarrhizium flavoviride*. Mycol. Res. 101: 662-666.
- Barranco F.E, Alatorre R.R, Gutiérrez R.M, Viniegra G.G, Saucedo C.G. 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. Enz. Microb. Technol. 30: 910-915.
- Bustillo A.E., Posada F. 1986. Patogenicidad de un aislamiento de *Nomuraea rileyi* sobre larvas de cogollero de maíz *Spodoptera frugiperda*. Revista Colombiana de Entomología. Volumen 12. 56-58.
- Bustillo A.E. 1976. Patogenicidad del nematodo *Neoplectana carpocapzae* en larvas, prepupas y pupas de *Oxidia trychiata*. Revista Colombiana de Entomologia 2(4): 139-144

- Castillo N, González C. 2005. Efecto del color y la altura de las trampas sobre la captura de cicadélidos en la asociación Fríjol y Maíz. *Rev. Protección Veg.* 2005; 20(2):128-131.
- Clark R.A., Casagrande R.A., Wallace D.B. 1982. Influence of pesticides on *Beauveria bassiana*, a pathogen of the Colorado potato beetle. *Environmental Entomology* 11: 67-70.
- De Melo P, Fernandes M, Degrande P, Cessa R, Salomão J, Nogueira R. 2006. Distribuição Espacial de Plantas Infestadas por *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) na Cultura do Milho. *Neotrop Entomol.* 2006;35(5):689-697.
- Deseo K.V. 1989. I nematodi entomopatogeni nella difesa delle piante. *Inf. Fitopatologia.*, 5, 25-30.
- Deshpande M.V. 1999. Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges. *Crit. Rev. Microbiol.* 25: 229-243
- Devi V, Mohan C, Padmavathl J, Ramesk K. 2003. Susceptibility to fungi of cotton Bollworms before and after a natural epizootic of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Hyphomycetes). *Biocontrol Sci and Technol.* 2003;13(3):367-37.
- Elbert A. 2001. Los productos fitosanitarios en el nuevo milenio. En: *Actas del IV Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal*; 2001. 11 de jun Varadero, Cuba. 2001. p. 2-3.
- Felipe-Victoriano, M. 2013. Extractos nutritivos en la producción de hongos entomopatógenos de *Diaphorina citri*, y aplicación de *Metarhizium brunneum* contra Psílidos plaga. Thesis, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, México.
- Feng M.G., Poprawski T.J., Khachatourians G.G. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology* 4: 3-34.
- Fuxa J. R., Richter A. R., Agudelo-Silva F. 1988. Effect of host age and nematode strain on susceptibility of *Spodoptera frugiperda* to *Steinernema feltiae*. *J. Nematol.*, 20(1), 91-95.
- García F., Mosquera M.T., Vargas C.L.R. 2002. Control biológico, microbiológico y físico de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) plaga del maíz y otros cultivos en Colombia. *Rev. Colomb. Entomol.* 28: 53-60.
- García I., Pozo E. 2004. *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson y *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown y Smith como alternativas en el manejo de plagas agrícolas. Anuario. Universidad Agraria de La Habana, Cuba. (monografía) 2004.

- García F., Pulido F. 1984. El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*, su control y perspectivas para su manejo. XI Reunión de maiceros de la zona andina. II Reunión latino americana del maíz. Ministerio de Agricultura. Instituto Colombiano Agropecuario. Programa Nacional de Maíz y Sorgo, p. 35. Colombia.
- Gardner W., Fuxa J. 1980. Pathogens for the suppression of the fall armyworm. Florida Entomol. 63: 439-447.
- Gladstone S., Hruska A. 2003. Una guía para promover el manejo de las plagas más seguro y más eficaz con los pequeños agricultores: una contribución del cumplimiento ambiental de la USAID-APP. CARE, Atlanta, Georgia. pp. 25-65.
- Gardner W. A., Fuxa, J. R. 1980. Pathogens for the suppression of the fall armyworm. Fla. Entomol., 63 (4) 439-446.
- Georgis R., Hom, A. 1992. Introducción de entomopatógenos nematodos en América Latina y el Caribe. Nematropica, 22, 81-98.
- Gladstone S., A. Hruska. 2003. Una guía para promover el manejo de plagas más seguro y más eficaz con los pequeños agricultores: una contribución del cumplimiento ambiental de la USAID-APP. CARE, Atlanta, Georgia. pp. 25-65.
- Gillespie A.T., Claydon N. 1989. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. Pesticide Sci. 27: 203-215.
- González E., Sanroma G., Rovesti L., Palma R. 2007. Manejo Integrado de Plagas. Manual Práctico. Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV), La Habana, Cuba. 2007.
- Harold F.M. 1999. In pursuit of the whole hypha. Fungal Genet. Biol. 27: 128-133.
- Hegedus D., Khachatourians G. 1995. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. Biotechnol. Adv. 13: 455-490.
- Hajek A.E. 1997. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. Adv. Microb. Ecol. 15: 193-249.
- Hajek A. E., St. Lenger, R. J. 1994. Interactions Between fungal pathogens and insects hosts. Annual Review of Entomology. 39:293-322.
- Hoballah M.E., Degen T., Bergvinson D., Savidan A., Tamo C., Turlings T.C.J. 2004. Occurrence and direct control potential of parasitoids and predators of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on maize in the subtropical lowlands of Mexico. Agric. For. Entomol. 6: 83-88.

- Ignoffo C., et al., 1975. Seasonal incidence of the entomopathogenic fungus *Spicaria rileyi* associated with noctuid pests of soybeans. *Journal of Invertebrate Pathology*. 25, 135-137.
- Ignoffo C.M. 1981, The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide, In: *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*, ed. H. D. Burges, Academic Press, New York, USA, pp.513–538.
- Jeffs L.B., Xavier I.J., Matai R.E., Khachatourians G.G. 1997. Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium* and *Verticillium*. *Can. J. Microbiol.* 45: 936-948
- Jones R.L. 1994. Role of field studies in assessing environmental behavior of herbicides. Proc. Brighton crop protection conference. Weeds. Vol. 3. 12751282
- Kaya H.K., Stock S.P. 1997. Techniques in Insect Nematology, pp. 281–324 In LA Lacey [Ed.], *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, San Diego.
- Kershaw M.J., Talbot N.J. 1998. Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal Genet. Biol.* 23: 18-33, 83.
- Khachatourians G.G. 1996. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In Howard DH, Miller JD (Eds.) *The Mycota VI. Human and animal relationship*. Springer. Berlin, Alemania. pp 331-364.
- Khachatourians G.G. 1991. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. In Arora DK, Ajello L, Mukerji KG (Eds.) *Handbook of Applied Mycology Vol. 2: Humans, animals and insects*. Dakker. New York, U.S.A. pp. 613-661.
- Knipling E.F. 1980. Regional management of the fall armyworm a realistic approach. *Florida Entomol.* 63: 468–480.
- Lu Y. J., M. J. Adang. 1996. Distinguishing fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) strains using a diagnostic mitochondrial DNA marker. *Florida Entomol.* 79::48–55.
- McCord Jr. E., Yu S.J. 1987. Los mecanismos de la resistencia del carbaril en el gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), *Pestic. Biochem. Physiol.* 27, 114. 3. K. A. Wood, B. H. Wilson.
- Molina Ochoa, J. 1996. Virulence of six entomopathogenic nematodes (*Steinernatidae* and *Heterorhabditidae*) on immature stages of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Vedalia*, v.3, n.1, p.25-29.
- Monzón A. 2001 Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas*. (CATIE, Costa Rica) 63: 95-103.

- Pashley D.P. 1986. Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 79::898–904
- Piedra F., Pérez E., Blanco E. 1997. Manejo Integrado de la palomilla del maíz (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith). En: Actas del Tercer Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal; 1997. 23-27 de jun, Ciudad de La Habana; 1997. p. 73.
- Poinar G.O. 1976. Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen. n. Sp. (Rabbitida: Heterorhabditidae n. fam.). *Nematologica*, 21, 463-470.
- Pucheta Diaz, M., Flores Macías A., Rodríguez Navarro N., Dela Torre M. 2006. Mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos. *INCI*, v. 31, n. 12 856-860, 2006.
- Rodríguez D. 1984. Los entomopatógenos en el manejo integrado de plagas. Memorias I Curso taller Internacional Control Biológico. Componente Fundamental del MIP en Agricultura Sostenible., p. 30.
- Richter A.R., Fuxa, J.R. 1990. Effect of *Steinernema feltiae* on *Spodoptera frugiperda* and *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in corn. *J. Econ. Entomology*, 83(4), 1286-1291.
- Riquelme M., Reynaga P.C.G., Gires G., Bartnicki G.S. 1998. What determines growth direction in fungal hyphae. *Fungal Genet. Biol.* 24: 101-109.
- Sanchez-Peña S.R., San Juan-Lara J., Medina R.F. 2011. Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, Mexico, and their virulence towards thrips and whiteflies. *Journal of Insect Science*, 11(1), p.1.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2015. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). En:<http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/nayarit/boletines/2016/diciembre/Documents/BNSAGDIC042016.PDF> (Fecha de consulta: Octubre, 2017).
- Sparks N.A. 1979. A review of the biology of the fall armyworm. *Fla. Entomology*. 62(2), 82-87.
- St. Leger R.J., Roberts D.W. 1997. Engineering improved mycoinsecticides. *Trends Biotechnol.* 15: 83-87.
- Sosa R., Delpin K., Moscardi F., Nozaki M. 2003. The Impact of Fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson Epizootics and on Populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), on Soybean. *Neotrop Entomol.* 2003; 32(2):287-291.

- Tomasino S.F., R.T. Leister, M.B. Domork, R.M. Beach, J. Kelly. 1995. Field performance of *Clavibacter* sp. XYLI subsp *Cynodontis* expressing the insecticidal protein gene CRYIA (C) of *Bacillus thuringiensis* against European corn borer in field corn. *Bio. Cont.*, 5(3): 442-448 pp.
- Umaran I. 2006. Producción de maíz. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Subsecretaría de Agricultura, Ganadería y Forestación. Dirección Nacional de Producción Agropecuaria y Forestal. Dirección de Agricultura. 2006; 48 p.
- Vivas L. 2003. Plagas agrícolas de Venezuela: Artrópodos y vertebrados: gusano ejército *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) 1797. Ed. Entomología Venezolana.
- Vega-Aquino P. 2008. Actividad de formulaciones en aceite de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson e *Isaria tenuipes* (Peck) Samson, sobre larvas de cuatro lepidópteros. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México. Pág. 10
- Vergara O.J.D., N.J.C. López., C.B. Chávez. 2004. Evaluación de la patogenicidad del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) hampei (Ferrari) en condiciones de laboratorio. En: XXIV Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. Pereira: socolen.
- Wessels J.G.H. 1999. Fungi in their own right. *Fungal Genet. Biol.* 27: 134-145.
- Young J.R., McMillian W.W. 1979. Diferencia de alimentación por dos cepas de gusano cogollero en superficies tratadas con carbaril. 1. & on. *Entomol.* 72, 202. 2. McCord, Jr.,
- Zambrano C., Sepúlveda M., Zambrano E., Molina N. 2003. Hongos entomopatógenos en Venezuela: *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sor. Caracterización, formulación, producción y aplicación. 2003. Disponible en: <http://pegasus.ucla.edu/ve/CCC/RESUMEN/agronomia/c1-32-ag.htm>. (Consulta: 4 mar 2019).
- Zimmerman E. C. 1978. Insects of Hawaii. Vol 9, Microlepidoptera. University of Hawaii Press: Honolulu, Hawaii, U.S.A.

