Aplicación en campo de dos cepas de *Nomuraea rileyi* (Farlow), contra larvas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) en maíz, en Pesquería, Nuevo León, México

Field application of two strains of *Nomuraea rileyi* (Farlow) against larvae of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) in corn, in Pesquería, Nuevo León, Mexico

Diego Camacho-Ponce^{*1}, Sergio Sánchez-Peña¹

Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. CP 25315. Tel: 844-411-03-33. Email: diegoponce01@hotmail.com [*Autor responsable]

RESUMEN

El maíz (*Zea mays*) L. ssp *mays*, se distribuye a lo largo del territorio mexicano (Mera y Mapes, 2009) y se le conoce como maíz cultivado. El maíz es uno de los cultivos más importantes del mundo y es la especie agrícola más diversa en México. Los hongos entomopatógenos juegan un papel muy importante en el control biológico de plagas debido a su forma de acción, su fácil aplicación y su capacidad de generar epizootias en condiciones de campo (Ignoffo, 1981; Alves, 1986). Se realizaron pruebas de laboratorio y de campo y se experimentó con distintos medios de cultivos para aislar el hongo. Posterior a la obtención de ambas cepas puras y aisladas, el primer procedimiento consistió en inocular larvas de tercer estadio que se obtuvieron de un pie de cría de laboratorio. La inoculación se realizó como aplicación tópica, con una suspensión líquida a una concentración de 10⁷. Se colocaron 200 gramos de arroz en bolsas de plástico, las cuales se esterilizaron por 15 minutos en una autoclave a 121° C (15 libras de presión). El arroz se inoculó con 15 mL de suspensión de conidias y se dejó incubar a 25° C, durante dos semanas. Se estableció un diseño de bloques al azar con cinco tratamientos y cuatro repeticiones. Cada unidad experimental estuvo conformada por cinco surcos. Para las aplicaciones de los tratamientos se consideraron veinte plantas consecutivas en línea por surco. En la fase de pruebas de laboratorio se compararon los diferentes medios: pda, pda+antibiótico, huevo-agar, soya-agar, y se obtuvo como mejor resultado el medio de soya-agar, dado que fue en el único que se registró esporulación, mientras que en PDA sólo hubo crecimiento de micelio, en tanto que en los medio restantes no hubo crecimiento. Los resultados de campo en las pruebas de germinación de las cepas, previas a la aplicación, se obtuvieron los siguientes resultados: para n= 400 conidios, para NH03CT= 84% y para C3= 70% de germinación. En todos los tratamientos existieron diferencias altamente significativas para las variables mortalidad, micosados y daño en planta, por lo que se concluyó que las cepas utilizadas son una gran alternativa para el manejo de *Spodoptera Frugiperda*.

Palabras clave: entomopatógenos, *Nomuraea rileyi*, *Spodoptera frugiperda*, control biológico, maíz

ABSTRACT

Zea mays L. ssp *mays*, is distributed throughout the Mexican territory (Mera and Mapes, 2009), and is known as cultivated maize, corn is one of the most important crops in the world and agricultural species more diverse in Mexico. Entomopathogenic fungi, play an important role in biological pest control, due to its mode of action, ease of application and the ability to generate animal diseases under field conditions (Ignoffo, 1981; Alves, 1986). Laboratory tests and field tests were conducted. Different culture media for isolation of the fungus tested. Subsequently obtaining both pure and isolates the first procedure consisted of inoculating larvae 3rd instar obtained from a breeding stock laboratory. Inoculation was performed as topical application, with a liquid at a concentration of 10⁷ suspension were placed 200 grams of rice per bag, was sterilized in an autoclave at 121° C (15 pounds pressure) for 15 minutes in plastic bags, rice was inoculated with 15 ml of conidial suspension and allowed to incubate at 25° C for two weeks. a design randomized block with five treatments and four replications, each experimental unit consisted of four rows. For applications of treatments, 20 linear consecutive plants were considered furrow. In phase laboratory test was established, they were compared means pda, pda + antibiotic, egg-agar, soy-agar, obtaining as best result means agar-soybean, as was the only sporulation occurred while on PDA were only mycelial growth in the remaining half no growth. In the field results in the germination tests strains, prior to the application we obtained for n = 400 conidia was obtained for NH03CT = 84% and C3 = 70% of germination. In all treatment there were highly significant differences variables for mortality and damage fungi infested plant, concluding that the strains used are a great alternative for handling *Spodoptera frugiperda*.

Key words: entomopathogenic, *Nomuraea rileyi*, *Spodoptera frugiperda*, biological control, corn.

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays*) L. ssp *mays*, se distribuye a lo largo del territorio mexicano (Mera y Mapes, 2009) y se le conoce como maíz cultivado. El maíz es uno de los cultivos más importantes del mundo y la especie agrícola más diversa en México. Se le cataloga como una especie central en la alimentación, sociedad, cultura y economía de México (Kato *et al.*, 2009). 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 de atacar cualquier parte de la planta, a menudo con graves consecuencias (Ortega, 1987).

Este cultivo tiene diferentes plagas insectiles de la raíz, follaje y elote de importancia económica en el agroecosistema del maíz mexicano (Sifuentes, 1985; Ortega, 1987). En este grupo destaca el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (*Lepidoptera: Noctuidae*). Este insecto es una de las plagas más importantes del maíz en el continente americano. La distribución de esta plaga va desde el sur de Canadá hasta el norte de Argentina e incluye el Caribe, y se consideran la región Norte y centroamericana las más afectadas por esta plaga (Sena *et al.*, 2003; Casmuz *et al.*, 2010). En México es la plaga primaria de mayor importancia del maíz, ya que es muy voraz y dañina (Sena *et al.*, 2003); se localiza prácticamente en todas las regiones donde se cultiva esta planta, aunque sus daños son más severos en el trópico y subtropical (Ortega, 1987; Rodríguez y Marín, 2008; CIMMYT, 2015), ya que ocasiona pérdidas desde la etapa de plántula temprana hasta la pre-madurez (Ortega, 1987). Las infestaciones de esta plaga pueden causar daños severos que reducen el rendimiento en porcentajes superiores de hasta 30% (Herrera, 1979; García-Gutiérrez *et al.*, 2012), y en casos extremos la pérdida total del cultivo (Silva-Aguayo *et al.*, 2010).

Los hongos entomopatógenos juegan un papel muy importante en el control biológico de plagas debido a su forma de acción, su fácil aplicación y su capacidad de generar epizootias en condiciones de campo (Ignoffo, 1981; Alves, 1986). El hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, descrito originalmente como *Botrytis rileyi* (Farlow) y más tarde como *Spicaria rileyi* (Farlow) Charles, lo redescubrió Kish *et al.* (1974), por lo que se transfirió al género *Nomuraea Maublanc*. Este dimorfismo, entomopatógeno asexual, a diferencia del *opor-*

tunista Metarhizium anisopliae (Metschin.) Sorokin y *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill tiene requisitos de crecimiento exigentes, posee un estrecho rango de huéspedes y no tiene una fase saprófita en el suelo. *N. rileyi* es reconocido como el factor de mortalidad en ciertas poblaciones de noctuidos. En algunos sistemas agrícolas subtropicales y templados, este entomopatógeno causa una mortalidad superior al 90% por lo que diezma las poblaciones de larvas. Hay más de treinta especies de lepidópteros que figuran como susceptibles a *N. rileyi* (Ignoffo, 1981, citado por Boucias, 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de aplicación

Para la evaluación de la efectividad de la mortalidad causada por las cepas NHO3CT Y C3 de *Nomuraea rileyi* contra larvas de *Spodoptera frugiperda*, se realizaron pruebas de laboratorio y de campo. Las pruebas de laboratorio se realizaron en las cámaras bioclimáticas del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Sitio de aplicación en campo

Las pruebas de campo se realizaron en la comunidad de Pesquería, Nuevo León, México, ubicada en la parte central del estado, en las coordenadas 25° 47' latitud Norte y 100° 3' longitud Oeste, a una altura media sobre el nivel del mar de 330 metros. Su clima se caracteriza por ser semicálido, subhúmedo y extremoso, con lluvias en invierno; presenta una precipitación anual de 500 mm.

Cepas a evaluar

Se utilizaron dos cepas: la NH03CT, que se obtuvo de la colección resguardada en el Departamento de Parasitología Agrícola de la UAAAN, colectada en el año 2004, y la C3, de la misma colección, que se obtuvo el 2014; ambas cepas fueron aisladas y purificadas y se mantuvieron en condiciones secas a una temperatura de 8° C en refrigeradores.

Evaluación en laboratorio

Se probaron distintos medios de cultivos para aislamiento del hongo. Posterior a la obtención de ambas cepas puras y aisladas, el primer procedimiento consistió en inocular larvas de tercer estadio que se obtuvieron de un pie de cría de laboratorio. La inoculación se realizó como aplicación tópica, con

una suspensión líquida a una concentración de 10^7 , en 150 larvas por cepa para así determinar la capacidad de virulencia de ambos aislados, y se realizó una evaluación diez días después de la aplicación. En total se inocularon 300 larvas. De nueva cuenta se aislaron ambas cepas de las larvas que previamente fueron inoculados en laboratorio, se purificaron y sembraron.

Producción de conidios

Se comenzó la producción de conidios en masa, primeramente multiplicando las cepas en cajas Petri con un medio de soya agar; se esperó un tiempo de 10 días con la finalidad de obtener conidiación de las cepas; a los 15 días posteriores de la multiplicación y obtención de los conidios, se inició la inoculación en medio arroz, que se llevó a cabo con grano entero de arroz, sin cascarilla, el cual se lavó con agua común durante 15 minutos para limpiar e hidratar, y se puso a escurrir 15 minutos para eliminar el exceso de agua.

Se colocaron 200 gramos de arroz por bolsa, mismos que se esterilizaron en una autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos, en bolsas de plástico; el arroz se inoculó con 15 mL de suspensión de conidias y se dejó incubar a 25°C durante dos semanas. A cada tratamiento se le realizó una prueba de germinación para llevar a cabo la investigación en campo en 400 conidios.

Diseño experimental y aplicación en campo

Se estableció un diseño de bloques al azar, con cinco tratamientos y cuatro repeticiones. Cada unidad experimental estuvo conformada por cinco surcos. Para las aplicaciones de los tratamientos se consideraron veinte plantas consecutivas lineales por surco. Los tratamientos fueron: NH03CT, con aplicación en suspensión de conidios a una concentración de 10^8 ; NH03CT, con aplicación granular a una concentración de 10^8 ; C3, con aplicación en suspensión de conidios a una concentración de 10^8 ; C3, con aplicación granular a una concentración de 10^8 , y el testigo, para el caso de las suspensiones, las concentraciones fueron ajustadas a 10^8 mediante conteos bajo un microscopio, a 400 x, con la ayuda de una cámara de Neubauer. Las aplicaciones en forma de suspensión consistieron en aplicar directamente al cogollo 7 mL de suspensión/planta con un atomizador manual, mientras que en forma granular, la aplicación fue de 5 gr de arroz/planta con un medidor estándar.

Evaluación

Se realizó la evaluación el día 10 de septiembre, doce días después a la aplicación, las variables evaluadas fueron mortalidad de larvas, larvas micosadas y daño en planta posterior a la aplicación; se evaluó en una escala de 1-10, donde 1 es daño mínimo y 10 daño máximo, los datos obtenidos de campo se sometieron a un análisis de varianza y prueba de separación de medias por Tukey 0.05, utilizando el paquete estadístico SAS [SAS 1985].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados de laboratorio

En la fase de pruebas de laboratorio se compararon los medios: pda, pda+antibiotico, huevo-agar, soya-agar, y se obtuvo como mejor resultado el medio de soya-agar, dado que fue en el único que se dio esporulación, mientras que en PDA sólo se registró crecimiento de micelio, y en los medios restantes nada. Respecto al bioensayo, en el cual se tenía como objetivo obtener en laboratorio el nivel de mortalidad de las cepas de *Nomuraea rileyi* en larvas de *Spodoptera frugiperda*, se tuvieron los resultados mortandad siguientes: para la cepa NH03CT = 83.3%, para la C3 = 78.6 %, y para el testigo bajo condiciones controladas, 0%, lo cual indica que las cepas son viables para llevar a cabo el objetivo en campo. Luego de obtener estos datos, se realizó la recuperación de la cepa que se había inoculado previamente en las larvas.

Resultados de campo

Respecto a los resultados de campo en las pruebas de germinación de las cepas previas a la aplicación, se obtuvo lo siguiente: para $n=400$ conidios, para NH03CT= 84% y para C3= 70% de germinación.

En el Cuadro 1 se puede observar, en el análisis de varianza relacionado con la mortalidad, que se obtuvo como resultado una $Pr > 0.0084$, lo cual indica que existe una diferencia altamente significativa. En el Cuadro 2 se puede observar que entre los cuatro tratamientos aplicados no existen diferencias significativas, y al comparar los tratamientos con el testigo, sí existen diferencias significativas, de las cuales la más importante se refiere a la cepa NH03CT (S), con una media de 43.92, en comparación con el testigo, que arrojó una media de 8.41.

En el Cuadro 3 se observa que, al someter los resultados para larvas infectadas a un análisis de varianza, existe una diferencia significativa de $Pr > 0.0074$. En

el Cuadro 4 se aprecia que no existen diferencias entre tratamientos, pero sí entre tratamiento contra el testigo, y que el tratamiento NH03TC (G) tuvo la mayor diferencia, con una media de 37.02, comparado con el testigo que fue de 0.00. En el Cuadro 5 se puede observar una diferencia significativa con un $Pr > f = 0.004$ para la variable daño en planta. En el Cuadro 6, los resultados de la prueba estandarizada de Tukey muestran una diferencia significativa entre el testigo y los tratamientos, de los cuales el más sobresaliente es NH03CT (S), con una media de 25.90 en comparación con el testigo, con una media de 30.46. Los tratamientos para daño no mostraron diferencia significativa entre ellos.

En su mayoría, las investigaciones realizadas con base al hongo entomopatógeno *Nomureae rileyi* se

desarrollaron en laboratorio y se sustentan en combinaciones con pesticidas (insecticidas y fungicidas) y sus efectos de compatibilidad. Estas investigaciones con químicos son importantes debido a que podemos llevar a cabo un manejo integrado de plagas.

Pavone (2010) reporta una compatibilidad en una proporción de 1/1000 con el fungicida vitavax (*Carboxín + captan*), y una compatibilidad en una proporción de 1/10 con karate (Lambda-cihalotrina). Ignoffo (1975) registra compatibilidad con lannate.

Bustillos y Posadas (1986) reportaron una mortalidad de 80% a 100% en larvas de *Spodoptera frugiperda* sobre larvas de tercer instar, y Bosa (2004) registró 95% de mortalidad en larvas de segundo y tercer instar, ambos en laboratorio

Cuadro 1. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable independiente mortalidad entre tratamientos.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-valor	Pr>F
CEPA	4	4385,361364	1096.340341	4.61	0.0084

Cuadro 2. Prueba de rango estandarizado de Tukey, pruebas de mortalidad, para la variable mortalidad.

Tukey	Agrupamiento	Media	N	Cepa
	A	43.922	5	NH03CT G
	A	41.309	5	NH03CT G
	A	41.154	5	C3G
	A	38.663	5	C3 S
	B	8.413	5	TESTIGO

Cuadro 3. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable independiente infectados entre tratamientos.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-valor	Pr>F
CEPA	4	3966.068104	991.517026	4.75	0.0074

Cuadro 4. Prueba de rango estandarizado de Tukey para la variable infectados.

Tukey	Agrupamiento	Media	N	Cepa
	A	37.025	5	NH03CT G
	A	29.269	5	C3 G
	BA	27.336	5	C3S
	BA	26.957	5	NH03CT S
	B	0.000	5	TESTIGO

Cuadro 5. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable independiente daño entre tratamientos.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-valor	Pr>F
CEPA	4	169.8887986	42.4721997	7.79	0.0004

Cuadro 6. Prueba de rango estandarizado de Tukey para la variable daño, Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey	Agrupamiento	Media	N	Cepa
	A	30.465	6	TESTIGO
	B	25.980	5	NH03CT S
	B	25.542	5	C3 S
	B	24.651	5	C3 G
	B	23.761	8	NH03CT G

CONCLUSIONES

En esta investigación se puede concluir que las cepas del hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* mostraron efectividad en infección y mortalidad, por lo que se puede decir que para el control biológico contra larvas de *Spodoptera frugiperda* en el cultivo de maíz en campo, son una gran alternativa, dado que

arrojó una media de mortalidad de 43.9% con la cepa NH03CT (S) y una de 37.0% para la cepa NH03CT (G) para infección, y diferencias significativas con el testigo, a la par con los datos recabados por otros autores; además mostró compatibilidad con pesticidas químicos, lo que hace del hongo entomopatógeno *N. rileyi* un candidato potencial para el control de *Spodoptera frugiperda*.

LITERATURA CITADA

- ANDREWS K. L., 1988. Latin american research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist* 71, 630-653.
- BOUCIAS, D. G., Schoborg, E. A., and Allen, G. E. 1982. The relative susceptibility of six noctuid species to infection by *Nomuraea rileyi* isolated from *Anticarsia gemmatalis*. *J. Invertebr. Pathol.* 39, 238-240.
- BOUCIAS, D., Stokes, C., Suazo, A. and Funderburk, J. 2000. AFLP Analysis of *Nomuraea rileyi* DNA. *Mycologia*, in press.
- BUSTILLO, A., Posada, F. 1986. Patogenicidad de un aislamiento de *Nomuraea rileyi* sobre larvas del cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*. *Revista Colombiana de Entomología* 12 (1): 5-15.
- CASMUZ, A. M., L. Juárez, M. G. Socías, M. G. Murúa, S. Prieto, S. M. E. Willink y G. Gastaminza. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Soc. Ee-dinantomol. Argent.* 2010, 69 (3-4), 209-231.
- CORREA, B. S., and Smith, J. G. 1975. *Nomuraea rileyi* attacking the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hubner in Parana´. *Fla. Entomol.* 58, 280.
- FERRAZ, J. M. G., Patel, P. M., and Habib, M. E. M. 1991. Cross infection of *Nomuraea rileyi* isolated from *Spodoptera frugiperda* and *Anticarsia gemmatalis*. In "Abstracts of the 12th International Plant Protection Congress at Rio de Janeiro".
- HERRERA, A. J. Principales plagas del maíz. *Boletín Especial de la Dirección de Agricultura y Ganadería del Perú.* 1979.
- IGNOFFO, C. M. 1981. The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide, In "Microbial Control of Pests and Plant Diseases: 1970-1980" (H. D. Burges, Ed.), pp. 513-538. Academic Press, London.
- IGNOFFO, C. M., and Boucias, D. B. 1992. Relative activity of geographical isolates of *Nomuraea* bioassayed against the cabbage looper and velvetbean caterpillar. *J. Invertebr. Pathol.* 59, 215-217.
- IGNOFFO, C. M., Puttler, B., Hostetter, D. L., and Dickerson, W. A. 1976. Susceptibility of the cabbage looper, *Trichoplus ia ni*, and the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, to several isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 28, 259-262.
- JOSLYN, D. J., and Boucias, D. G. 1981. Isozyme differentiation among three pathotypes of the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi*. *Can. J. Microbiol.* 27, 364-366.
- KATO, T. A., C. Mapes, L. M. Mera, J. A. Serratos y R. A. Bye. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. 2009. Pág.116.
- KISH, L. P., and Allen, G. E. 1978. The biology and ecology of *Nomuraea rileyi* and a program for predicting its incidence on *Anticarsia gemmatalis* in soybean. *Univ. Fla. Agric. Exp. Station. Tech. Bull.* 795, 1-58.
- KISH, L. P., Samson, R. A., and Allen, G. E. 1974. The genus *Nomuraea* Maublanc. *J. Invertebr. Pathol.* 24, 154-158.
- MERA, O. L. M. y S. C. Mapes. El Maíz. Aspectos Biológicos. En: Kato, T. A., C. Mapes, L. M. Mera, J. A. Serratos y R. A. Bye. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. 2009. Pág. 116.
- MORROW, B. J., Boucias, D. G., and Heath, M. A. 1989. Loss of virulence in an isolate of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, after serial in vitro passage. *J. Econ. Entomol.* 82, 404-497
- ORTEGA, A. C. Insectos nocivos del maíz: una guía para su identificación en el campo. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). México. 1987, p. 106.
- PAVONE, D., and Dorta, B., 2010. Efecto de agroquímicos sobre el desarrollo del hongo entomopatogeno *Nomuraea rileyi* y su virulencia sobre *Spodoptera frugiperda*. *Bioagro* 22 (2).
- PENDLAND, J. C., and Boucias, D. G. 1997. In vitro growth of the entomopathogenic hyphomycete *Nomuraea rileyi*. *Mycologia* 89, 66-71.
- RODRÍGUEZ, D. L. A y A. J. Marín. Insectos plaga y su control. pp. 29-46. En: Rodríguez M. R. y C. De León. El cultivo del maíz. Temas selectos 1. Colegio de Postgraduados. Mundi Prensa México, 2008. pp. 127.
- SENA D. G. JR., F. A. C. Pinto, D. M. Queiroz and P. A. Viana. Fall Armyworm Damaged Maize Plant Identification using Digital Images. *Biosystems Eng.* 2003, 85(4), 449-454.
- SIFUENTES, J. A. Plagas del maíz en México. INIFAP. Folleto técnico. Núm. 85. México D. F. 1985. Pág. 49.
- SILVA-AGUAYO, G., J. C. Rodríguez-Maciel, A. Lagunes-Tejeda, C. Landerl-Cázares, R. Alatorre-Rosas, A. M. Shelton and C. A. Blanco. Bioactivity of Boldo (*Peumus boldus* Molina) (Laurales: Monimiaceae) on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) and *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae). *Southwest. Entomol.* 2010, 35(3), 215-231.
- TIGANO-MILANI, M. S., Faria, M. R., Lecuona, R. E., Sartori, M. R., Arima, E. Y., and Diaz, B. M. 1995b. Análise de patogenicidade e germinac, aõ do fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson isolado no Distrito Federal. *Ann. Soc. Entomol. Brasil.* 24, 53-60
- TIGANO, M. S., and Aljanbi, S. 1999. RAPD analysis of *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 75, 240-242.