

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**



**EVALUACIÓN DE AISLADOS DE *Nomurea rileyi* (Farlow) Samson EN
LARVAS DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**

Por:

GLORIA GUADALUPE BELMARES ARÉVALO

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México

Junio de 2009.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE AISLADOS DE *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson EN
LARVAS DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**

PRESENTADA POR:

GLORIA GUADALUPE BELMARES ARÉVALO

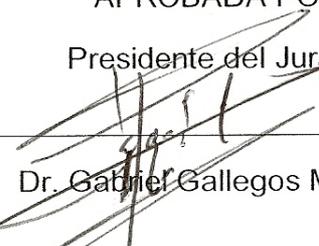
TESIS

Que se Somete a Consideración del H. Jurado Examinador Como Requisito
Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

APROBADA POR

Presidente del Jurado



Dr. Gabriel Gallegos Morales

Vocal



M.C. Claudio Ríos Velasco

Vocal



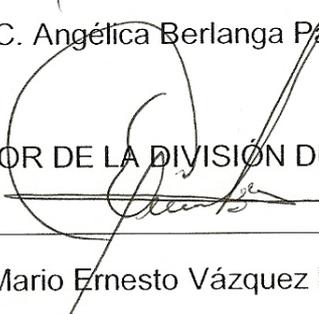
Dr. Ernesto Cerna Chávez

Vocal



M.C. Angélica Berlanga Padilla

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo



Coordinación
División de Agronomía

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Junio de 2009

DEDICATORIAS

A dios:

Por darme la oportunidad de estar aquí en estos momentos y realizar un sueño más en mi vida, por guiarme por el camino correcto y no perder las esperanzas.

A mis padres:

Sra. Gloria Arévalo Segura

Sr. José Belmares Pérez

Por su apoyo incondicional, su gran anhelo de ser cada día mejor, por su gran ejemplo y sus valores, su confianza y cariño con todos sus hijos, por darnos todo lo posible para salir adelante y ser mejores personas día con día.

A mis hermanos:

Andrés y Salvador

Por su apoyo, confianza, palabras y consejos para ser mejor cada día, por su entrega y dedicación en todo lo que hacen.

A mis Abuelos:

Sra. Soledad Pérez Castañeda (†)

Sr. José Pérez Guzmán (†)

Sra. Consuelo Segura Samarripa (†)

Sr. Andrés Arévalo Hernández (†)

Por sus consejos y su gran amor que nos enseñaron a todos sus hijos, por sus valores heredados, por que donde sea que estén se que caminan siempre junto a mi y que algún día nos volveremos a encontrar y estarán orgullosos de mi.

A Arnulfo Fermín:

Por estar conmigo en momentos buenos y malos, por ser gran parte de mi vida, por tu cariño y amor.

AGRADECIMIENTOS

A mi ALMA MATER, por darme la oportunidad de forjarme como profesionista.

Al Dr. Gabriel Gallegos Morales. Por su confianza para la realización de este proyecto y por compartir conmigo sus conocimientos.

Al M.C. Claudio Ríos Velasco. Por su ayuda y paciencia en la realización de este proyecto así como su aporte de conocimientos.

Al Dr. Ernesto Cerna Chávez. Por su ayuda en la revisión de este proyecto.

A la M.C. Angélica Berlanga Padilla. Por sus consejos y apoyo así como su ayuda en la revisión de este proyecto.

A mis Maestros. Por sus enseñanzas y su aporte de conocimiento para ser un profesionista de excelencia.

A Greencorp Biorganiks. Por su apoyo y las facilidades para la realización de este proyecto, por ser una empresa líder en el campo mexicano.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA-----	III
AGRADECIMIENTOS-----	IV
ÍNDICE DE CUADROS-----	V
ÍNDICE DE FIGURAS-----	VI
ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE-----	VII
INTRODUCCIÓN-----	1
OBJETIVOS E HIPÓTESIS-----	3
REVISIÓN DE LITERATURA-----	4
Taxonomía de <i>S. frugiperda</i> -----	4
Características Biológicas-----	4
Daños-----	6
Distribución de la Plaga-----	7
Tablas de Vida-----	7
Dinámica Poblacional-----	7
Enemigos Naturales-----	8
Uso de Parasitoides-----	8
<i>Telenomus</i> sp.-----	9
<i>Euplectrus plathypenae</i> -----	9
<i>Chelonus insularis</i> -----	10
Uso de Bioplaguicidas-----	10
<i>Bacillus Thuringiensis</i> -----	11
Control Biológico-----	11
<i>Nomuraea rileyi</i> -----	13
Taxonomía-----	13
Biología del Hongo-----	14
Espacios de Insectos Susceptibles-----	15
Especificidad-----	15
Producción Masiva-----	16
Estabilidad-----	16

Inducción de Epizootias-----	17
MATERIALES Y MÉTODOS -----	18
Colecta de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> infectadas por <i>Nomuraea rileyi</i> -----	18
Aislamiento, Purificación e Identificación de <i>Nomuraea rileyi</i> -----	18
Cría de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> -----	19
Aislamiento del hongo <i>N. rileyi</i> -----	19
Reproducción de <i>N. rileyi</i> -----	20
Conteo de Conidias de <i>Nomuraea rileyi</i> -----	20
Bioensayos de actividad de cepas de <i>Nomuraea rileyi</i> sobre larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> -----	21
Análisis de Datos-----	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	22
Aislamiento de <i>Nomuraea rileyi</i> -----	22
Identificación del hongo Entomopatogeno-----	23
Activación de los aislados de <i>Nomuraea rileyi</i> en larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> -----	23
Bioensayos de actividad Bioinsecticida-----	24
CONCLUSIONES -----	28
LITERATURA CITADA -----	29
APÉNDICE -----	33

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág
1. Porcentaje de mortalidad de larvas de 3 ^{er} estadio del cogollero del maíz <i>Spodoptera frugiperda</i> por cepas de <i>Nomuraea rileyi</i> -----	24
2. Porcentaje de mortalidad en larvas de 3 ^{er} estadio del cogollero del maíz <i>Spodoptera frugiperda</i> tratadas con <i>Nomuraea rileyi</i> e inoculadas con diferentes técnicas-----	25
3. Determinación del tiempo letal medio (TL ₅₀) de cepas de <i>Nomuraea rileyi</i> , sobre larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> -----	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág
1. Distribución de conidias en la cutícula de la larva-----	15
2. a) Área experimental del Bajío, b) Larvas Infectadas con <i>N. rileyi</i> colectadas en maiz -----	22
3. Larvas colectadas en campo y puestas en camara húmeda para su esporulación. -----	22
4. Crecimiento del entomopatogeno <i>Nomuraea rileyi</i> a) Fiálides, b) conidias y c) conidióforos-----	23
5. Cepas aisladas de larvas colectadas en campo y pigmentación de micelio-----	24
6. Dietas empleadas para la cría y evaluación de la actividad del hongo <i>Nomuraea rileyi</i> sobre larvas de 3 ^{er} estadio de <i>Spodoptera</i> <i>frugiperda</i> a) dieta artificial y b) dieta natural-----	24

ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE

Cuadro	Pág
1. Por ciento de mortalidad de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> acorde al procedimiento de infección empleado-----	34
2. Porcentaje de mortalidad de larvas del 3 ^{er} estadio según el procedimiento de infección de <i>Spodoptera frugiperda</i> desarrollado en dieta natural-----	34
3. Comparación de mortalidad entre métodos – cepas en dieta artificial-----	35
4. Comparación de mortalidad entre métodos – cepas en dieta natural-----	35
5. Análisis de varianza, de la mortalidad de <i>Spodoptera frugiperda</i> en dieta artificial-----	35
6. Análisis de varianza, de la mortalidad de <i>Spodoptera frugiperda</i> en dieta natural-----	35

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays*) es uno de los cereal de gran importancia en la alimentación humana, constituye el alimento básico en la dieta de la mayoría de los mexicanos. A nivel mundial los principales países productores de este grano son: Estados Unidos, China y Brasil, aportando el 64.5 % de la producción mundial. En México los principales estados productores de esta gramínea son: Estado de México, Jalisco y Chiapas, mismos que aportan el 32.2 % de la producción nacional (Lensur, 2006). El maíz se ha convertido, en sustento permanente de múltiples grupos campesinos, es el alimento más económico de millones de trabajadores asalariados urbanos, no sólo en México sino en buena parte del mundo, y en materia prima estratégica de la ganadería mundial y la industria de alimentos (Bartolini, 1990).

El cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda* J. E. Smith) constituye la plaga más importante del cultivo del maíz, donde las pérdidas que esta ocasiona son cuantiosas, reduciendo los rendimientos en 0.8 ton/ha de maíz seco, lo que equivale al 40 % de la producción (Allen, 1983).

Durante muchos años, para reducir los efectos nocivos de *S. frugiperda*, se ha dependido del uso de insecticidas químicos, los que son asperjados o espolvoreados; en muchas ocasiones su efectividad ha sido baja, debido a que se realizan pasado el momento crítico de la plaga y la etapa fenológica más apropiada del cultivo o después de que los daños son irreversibles; incluso se ha pretendido aminorarla cuando prácticamente el cultivo alcanza un tamaño que imposibilita la entrada de las máquinas al campo (CIA, 1980). El control de plagas con productos químicos es cada vez más complicado, debido a la exigencia de los consumidores en la reducción de la aplicación que es cada vez más notable. Los productos agroquímicos no siempre dan buenos resultados, por lo que, se presta hoy día, mucha importancia a una agricultura más biológica. Los problemas de insectos requieren cada vez mejores y mayores prácticas de control, ya sean que éstas incluyan el mejoramiento genético del cultivo, el uso de parasitoides,

depredadores, microorganismos entomopatógenos o insecticidas (Jugenheimer, 1981).

De los enemigos naturales de *S. frugiperda*, el hongo entomopatógeno *N. rileyi* es una de las opciones más prometedoras para ser utilizado como agente de control biológico, debido a que es un microorganismo ampliamente distribuido, capaz de infectar no solo a *S. frugiperda* si no también a una gran diversidad de insectos defoliadores del orden Lepidoptera. En México se ha reportado la existencia de *N. rileyi* controlando poblaciones de *S. frugiperda* llegando a ejercer hasta un 10 % de control (Sánchez, 2000).

PALABRAS CLAVE: Maíz, *Spodoptera frugiperda*, Control Biológico, *Nomuraea rileyi*, Epizootias

OBJETIVOS

- 1.- Aislar e identificar el hongo *Nomuraea rileyi* a partir de larvas de *Spodoptera frugiperda*.
- 2.- Evaluar la actividad patogénica del hongo *Nomuraea rileyi* en larvas del gusano cogollero de maíz.

HIPÓTEISIS

Se obtendrá al menos un aislado de *Nomuraea rileyi* altamente efectivo para el control del cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* bajo condiciones de laboratorio.

REVISIÓN DE LITERATURA

La plagas más importantes del cultivo del maíz es el gusano cogollero *S. frugiperda*, así como de otras gramíneas debido a su gran capacidad de adaptación y sus hábitos polípagos.

TAXONOMÍA

ORDEN: Lepidoptera

SUBORDEN: Frenate

FAMILIA: Noctuidae

GÉNERO: *Spodoptera*

ESPECIE: *S. frugiperda*

Características biológicas

El cogollero del maíz *S. frugiperda* vuela con facilidad durante la noche, siendo atraída por la luz; es de coloración gris oscura, las hembras tienen alas traseras de color blancuzco, mientras que los machos tienen color llamativo en las alas delanteras, y las traseras son blancas (Luginbill, 1928).

Las hembras depositan los huevos durante las primeras horas de la noche, tanto en el haz como en el envés de las hojas, estos son puestos en varios grupos o masas cubiertas por segregaciones del aparato bucal y escamas de su cuerpo. Una hembra puede poner como promedio 1000 huevecillos en grupos de 10 a 350 en cada puesta, las larvas nacen a los tres días o menos, cuando la temperatura es elevada > 25°C (Metcalf y Flint, 1965).

Las larvas al nacer se alimentan de la superficie de la hoja, destruyendo el mesófilo y la epidermis de un solo lado del follaje, dejando intacta la otra epidermis, observándose las áreas dañadas de color blanco y semitransparente (Chávez, 1990; Aponte y Morillo, 1987; Labrador, 1967), se trasladan a diferentes partes de la planta, 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 negra más ancha hacia el costado y otra parecida pero amarillenta más abajo, en la frente de la cabeza se distingue una "Y" blanca invertida (Metcalf y Flint, 1965).

Las larvas pasan por 5 a 6 estadíos, 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 estadío. A partir del tercer estadío se introducen en el cogollo, haciendo perforaciones que son apreciados cuando la hoja se desvaina (Luginbill, 1928).

Las pupas son de color caoba y miden 26 mm; esta fase se desarrolla en el suelo y el insecto permanece en reposo de 8-10 días hasta que emerge el adulto. El período de tiempo para el desarrollo larval es menor a medida que aumentan las temperaturas, con 22 y 13 días a 20 y 30 °C, respectivamente; a una temperatura ambiente media (26.5 °C) es de 15±5 días con la particularidad de que se presentaron 6 estadíos (Blahutiak, 1970; Piedra, 1974; Pérez y cols., 1994). El período de oviposición de los adultos a 30°C es de 4 y 3 días para las temperaturas restantes.

El ciclo de vida oscila entre 19 y 48 días, lo que está en relación con la dependencia de la temperatura de las distintas fases; a temperaturas elevadas el ciclo se acorta (Jassic y Reines, 1974; Piedra, 1974). A temperatura de 26.5 °C las hembras ponen 1216 huevos, a 25 °C 944 y a 30 °C se reduce a 386. Los valores del límite inferior de temperatura oscila entre 10.3 y 14.6 °C, para las distintas

fases del ciclo biológico. Según los estudios realizados, la plaga puede tener entre 11 y 12 generaciones anuales.

Daños

Durante su ciclo de vida, la hembra adulta y fertilizada coloca los huevos en masa sobre el follaje. Una vez que el huevo eclosiona, las larvas comienzan a alimentarse de la epidermis de la planta. En sus tres primeros instares, las larvas poseen la capacidad de desplazarse a través de distancias relativamente grandes; pueden secretar hilos de seda que les permite colgarse y caer con facilidad al suelo, además pueden presentar canibalismo. Tan pronto como la larva completa su desarrollo, cesa su alimentación, abandona el sitio donde ha vivido y pasa al suelo donde construye una cavidad o celda entre dos y siete cm de profundidad, está depende de la textura del suelo, la humedad y la temperatura. En la cavidad la larva se transforma en pupa, para luego emerger como adulto a la superficie del suelo (Fernández, 1991).

Durante las etapas de crecimiento vegetativo del maíz, las larvas consumen principalmente las hojas, que indirectamente afectan el rendimiento del cultivo, reduciendo el área fotosintética de estas; el ataque a plantas pequeñas, daña o destruye el tejido meristemático, ocasionando la reducción de la población de plantas o modificación de su arquitectura. En estudios cuantitativos sobre la selectividad de la plaga contra la planta de maíz, se ha demostrado el daño en etapa de crecimiento a las 5, 8 y 13 hojas, las pérdidas son de 26 y 20 % respectivamente; cuando el ataque se produce en etapas más tempranas el daño puede ser mayor, ya que las plantas no pueden recuperarse. Durante muchos años, para reducir los efectos nocivos de *S. frugiperda*, se ha dependido del uso de insecticidas químicos, los que son asperjados o espolvoreados; en muchas ocasiones la efectividad han sido bajas, debido a que estas se han realizado pasado el momento crítico de la plaga y la etapa fenológica más apropiada del cultivo o después de que los daños son irreversibles; incluso se ha pretendido aminorarla cuando prácticamente el cultivo alcanza un tamaño que imposibilita la

entrada de las máquinas al campo (Chávez, 1990; Aponte y Morillo, 1987; Labrador, 1967).

Distribución de la Plaga

Las larvas de *S. frugiperda* son polífagas y se encuentran en más de 80 especies de 23 familias de plantas (Pashey, 1988; Andrews, 1988) atacan principalmente a gramíneas como es el caso del maíz (Van Dine, 1913; Smith, 1919; Cowdey, 1923; Cifuentes, 1967; Popov y Reines, 1975; Raulston y cols, 1986); no obstante se ha detectado en los cultivos de frijol, tomate, cacahuate, soya, cebolla, alfalfa, col, eucalipto, gladiolo, pepino, tabaco, espinaca, nabo y algodón (Luginbill, 1928).

Tablas de Vida

En la literatura se señalan diferentes umbrales económicos, indican un umbral económico de 30 % o más de plantas dañadas, cuando ataca como “barrenador” y 50 % o más, cuando ataca como cogollero. Sin embargo, Notz (1973), a trabajando con diferentes niveles de infestaciones en parcelas experimentales, observó que infestaciones de hasta un 50 % de *S. frugiperda* como barrenador, no producían reducción en los rendimientos (Aponte y Morillo, 1987).

Dinámica Poblacional

En cualquier condición climática, *S. frugiperda* esta presente en cualquier época de siembra en períodos de cambios estacionarios de seca a lluvia o viceversa, se manifiestan incrementos sustanciales de la plaga, causando pérdidas considerables, así como el establecimiento de estas para siembras posteriores.

Enemigos Naturales

La protección de los enemigos naturales de *S. frugiperda* constituye uno de los elementos más importantes para establecer un equilibrio en la biorregulación de la plaga, en este campo se ha carecido de un trabajo sistemático a nivel de producción con el propósito de conocerlos y luego protegerlos, a nivel mundial se reportan más de 53 especies de insectos que afectan a esta plaga (Lezama, 1993).

Virtualmente, bajo los sistemas de manejo que incluyen, la reducción o eliminación del uso de plaguicidas químicos, los niveles poblacionales de enemigos naturales no solamente aumentan, sino también se detectan más temprano, lo que conduce a un efecto de regulación de la plaga más efectiva (Lezama, 1993).

También en observaciones de campo en áreas protegidas con liberaciones de *Telenomus* sp., y el Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN) frente a aplicaciones de insecticidas químicos, se puede constatar la presencia temprana de parasitismo natural sobre los huevos de *S. frugiperda* con *Chelonus* sp., en una proporción del 10 %, mientras que en el tratamiento químico este no se observó (Lezama, 1993).

Uso de Parasitoides

Las especies parasíticas de *S. frugiperda*, contribuyen a la biorregulación de las poblaciones de la plaga. Existen varias especies que son empleadas como elemento de lucha, teniendo en cuenta las características parasíticas, hábitos de conducta, efectividad en el parasitismo y capacidad de búsqueda, entre otros aspectos. Se necesitan además conocer en detalle, la biología, comportamiento, hábitos alimenticios y otros elementos para la selección de alimentos y las condiciones de reproducción más apropiadas, de manera que no se produzcan variaciones en las características del insecto plaga (hospedero), que conlleven a la reducción de la efectividad del parasitoide en condiciones de campo. *Telenomus* sp. (Hymenoptera:Scelionidae), *Euplectrus plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae), *Chelonus insularis* (Hymenoptera: Braconidae), *Rogas* sp.

(Hymenoptera: Braconidae), *Archytas marmoratus* (Diptera: Tachinidae), se encuentran entre las especies que han sido empleadas en el biocontrol de *S. frugiperda* (Ryder, 1968).

Telenomus sp.

Telenomus sp., constituye un organismo de lucha muy valiosa en el combate de *S. frugiperda* y otros lepidópteros de importancia agrícola y económica, dadas las características parasíticas que posee esta especie. Estos insectos tienen la capacidad de parasitar los huevos de *S. frugiperda* y alcanzar poblaciones equivalentes al doble de la de su hospedero, principalmente debido a que su ciclo de vida es mucho más corto (Ryder, 1968).

Las liberaciones masivas de estos insectos, se realizan tomando en cuenta el índice de masas de huevos existentes en las plantaciones y deben iniciarse cuando el cultivo está en la fase de 2 a 3 hojas. Una cantidad de 3,000 especímenes/ha es suficiente para disminuir o mantener las poblaciones de la plaga en índices bajos (Ryder, 1968).

Se pueden realizar liberaciones inoculativas hasta alcanzar las dosis recomendadas por unidad de área, siendo indicado este tipo de criterio, cuando existen índices de infestación que se encuentran por debajo de lo establecido. En caso de índices de infestación iguales o superiores al indicado se recomienda la liberación a gran escala o inundativa de los parasitoides que son más apropiados, teniendo en cuenta el efecto rápido y simultáneo de un mayor número de individuos del parásito (Ryder, 1968).

Euplectrus plathypenae

Este parasitoide es un elemento adicional en el control de plagas, y pudiera ser empleado durante las primeras fases o estadíos del insecto plaga, cuando se hayan producido fallas en el control o manejo de las poblaciones.

Las liberaciones de *E. plathypenae* se realizan en estado adulto, y sobre la base de la presencia de larvas de 3^{er} y 4^o estadio, aunque pueden realizarse liberaciones previas a estas etapas, para facilitar el establecimiento de la especie. Las dosificaciones están comprendidas entre 150-250 especímenes/ha, dependiendo del porcentaje de infestación existente. Las cantidades más pequeñas son recomendadas como preventivas y las mayores son utilizadas en momentos en que la plaga esta establecida. Se recomienda además realizar las liberaciones cuando las plantas de maíz tengan una altura de 20-30 cm (20-25 días de germinadas), que es el momento de mejor establecimiento del parásito (Ryder, 1968).

Chelonus insularis

Al igual que las especies antes mencionadas *C. insularis* constituye un elemento importante a tener en cuenta en el manejo de *S. frugiperda*. Sus características como parásito ovo-larval, así como el alto potencial reproductivo, han conducido al estudio de la reproducción masiva y liberación en las áreas de producción (Ryder, 1968).

Diversos estudios, avalan a esta especie como una de las de mayor influencia de forma natural, sobre las poblaciones el cogollero del maíz. Van Huis (1981) reportó una mortalidad de 35 %, producida por ésta y otras especies de entomófagos y entomopatógenos de forma natural. Por otra parte Ryder y Pulgar (1969), registraron un parasitismo del 12.8 % sobre el cogollero, pudiendo alcanzar hasta un 25 % en los meses de abril, mayo y junio.

Uso de Bioplaguicidas

En la actualidad se conocen diferentes especies de microorganismos entomopatógenos con potencial para ser usados en un programa de manejo integrado contra *S. frugiperda*, entre los que se incluyen la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner., 10 especies de hongos, 3 tipos de virus, 2 géneros de protozoarios y 3 nemátodos (Gardner y Fuxa ,1980; Lezama ,1993). La mayoría

de estos entomopatogenos tienen una mayor eficacia cuando se aplican sobre los primeros estadios larvales.

***Bacillus thuringiensis* Berliner**

Bacillus thuringiensis es uno de los más eficaces medios biológicos para el combate de *S. frugiperda*. Esta cepa permite reducir los niveles poblacionales y de daño en las áreas tratadas con respecto al testigo. Por otra parte la mezcla de este, con lambdacihalotrina, se logran efectividades muy similares a aquellas del plaguicida químico por si solo, lo cual resulta en una disminución de las dosis de ambos productos y por tanto del efecto nocivo sobre el agroecosistema. En estudios realizados con relación a la adición de coadyuvantes al caldo, se pudo comprobar que no se obtiene un incremento de la efectividad del biopreparados en ninguno de los casos, puesto que el comportamiento poblacional de la plaga es muy similar en todas las variantes, incluyendo aquellas que no poseen el aditivo (Gardner y Fuxa ,1980; Lezama ,1993).

Control Biológico

El control de plagas con productos químicos es cada vez más complicado. La exigencia por los consumidores en la reducción de la aplicación de estos productos es cada vez más notable. Los productos agroquímicos no siempre dan buenos resultados (Lensur, 2006). Algunos problemas asociados con el uso de plaguicidas incluyen el fracaso en el control de plagas, contaminación ambiental, el daño a la salud humana, el alto costo y resistencia de las plagas a estos productos (Badii *et al.*, 1996), la preocupación mundial sobre estos puntos ha motivado a muchos países a reducir el uso de plaguicidas y buscar métodos alternativos del control de plagas.

El control biológico comprende el uso de las poblaciones de los enemigos naturales; depredadores, parasitoides, patógenos, competidores o antagonicos para suprimir la población de la plaga, hacerla menos abundante y por tanto,

menos dañina comparado con lo que puede ser en la ausencia de los enemigos naturales (De Bach y Rosen, 1991).

Antes del nacimiento de la historia natural como una disciplina científica, en Europa occidental durante el siglo XV, los campesinos de China y Yemen movían las colonias de las hormigas depredadoras entre los árboles de cítricos (Coulson *et al.*, 1987); estas prácticas que datan de varios miles de años fueron desarrolladas por campesinos sobre la base de observaciones directas de depredadores grandes con ciclos de vida de fácil entendimiento.

En contraste con lo anterior, el fenómeno del parasitismo por parasitoides fue difícil de comprender para los trabajadores de los campos agrícolas; el primer trabajo se publicó en 1685 por el médico británico Martín Lister quien analizó el parasitismo de las orugas por los Ichneumonidos (Bodenheimer, 1931).

En el caso de los patógenos, Agostino Basi demostró experimentalmente por vez primera la infección del gusano de seda *Bómbix mori* Linneo por un hongo *Beauveria bassiana* (Mohammad *et al.*, 2000).

La historia del control biológico en México, corre paralela a la de Estados Unidos de América cuando a raíz del éxito obtenido en el combate biológico de *Icerya purchasi* (Mask) a finales del siglo pasado; motivo que en el año de 1900 se creara en México la comisión de Parasitología Agrícola que tenía entre sus principales objetivos la introducción de los enemigos naturales de la langosta migratoria, el picudo del algodón, la mosca pinta o salivazo de los pastos (*Prosapia y Aneolamia*) y la rata de campo; en esta época *Opius crawfordii* (Keitin y Picado), fue reportado como uno de los enemigos naturales más importantes de *Anastrepha* en el área de Cuernavaca, Morelos, además en 1902, Koebele, quien introdujo *Rodalia cardinales* (Mulsant) a los Estados Unidos de América, visitó México en busca de los enemigos naturales de *Lantana camara* (Linneo) para ser introducidos a Hawai (Mohammad *et al.*, 2000).

Dentro del control biológico, los más utilizados están los hongos entomopatógenos, uno de ellos y en este caso el más importante es *N. rileyi*.

***Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson**

N. rileyi fue descrita en un principio como *Botrytis rileyi* (Farlow) y transferido al género *Spicaria* por Charles en 1936 (citado por Ignoffo 1981), posteriormente las especies de *Spicaria* fueron ubicados en *Paecilomyces*, sin embargo la presencia de la fiálide atípica de *Paecilomyces* y la coloración verde de su colonia permitieron que no fuese ubicada a ese género y se ubicó en el de *Penicillium*, sin embargo investigadores y científicos continuaron usando el nombre del antiguo género *Spicaria* y fue hasta 1974 que se reestructuró el género de *Nomuraea* cambiando de *Spicaria rileyi* a *Nomuraea rileyi* (Ignoffo, 1981).

TAXONOMÍA

ORDEN: Deuteromycetes

CLASE: Hyphomycetes

ORDEN: Moniliales

FAMILIA: Moniliaceae

GÉNERO: *Nomuraea*

ESPECIE: *N. rileyi*

N. rileyi se encuentra distribuido en diferentes agroecosistemas y zonas geográficas donde frecuentemente ocasiona epizootias naturales sobre *S. frugiperda* y otros lepidópteros de importancia económica como *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), *Trichoplusia ni* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) y *Helicoverpa virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). Es así como este microorganismo se ha convertido en un excelente agente de control biológico con gran potencial para ser utilizado dentro de estrategias de Manejo Integrado de la Plaga (León y Pulido 1991). A pesar de este potencial como agente biocontrolador,

no existe ningún bioplaguicida registrado a base de este microorganismo en el mundo (Villamizar *et al.*, 2004).

Biología del Hongo

En el hongo *N. rileyi*, las infecciones se producen por los conidios o propágulos asexuales presentes en el suelo, superficie foliar, aire, etc. Al entrar en contacto con las larvas, quedan adheridos y luego de germinar atraviesan el tegumento del insecto. Una vez en el interior del hemocele, el micelio se ramifica hasta ocuparlo completamente. La muerte del hospedante es frecuentemente una combinación de la acción de toxinas, obstrucción física de la circulación de hemolinfa, invasión de órganos, etc., (Figura. 1) finalmente, el tegumento es nuevamente atravesado por las hifas y, si las condiciones de temperatura y humedad ambientales son favorables, se producen conidias en la superficie externa del cadáver. Estas conidias son unidades infectivas que se ponen en contacto con nuevos hospederos, luego de ser dispersados por agentes externos como el viento y las precipitaciones (McCoy *et al.*, 1988, citado por Pendland *et al.*, 1997; Horton *et al.*, 1980, Sprenkel y Brooks, 1975).

Se caracteriza también por presentar estructuras reproductivas en forma de conidios, crece lentamente en medios de cultivo presentando en un inicio una colonia verde pálida, cambiando conforme maduran sus conidias a verde malaquita o verde olivácea. Su hifa vegetativa es septada, de pared lisa, hialina o ligeramente pigmentada; su estructura reproductiva es un conidioforo septado que nace de la hifa formando densos grupos de racimos con 2 o 3 fiálides compactadas alrededor del conidioforo, las fiálides son cilíndricas con la base ocasionalmente ensanchada y cuello muy corto o ausente de 4.7-6.5 x 2.3-3 μm . Los conidios en cadena, de forma elipsoidal algunas veces cilíndricos de 3.5-4.5 x 2-3.1 μm (Samson, 1974).

La temperatura óptima para el crecimiento micelial y esporulación del hongo es de 25 °C, el tiempo promedio para iniciar la esporulación a 15, 20 y 25 °C es de 21, 10 y 9 días respectivamente (Ignoffo *et al.*, 1976). A temperaturas de 5, 35, 37 y 40 °C y entre 40 y 60 % de humedad relativa no presenta germinación de conidias, (Ignoffo, 1981).

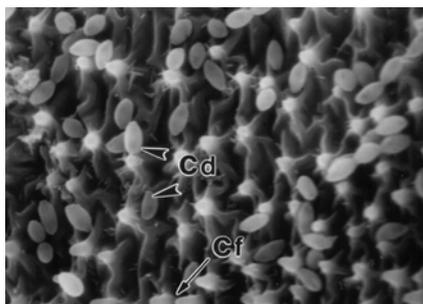


Figura. 1 Distribución de conidias en la cutícula de la larva Cd) Conidias y Cf) Cutícula. Tomado de Kumar *et al.* (1997).

Las larvas se infectan inicialmente con las esporas que se encuentran en las plantas contaminadas. Transcurrido un ciclo de crecimiento fúngico y esporulación, las esporas generadas se dispersan desde la superficie de los cadáveres, produciéndose así probablemente el primero de dos o tres incrementos en el inóculo que eventualmente proveerá suficientes esporas (Pendland *et al.*, 1997).

Especies de Insectos Susceptibles

Anticarsia gemmatalis (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), *Trichoplusia ni* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) y *Helicoverpa virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) (Villamizar *et al.*, 2004).

Especificidad

El espectro de hospederos de *N. rileyi* esta principalmente limitado al orden Lepidoptera, aunque al menos dos especies de Coleópteros *Hypera punctata* (Fabricius) y *Leptinotarsa decemlineata* (Kroatz), han sido reportados como susceptibles al hongo en forma natural y en laboratorio respectivamente (Ignoffo y Boucias, 1992).

Producción Masiva

N. rileyi es un entomopatógeno que ha presentado dificultades para lograr la producción óptima de unidades infectivas con alto grado de patogenicidad. Al respecto Bell, (1975) propone cultivos de *N. rileyi* a base de medios generales para la reproducción de hongos obteniendo cantidades limitadas de conidios con altos costos de producción. Ignoffo, (1981) encontró los requerimientos nutricionales para lograr su producción en medios sólidos y líquidos, determinándose que el hongo se desarrolla mejor en sabouraud, papa-dextrosa y extracto de levadura agar. La comparación entre la producción en fermentaciones sumergidas y superficiales indican que después de 21 días a 24 °C se obtuvieron promedios de 368 mg/conidias/100 ml de agua y 575 mg de blastosporas no fueron infectivas después de 6 días de su obtención.

Estabilidad

Un aspecto importante en el estudio del control microbiano, es el destino de éste material después de llegar al suelo; la información al respecto proveerá de mejor entendimiento de la iniciación y progreso de epizootias de entomopatógenos.

Ignoffo *et al.* (1976), indican que el suelo es probablemente el reservorio de conidias que inician anualmente epizootias de *N. rileyi* sobre algunos lepidópteros plaga. El inóculo suficiente y necesario para ocasionar una nueva epizootia, puede ser producido por una o varias larvas enfermas por m². El inóculo puede pasar el invierno en cadáveres de insectos o en conidias libres (Sprenkel y Brooks, 1977; Ignoffo *et al.*, 1977).

N. rileyi a temperatura y humedad relativamente bajas, puede producir tres tipos de estructuras de resistencia morfológicamente distintas; estructuras intrahifales de doble pared celular, clamidosporas y cuerpos de reposo de grandes cantidades de lípidos localizados en la cavidad del cuerpo del insecto (Pendiand, 1982; McCoy *et al.*,1988), en donde sobreviven mientras las condiciones ambientales son propicias para iniciar una nueva epizootia.

Inducción de Epizootias

Muchos de los estudios realizados indican que la aplicación directa de *N. rileyi* puede controlar aunque no inmediatamente las poblaciones de algunos lepidópteros, para reducir el tiempo de acción del hongo, se requiere dirigir la aplicación a los primeros ínstares de la plaga y aun entonces sería necesario altas concentraciones del hongo. Sin embargo, una aplicación temprana de conidias o liberaciones de insectos infectados puede inducir epizootias y suprimir a la plaga cuando la planta es más sensible al daño del insecto.

Sprenkel y Brooks (1979) distribuyeron cadáveres de *H. virescens* cortados en tres secciones, mezclados con vermiculita a razón de 3360 insectos/ha y demostraron que una epizootia puede ser provocada 14 días antes de que se presente una epizootia natural. Por otra parte Ignoffo *et al* (1976) investigaron el efecto de una aspersión de 1.1×10^{13} conidias/0.4 ha de soya, con la planta en floración, y un segundo experimento con una dosis doble logrando alterar significativamente el modelo de la epizootia. El porcentaje de infección en el primer experimento fue de 82.5 % en relación a un 7.4 % en el área no tratada y un porcentaje del 90 % y 18.5 % respectivamente para el segundo experimento.

El incremento natural de la incidencia de *N. rileyi* en campo resulta del limitado progreso de la dispersión de conidias de larvas muertas y que *N. rileyi* puede ser un efectivo insecticida microbiano si se aplica directamente contra 1° y 2° estadíos de lepidópteros; sin embargo este ofrece más protección si se usa dentro de un programa de manejo de plagas (Sprenkel *et al.*, 1979).

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de larvas de *Spodoptera frugiperda* infectadas por *Nomuraea rileyi*

Muestras de larvas infectadas de gusano cogollero de parcelas experimentales de maíz del área del Bajío de Buenavista, Saltillo, Coahuila, con apariencia algodonosa, en color blanco, verde claro y oscuro fueron colectadas durante el verano del año 2008. La muestra de cada lote o parcela fueron llevadas en caja de Petri estériles desechables y selladas para trasladarlas al laboratorio. A cada muestra se le colocó un algodón húmedo y se mantuvo a temperatura de laboratorio a 26 ± 2 °C durante 48-120 h, hasta observar la esporulación del hongo, sobre la larva muerta.

Aislamiento, Purificación e Identificación de *Nomuraea rileyi*

De cada parcela se procesó al menos una larva infectada para recuperación del entomopatógeno *N. rileyi*, la larva fue colocada sobre la superficie del medio de cultivo V8- Agar, contenido en placas de Petri, presionando sobre el medio, la larva infectada para impregnar sobre de el las conidias del hongo para su crecimiento, las placas fueron incubadas a 28-30 °C por un periodo de 48 a 72 h., hasta observar microscópicamente la coloración verdosa típica de este hongo. Un explante realizado con sacabocados del cultivo preparado para sembrar el hongo hasta obtener placas con aislados purificados. Muestras de crecimiento hifal de los aislados fueron utilizadas para realizar observaciones de preparaciones en lactofenol al microscopio 40X, para definir las estructuras reproductivas vegetativas del hongo y compararlas con las reportadas por Barnett (1996), para su identificación comparativa de la especie.

De cada aislamiento se realizó un concentrado acuoso de conidios provenientes del cultivo de caja de Petri, para inocular tópicamente larvas de 3^{er} estadio del gusano cogollero, una vez infectado y esporulado el entomopatógeno, se efectuaron los concentrados acuosos para realizar los bioensayos de actividad bioinsecticida.

Cría de larvas de *Spodoptera frugiperda*

Para la cría de este insecto y durante el periodo Agosto- Septiembre del 2008, se colectaron larvas de los últimos estadios (5° y 6° estadio) de parcelas de maíz infestadas en Buenavista Saltillo, Coahuila. La colonia se estableció en una cámara bioclimática del Departamento de Parasitología a 25 ± 2 °C con un fotoperiodo 12:12 y 50-60 % de HR. Las larvas fueron alimentadas con dieta artificial (AKPA Chemical & Equipment Co.), hasta el estadio de pre-pupa. Las pupas sanas fueron depositadas en vasos de plástico del No. 3, para luego colocarlas dentro de la jaula de oviposición. Posteriormente se esperó la emergencia de los adultos, los cuales se alimentaron con agua azucarada al 5 % diariamente. Los huevos fueron recolectados manualmente revisando cuidadosamente las jaulas de oviposición y desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0.2 % para la eliminación de contaminantes en la cría, posteriormente se colocaron en vasos de plástico del No. 1 con tapa, (Envases Cuevas S.A de C.V), que contenían dieta artificial y se esperó la emergencia de las larvas de primer estadio (L1).

Aislamiento del hongo *Nomuraea rileyi*

Para el aislamiento del hongo entomopatógeno *N. rileyi*, se realizó una recolecta de larvas infectadas de *S. frugiperda* en el área conocida como “El Bajío” de la UAAAN. Las larvas recolectadas fueron llevadas al laboratorio, donde el hongo *N. rileyi* se aisló en placas de Petri conteniendo el medio de cultivo V8-Agar y se incrementaron en el medio de cultivo artificial y directamente sobre las larvas de *S. frugiperda*. En estos medios de cultivo se inocularon esporas del hongo entomopatógeno, se esperó su esporulación para concentrarlos y posteriormente realizar los ensayos de actividad.

Reproducción de *Nomuraea rileyi*

Se realizaron dos tipos de incubación para evaluar el crecimiento y esporulación de *N. rileyi* en cámara húmeda, el primero de ellos fue el de V8- agar. El medio se preparó mezclando jugo V8 en agua destilada y se esterilizó a 120 °C por 15 min a 15 lbs, una vez estéril el medio se depositó en placas de Petri estériles en condiciones asépticas, dejándose reposar y enfriar hasta su solidificación, después de 24 h de prueba de contaminación fueron inoculadas con *N. rileyi*, se dejó incubar por un periodo de entre 8 y 10 días. La evaluación se hizo hasta corroborar la esporulación al microscopio.

El segundo método de propagación de *N. rileyi* se efectuó por inoculación de esporas de un concentrado de laboratorio con una jeringa hipodérmica directamente sobre las larvas de 3^{er} estadio de *S. frugiperda*, para esperar el crecimiento y esporulación del hongo. Las larvas infectadas y muertas por el hongo fueron concentradas, y posteriormente utilizadas para realizar los bioensayos de efectividad.

Conteo de conidios de *Nomuraea rileyi*

Para cuantificar la cantidad de conidios en suspensión acuosa, se empleo la camara de Neubauer y el conteo de esporas se realizó al microscopio, la concentración madre se diluyo para facilitar el conteo. La transformación de los datos se realizó en base a la siguiente fórmula (Hausser Scientific Company).

$$\text{Conidias / ml} = \# \text{ de conidias contadas por mm}^2 \times \text{dilución usada} \times 10,000$$

Bioensayos de actividad de cepas de *Nomuraea rileyi* sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*

Con larvas, de 3^{er} estadio, se realizaron bioensayos en laboratorio, para cada bioensayo, se utilizaron 10 larvas de *S. frugiperda* por repetición y tratamiento, considerando a cada larva como una unidad experimental bajo un diseño completamente al azar.

Los bioensayos se repitieron al menos cinco veces y los tratamientos fueron cinco diferentes métodos de infección: **a)** aplicación con cottonete, sobre el cuerpo de la larva, **b)** contaminación superficial de la dieta, ésta consistió en contaminar la dieta con una suspensión previamente titulada del entomopatógeno, es decir se colocó una suspensión conocida de conidias del hongo *N. rileyi* en el alimento de las larvas, se esperó a que seca y posteriormente se colocaron las larvas, **c)** inmersión de larvas en la suspensión de conidias: la cual consistió en sumergir las larvas en una solución conocida de esporas del hongo por un lapso de tiempo de 5 segundos, a una concentración conocida, **d)** aplicación tópica mediante una microjeringa, aplicando 5 µl por larva y **e)** aspersión de conidias sobre las larvas, a través de un atomizador, este fue rociado sobre las larvas colocadas previamente en los dos tipos de dieta de manera que cubriera una cierta área. Para la realización de los bioensayos, se determinó la concentración de esporas mediante el uso de una cámara de Neubauer (Muñoz *et al.*, 2000). Para determinar el TL₅₀, se determinó mediante regresión lineal, comparando las formas de propagación del hongo, de los tres métodos de inoculación más eficiente en crecimiento e infección.

Análisis de Datos

Los datos de porcentaje de mortalidad por cepa, obtenidos de la infección fueron analizados a través de un análisis de varianza por factores (ANVA) y comparados por una prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), mediante un diseño de bloques al azar (SAS, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de *Nomuraea rileyi*

Durante el periodo Agosto-October del año 2008 se colectaron larvas del gusano cogollero del maíz en parcelas del cultivo en el área del campo experimental el Bajío, de Buenavista, Saltillo, Coahuila. Durante esta época hubo presencia de una epizootia generalizada en el cultivo en desarrollo, la plaga de donde se colectaron larvas infectadas se recuperó y se aisló el entomopatogeno (Figura. 2).

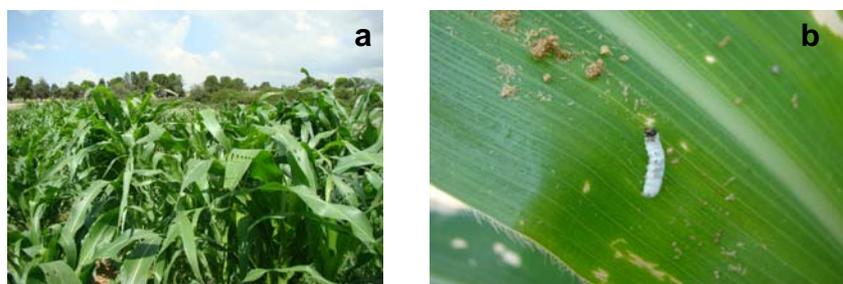


Figura. 2 a) Área experimental del Bajío, b) Larvas infectadas con *N. rileyi* recolectadas en maíz

Las larvas infectadas con el hongo fueron consideradas como un aislado por parcela, recuperándose 11 aislados de este microorganismo. La recuperación, aislamiento y purificación se realizó en el medio V8-Agar, reposando la larva infectada en el mismo medio, de donde una vez desarrollado el hongo se purificó por medio de explantes con un sacabocados. La incubación para el aislamiento del hongo se realizó a 28° C por 5 a 7 días hasta la esporulación o cambio de coloración del micelio de blanco a verde oscuro (Figura. 3).



Figura. 3 Larvas colectadas en campo y puestas en cámara húmeda para su esporulación.

Identificación del Hongo Entomopatogeno

Placas del cultivo puro de los diversos aislados de *N. rileyi*, fueron reactivados en medio V8-Agar para su crecimiento y esporulación a 28° C por 120 a 168 h. Muestras de explantes tomados directamente con aguja de disección fueron colocados en un portaobjetos con una gota de lactofenol, para las observaciones al microscopio compuesto a 40X, y poder observar las estructuras reproductivas características de esta especie (Figura. 4), donde se aprecia también en el mismo medio el crecimiento colonial característico de color blanco de sus hifas al inicio de su crecimiento, y su cambio de coloración a verde claro y posteriormente a oscuro típico de esta especie (Figura. 3).

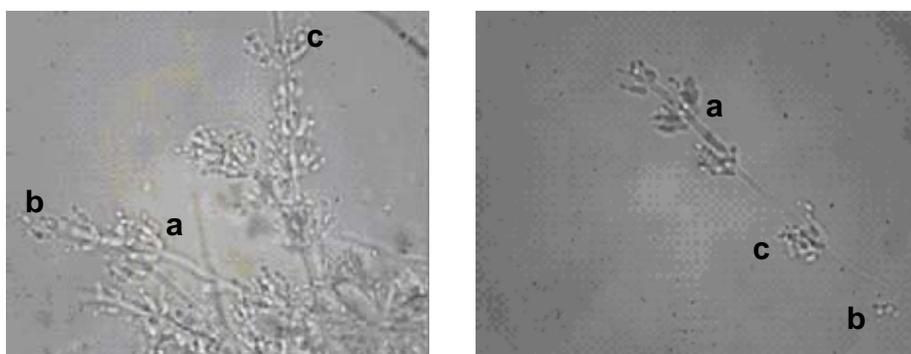


Figura. 4 Crecimiento del entomopatogeno *Nomuraea rileyi* a) Fíalides, b) conidias y c) conidióforos

Activación de los Aislados de *N. rileyi* en larvas de *S. frugiperda*

Se realizó un concentrado de cada aislado a partir de muestras de explantes obtenidas de cada cepa recuperada en V8-Agar. Cada concentrado fue inoculado vía tópica a larvas de 2° y 3^{er} estadio de *S. frugiperda*, cultivadas bajo condiciones asépticas en laboratorio, las larvas fueron mantenidas a temperaturas de cámara de incubación a 25 ± 2 °C y 50 a 60 % de HR, bajo dos procedimientos (Figura. 5), cultivo en dieta artificial y en dieta natural, donde después de 5 a 7 días desarrollaron la micosis del hongo y murieron, posteriormente fueron utilizadas para elaborar un concentrado de inóculo (conidias) para realizar los bioensayos de actividad. Para concentrado se trató de obtener la mayor cantidad posible de conidias (Figura. 6).



Figura. 5. Cepas aisladas de larvas colectadas en campo y pigmentación de micelio

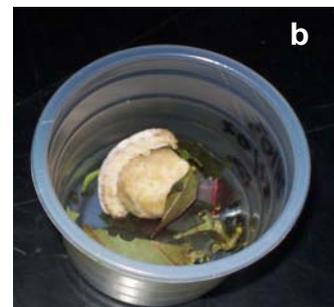


Figura. 6. Dietas empleadas para la cría y evaluación de la actividad del hongo *Nomuraea rileyi* sobre larvas de 3^{er} estadio de *Spodoptera frugiperda* a) dieta artificial y b) dieta natural.

Bioensayos de Actividad Bioinsecticida

Cada aislado de *N. rileyi* fue inoculado a larvas de *S. frugiperda* del 3^{er} estadio bajo cinco procedimiento de inoculación e incubado en dos dietas para el desarrollo de la infección y expresión de la micosis externa del hongo. El cuadro 1 muestra el porcentaje de mortalidad causado por tres aislados de este hongo en las dos dietas de evaluación donde se aprecia que particularmente no existe diferencia estadística significativa ($P \leq 0.5$) en la mortalidad del insecto cultivado en las dos dietas de desarrollo, apreciándose también un bajo porcentaje de mortalidad en los método a la dosis evaluada. El comportamiento de los tres aislados del entomopatogeno fue similar en las dietas, por lo que posiblemente se trate de la misma cepa.

Cuadro 1. Porcentaje de mortalidad de larvas de 3^{er} estadio del cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* por cepas de *Nomuraea rileyi*.

Cepa	Concentración	Dieta Artificial	Concentración	Dieta Natural (<i>Ricinus communis</i>)
NR101	3.4×10^8	17.768 a	1.7×10^7	17.037 a
NRG1	3.7×10^8	16.873 a	3×10^8	13.648 a
NRG1,2	1.7×10^8	12.160 a	7.1×10^7	11.811 a
DSM=12.602,CV=78.2911,MM=15.60027		DSM = 13.439 CV = 91.94509 MM = 14.16547		

El análisis de varianza por factores de variación indica que no existe diferencia en la actividad insecticida para el procedimientos de infección, ni tampoco para el factor aislado de *N. rileyi*. Al analizar comparativamente dichos procedimientos de infección de conidios del hongo en larvas del tercer estadio del gusano cogollero en las dos dietas, se observó similar actividad medida en mortalidad que provoca *N. rileyi* en el insecto.

Los concentrados de conidias de *N. rileyi* evaluados variaron en su concentración y pudieron interferir en la fluctuación de la mortalidad al insecto, tal y como se aprecia en el cuadro 2.

Cuadro 2. Porcentaje de mortalidad en larvas de 3^{er} estadio del cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* tratadas con *Nomuraea rileyi* e inoculadas con diferentes técnicas.

Dieta Artificial			Dieta Natural (<i>Ricinus communis</i>)		
Concentración	Método	LC ₅₀	Concentración	Método	LC ₅₀
3.7 x 10 ⁸	Inmersión	23.896 a	3 x 10 ⁸	Inmersión	32.720 a
3.4 x 10 ⁸	Tópica	19.648 a	1.7 x 10 ⁸	Tópica	14.068 b
1.7 x 10 ⁸	Cotonette	17.353 a	9.6 x 10 ⁷	Cotonette	11.371 b
5.7 x 10 ⁷	Aspersión	14.105 ab	7.1 x 10 ⁷	Aspersión	9.668 b
2.4 x 10 ⁷	Dieta	3.000 b	6.6 x 10 ⁷	Dieta	3.000 b

En la mayoría de los procedimientos de inoculación existe variación numérica en el porcentaje de mortalidad en el insecto, la inoculación por inmersión, tópica y empleando cottonete fue donde se observó la mayor mortalidad, cuando se asperjo al insecto y la dieta, la mortalidad estadísticamente (P=0.05) fue menor. Para propósitos prácticos ninguno de los procedimientos de infección produce resultados satisfactorios para obtener altos porcentajes de mortalidad en el insecto, tal y como se desearía en un sistema de propagación *in vitro*, como sucede en el caso de la propagación o replicación del virus en insectos (NPV), donde empleando cualquiera de los procedimientos la mortalidad es absoluta, (Ignoffo 1981). Es posible que la temperatura (26 a 32 °C) y la humedad (≤ 40%) afecten la patogenicidad del hongo, probablemente debido a la falta de mayor humedad ambiental que permita la expresión patogénica tal como sucede en el medio ambiente, donde la expresión de las epizootias que se han observado se ve

influenciado por la humedad y la temperatura, donde a 18-21°C y 100% de humedad relativa (HR) se desarrolla óptimamente la enfermedad, (Ignoffo y García, 1985). Los mejores porcentajes de mortalidad se obtuvieron con el procedimiento de infección por inmersión del insecto en conidios de *N. rileyi*, donde en ambas dietas de incubación del insecto tales dieta natural (32.7 %) y dieta artificial (23.8 %), estadísticamente se expresó mejor la patogenicidad del hongo.

Durante los bioensayos de toxicidad se observó variación dentro de cada cepa de *N. rileyi* en los días o tiempo de incubación para provocar la muerte del mismo, por lo que se determinó el tiempo letal medio (TL₅₀) en base a la formula TLM [Numero de Días que tardo en morir la larva x Numero de Larvas infectadas en ese día] / Total de larvas infectadas, para cada procedimiento de inoculación y cepa (Cuadro 3). En general el TL₅₀ vario de 4 días a 8.8 días en los cinco procedimientos de inoculación, siendo el de inmersión donde la TL₅₀ funcionó mejor para todas las cepas, lo cual se correlaciona con el procedimiento de inoculación por inmersión donde se obtuvo el mejor porcentaje de mortalidad en los tres aislados que se estudió.

Cuadro 3. Determinación del tiempo letal medio (TL₅₀) de cepas de *Nomuraea rileyi*, sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*.

Tiempo Medio de Mortalidad					
Dieta Artificial			Dieta Natural		
Cepa	Método	Día	Cepa	Método	Día
NRG1	Tópico	8	NRG1	Tópico	8
	Dieta	7		Dieta	8
	Cottonete	7		Cottonete	7
	Aspersión	7		Aspersión	8
	Inmersión	7		Inmersión	6.5
NEG1,2	Tópico	6.25	NRG1,2	Tópico	7.5
	Dieta	7		Dieta	7.6
	Cottonete	6.3		Cottonete	0
	Aspersión	4		Aspersión	5
	Inmersión	8		Inmersión	6.6
NR101	Tópico	8	NR101	Tópico	9
	Dieta	8		Dieta	6.8
	Cottonete	8.8		Cottonete	7
	Aspersión	6.75		Aspersión	7
	Inmersión	6.5		Inmersión	6.6

Al respecto Lezama *et al.* (1994), al evaluar la virulencia de cepas de *N. rileyi* contra larvas de *S. frugiperda*, determinaron una susceptibilidad del 100 % en larvas neonatas (L1). Leucona y Díaz (1995) determinaron porcentajes de mortalidad de *S. frugiperda* con 25 cepas de *N. rileyi* donde el porcentaje mas alto fue del 100 % de mortalidad y el menor fue de 76.6 %, difiriendo estos resultados con nuestro trabajo, ya que se encontraron mortalidades muy por debajo de lo reportado por estos autores, el tiempo letal mas alto fue de 8.8 días y el mas bajo de 4 días, en cuanto a estos resultados. Así mismo Rodríguez (1996), evaluó 18 cepas de *M. anisopilae* a una concentración de 1×10^8 conidios/ml y obtuvo un TL₅₀ de 10.4 días con una mortalidad del 91.6 % y 96 %, mientras en otro estudio realizado con *B. bassiana* mostró una mortalidad máxima del 100 % y la mínima del 30 %.

En los rangos de TL₅₀ para *Nomuraea rileyi* son similares a los reportados por otros entomopatogenos como *M. anisopilae* que a 1×10^8 conidios/ml el TL₅₀ es de 10.4 días, según Rodríguez (1996).

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales en que se desarrollo el trabajo podemos concluir que se aislaron e identificaron tres cepas de *Nomuraea rileyi*, evaluadas patogenicamente en *S. frugiperda* con baja actividad sobre el mismo insecto, bajo cinco procedimientos de infección donde el método de inoculación mas eficiente del hongo (*Nomuraea rileyi*) fue el de inmersión de la larva del cogollero del maiz sobre la suspensión de conidias infectivas del entomopatogeno. También el tiempo medio letal (TL₅₀) para el insecto infectado cultivado en dieta artificial fue de 4 hasta 8.8 días, mientras que para la dieta natural fue de 5 hasta 8 días, manifestándose los síntomas de la infección a partir de los 4 días aproximadamente.

LITERATURA CITADA

- Allen, J.M. 1983. Informe de experimentos concluidos sobre *Spodoptera frugiperda*. <http://www.plagasagricolas.info.ve/fichas/ficha.php?hospedero=316&plaga=173>. Archivo primavera. INISAV_ Cuba en línea, Citado en abril de 2009.
- Aponte, O. y F., Morillo. 1987. Problemática entomológica del maiz en el estado Portugués. IX Curso de entomología general y manejo integrado de plagas. <http://www.plagasagricolas.info.ve/fichas/ficha.php?hospedero=316&plaga=173>. En línea, Citado en abril de 2009.
- Badii, M.H; Flores A. E; Foreughbakhch, R; Quiroz, H; Torres, R. 1996. Ecología de manejo integrado de plagas (MIP) con observaciones sobre control biológico de insectos. En: Avances recientes en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. 40-47 pp.
- Barnett, H., and B. Hunter. 1996. Illustrated genera of imperfect fungi. 3rd ed. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 218 pp.
- Bartolini R. 1990. El Maíz. Ed. Agro guías mundi-persa. 276 pp.
- Bell, J.V. 1975. Production and patogenicity of the fungus *Spicaria rileyi* from solid and liquid medium. *Journal of Invertebrate Pathology* 26: 129-130.
- Blahutiak A. 1970. Influencia de la temperatura en el desarrollo de *Laphygma frugiperda*. Serie Poeyana. INISAV, la Habana Cuba. 77pp.
- Bodenheimer, F.S, 1931. Estudios sobre la ecología y el control de la langosta marroquí (*Doclostaurus maroccanus*) en Irak No. 1 Irak., Bagdad, 29: 121 pp.
- Centro de Investigaciones Agrarias CIA, México 1980. El cultivo de maiz en México. <http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/SPODOPTTE.htm>. En línea, Citado en abril de 2009.
- Coulson, R, 1987. Artificial Intelligence and Natural Resource Management. *Revista Science Classic*. 17 July 1987: Vol. 237. No. 4812, 262 pp.
- Chávez, A. 1990. Distribución espacial del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de la Facultad de Agronomía de Maracay*. 26: 93- 99 pp.

- De Bach, P; Rosen, D. 1991. Biological Control of Insects Pests and Weeds. Ed. Chapman and Hall, London. 844 p.
- Fernández R. 1991. Plagas de gramíneas. En: Guía de Protección Vegetal Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 155 – 171 pp.
- Gardner, W. A. y Fuxa J. R. 1980. Pathogens for the supression of the fall armyworm. Florida Entomologist. 63: 439-47 pp.
- Horton D., Carner G., Turnispeed S. 1980. Pesticide inhibition of the entomopatogenous fungus *Nomuraea rileyi* in soybeans. Environmental Entomology. 9: 304 – 308 pp.
- Ignoffo, C.M. 1981. The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide. Ed Burges. 513-538 pp.
- Ignoffo, C.M, Boucias, D.B. 1992. Relative activity of geographics isolate of *Nomuraea* Bioenssayed against the cabbage Looper and velvetbean capertillar. Journal of Invertebrate Pathology. 59: 215-217 pp.
- Ignoffo, C. M. Y C. García. 1976. Hosts spectrum and relative virulence of an Ecuadoran and Mississipian biotype of *Nomuraea rileyi* Journal of Invertabrate Pathology. 45: 346-352 pp.
- Ignoffo C.M, García, C, Hostetter, D.L, Pinnell, R.E. 1977. Vertical movement of conidia of *Nomuraea rileyi* trough sad laom soils. Journal of Economic Entomology. 70: 163-164 pp.
- Ignoffo, C.M, García, C, Alyshima, O.A, y Lappa, N.V. 1976. Laboratory and field studies whit Boverin: a mycoinsecticidal preparation of *Beauveria bassiana* produced in the Soviet Union. Journal of Economic Entomology 72: 562-565 pp.
- Jassic, J y Reinés, M. 1974. Estudio experimental de la influencia de la temperatura en la palomilla del maíz. Ciencias 44:1-19 pp.
- Jugenheimer, W. R. 1981. Maiz Ed. ELSA México. 841 pp.
- Lensur L. 2006. Manual del cultivo de maiz. Ed. Trillas. 80 pp.
- León, M; Pulido, J. L. 1991. Importancia del control natural del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. Memorias. Seminario *Spodoptera*

- frugiperda* (El Gusano Cogollero) en sorgo, maíz y en otros cultivos, Revista Colombiana de Entomología 78-82 pp.
- Luginbill, P. 1928. The fall armyworm. USDA. Tech. Bull. 34: 92 pp.
- Lezama, R. 1993. Patogenicidad en laboratorio de hongos (Hyphomycetes) y del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de Colima. Tecoman:159 pp.
- Metcalf, C.R. y Flint. 1965. Insectos destructivos e insectos útiles. Ed. Continental. México. 1208 pp
- McCoy, C.W., Samson, R.A. y Boucias, D.G. 1988. Entomopathogenic fungi. Vol V. part A. Ed. CRC. 243 pp.
- Mohammad, H, Flores, A. Galán W. L. 2000. Fundamentos y Perspectivas del Control Biológico. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. 462 pp.
- Muñoz D., Martínez A. M., Murillo, R., Ruiz de Escudero, I. Vilaplana Llúisa. 2000. Técnicas básicas para la caracterización de baculovirus en: Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Editorial PHYTOMA. España: 496-498 pp.
- Notz. A, 1973. Respuesta de las plantas de maíz al ataque de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Boletín Entomológico. 4: 92-99pp.
- Pashey D. P. 1988. Current status of the armyworm host strains. Florida Entomologist. 71: 227-34.
- Pendland, J.C. 1982. Resistant structures in the entomogenous Hyphomycete *Nomuraea rileyi*: an ultrastructural study. Journal Botanic. 60: 1569-1575 pp.
- Pendland J., Boucias D.; 1997. *In vitro* growth of the entomopathogenic Hyphomycete *Nomuraea rileyi*. Mycologia. 89 66–71pp.
- Pérez E., F. Piedra, Ma. de los A. Zayas, J. Gómez-Souza, E. Blanco, O. Fernández, A. Díaz, J. L. Ayala, J. Rojas, A. Pérez, M. Sanchez, T. Mateo, J. Ovies y C. Hernández. 1994. Manejo Integrado de la palomilla del maíz

- S. frugiperda*, J. E. Smith). IX Forum Nacional de Ciencia y Técnica. La Habana, Cuba: 28 pp.
- Piedra, F. 1974. Effect of different forage diets on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Revista Cubana de Ciencia Agrícolas. Ed. English. 8: 99 -103 pp.
- Ryder, W.D. y Pulgar, N. 1968. Apuntes sobre parasitismo de la palomilla del maíz (*Spodoptera frugiperda*). Revista Cubana Ciencias Agrícolas 3: 271-76 pp.
- Sanchez, S. 2000. Entomogenous fungi associated with the cotton aphid in the Texas high plains. Southwestern Entomologist. 18: 69-70 pp.
- Sprenkel R., Brooks W., Van Duyn J., Deitz L.; 1979. The effects of three cultural variables on the incidence of *Nomuraea rileyi*, phytophagous lepidoptera, and their predators on soybean. Environmental Entomology. 8: 334-339 pp.
- Samson, R.A. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. Studies in Mycology. 6: 80-83 pp.
- Van Huis, A. 1981. Manejo integrado de plagas en los pequeños agricultores del cultivo de maíz en Nicaragua. Publicado por H. Veenman y Zonen B.V, Wageningen. 221 pp.
- Villamizar, L; Arriero, C; Bosa F; Cotes, A. 2004. Desarrollo de preformulados a base de *Nomuraea rileyi* para el control del *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Revista Colombiana de Entomología. 30: 99-105 pp.

APÉNDICE

Cuadro 1. Porcentaje de Mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* acorde al procedimiento de infección empleado.

		Dieta Artificial					
Método	Cepas	1	2	3	4	5	Media ± E.S
Tópica	NRG1	0%	40%	0	0	0	8 ± 0.02823
	NRG1,2	10%	40%	0	10%	20%	16 ± 0.0239
	NR101	10%	20%	30%	0	0	12 ± 0.0206
Dieta	NRG1	20%	30%	10%	10%	0	14 ± 0.0182
	NRG1,2	0	60%	0	10%	0	14 ± 0.0412
	NR101	0	0%	30%	0%	0	6 ± 0.0212
Cottonete	NRG1	0	40%	0%	0%	0	8 ± 0.2829
	NRG1,2	10%	60%	20%	10%	0	20 ± 0.0370
	NR101	20%	90%	20%	10%	30%	34 ± 0.0507
Aspersión	NRG1	10%	0%	10%	10%	20%	8 ± 0.0111
	NRG1,2	0%	0%	0%	10%	0	5 ± 0.0070
	NR101	10%	0%	10%	10%	10%	8 ± 0.0070
Inmersión	NRG1	20%	0%	30%	0%	0%	10 ± 0.0223
	NRG1,2	10%	0%	70%	20%	20%	24 ± 0.0427
	NR101	30%	0%	30%	0%	0%	12 ± 0.0259

Cuadro 2. Porcentaje de Mortalidad de larvas del 3^{er} estadio según Procedimiento de infección de *Spodoptera frugiperda* desarrollado en dieta Natural.

		Dieta Natural (<i>Ricinus communis</i>)					
Método	Cepas	1	2	3	4	5	Media ± E. S
Tópica	NRG1	0%	0%	20%	0%	20%	8 ± 0.017
	NRG1,2	20%	0%	20%	0%	0%	8 ± 0.017
	NR101	0%	0%	20%	0%	20%	8 ± 0.017
Dieta	NRG1	20%	0%	20%	10%	20%	14 ± 0.014
	NRG1,2	20%	10%	10%	10%	40%	18 ± 0.020
	NR101	20%	30%	20%	20%	50%	28 ± 0.206
Cottonete	NRG1	0	0%	0%	0%	20%	4 ± 0.014
	NRG1,2	0%	0%	0%	0%	0	0
	NR101	10%	0%	0%	70%	0%	16 ± 0.048
Aspersión	NRG1	0%	0%	10%	0%	0%	2 ± 0.007
	NRG1,2	0%	0%	0%	0%	10%	2 ± 0.007
	NR101	0%	10%	0%	20%	0%	6 ± 0.014
Inmersión	NRG1	0%	10%	60%	60%	40%	34 ± 0.044
	NRG1,2	20%	70%	50%	0%	0%	28 ± 0.049
	NR101	40%	10%	70%	20%	50%	38 ± 0.037

Cuadro 3. Comparación de mortalidad entre Métodos –Cepas en Dieta Artificial

		Dieta Artificial					
CEPAS METODOS	Tópica	Dieta	Cotonette	Aspersión	Inmersión	Media± E.S	
NRG1	8%	14%	8%	10%	10%	10 ± 0.0039 a	
NRG1,2	16%	14%	20%	2%	8%	12 ± 0.01224 a	
NR10 ₁	12%	6%	36%	8%	12%	14.8 ± 0.0219 a	

C.V= 78.29111

Cuadro 4. Comparación de mortalidad entre Métodos –Cepas en Dieta Natural

		Dieta Natural (<i>Ricinus communis</i>)					
CEPAS METODOS	Tópica	Dieta	Cotonette	Aspersión	Inmersión	Media ± E.S	
NRG1	8%	14%	4%	2%	34%	12.4 ± 0.02314 a	
NRG1,2	8%	18%	0	0	28%	10.8 ± 0.02196 a	
NR101	8%	28%	16%	16%	38%	21.2 ± 0.01680 a	

C.V= 91.94509

Cuadro 5 Análisis de varianza, de la mortalidad de *Spodoptera frugiperda* en Dieta Artificial

Dieta Artificial						
Fuente	DF	SC	CM	F- Valor	Pr>F	R ²
Modelo	22	7525.76956	342.08043	2.29	0.0073	0.492436
Error	52	7756.97383	149.17257			
Total Correcto	74	15282.74339				

C.V= 78.29111

Cuadro 6 Análisis de varianza, de la mortalidad de *Spodoptera frugiperda* en Dieta Natural

Dieta Natural (<i>Ricinus communis</i>)						
Fuente	DF	SC	CM	F- Valor	Pr>F	R ²
Modelo	22	8489.21684	385.87349	2.27	0.0078	0.490414
Error	52	8821.08922	169.63633			
Total Correcto	74	17310.30606				

C.V= 91.94509