

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**



Microencapsulación de hongos entomopatógenos y su evaluación sobre
Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) en laboratorio e invernadero

Por:

FLORENCIO ESPÍNOLA ALVARADO

T E S I S

Presentada Como Requisito Parcial Para Obtener el Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México

Junio de 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

División de agronomía
Departamento de Parasitología

Microencapsulación de hongos entomopatógenos y su evaluación sobre
Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) en laboratorio e invernadero

Presentada por:

FLORENCIO ESPÍNOLA ALVARADO

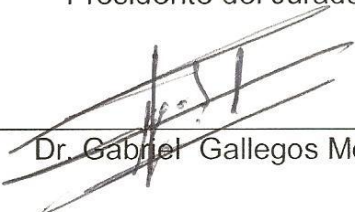
Tesis

Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial
para obtener el título de:

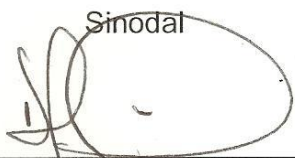
INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada

Presidente del Jurado


Dr. Gabriel Gallegos Morales

Sinodal


Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo

Sinodal


Dr. Claudio Rios Velasco

Sinodal suplente


M.C. Marcela Hernández Suárez

Coordinador de la División de Agronomía


Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo

Saltillo, Coahuila, México Coordinación
División de Agronomía

Junio de 2011

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida, la fuerza y permitirme estar aquí en este momento y terminar esta etapa tan importante de mi vida.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, la cual me abrió las puertas, y en ella encontré los conocimientos que me formaron profesionalmente Gracias!!!. "ALMA TERRA MATER".

A Dr. Gabriel Gallegos Morales, por asesorarme, guiarme y brindarme su apoyo incondicional en la realización de este proyecto de investigación.

A la M.C. Marcela Hernández Suárez, por brindarme su confianza, ayuda y compartirme sus conocimientos ya que fueron de gran ayuda, tanto en la realización de mi tesis como en mi formación profesional.

Al Dr. Francisco Daniel Hernández castillo, por su tiempo y paciencia, por los conocimientos brindados en este trabajo.

Al Dr. Claudio Ríos Velasco, Por su gran colaboración en la realización de este trabajo, por su paciencia y apoyo, por asesorarme y compartirme sus conocimientos.

A Gerardo Espínola Alvarado y Cristobal Alvarado García, por su valiosa colaboración en la realización de este proyecto.

A cada uno de mis Maestros por trasmitirme sus conocimientos y con ello formarme como un profesional, se los agradeceré por siempre.

A la empresa Agrobiológico Control S.A de C.V. Por aceptarme dentro de su equipo de trabajo, por brindarme la confianza, los conocimientos y equipo necesario para realizar mi tesis.

DEDICATORIA

A mis padres.

Gracias por su gran apoyo incondicional durante esta etapa de mi vida, por impulsarme a salir adelante a tener una profesión y sobre todo por nunca dejarme solo. Cada día que estuve lejos de ustedes los extraño, pero sé que tengo que sacrificar algunas cosas muy importantes como es estar con la familia para salir adelante y llegar a ser alguien en la vida.

J. Jesús Espínola Espínola

*Tú me diste el ejemplo, consejos y confiaste en mí, también me diste la oportunidad de estudiar y superarme para ser un profesionalista y con ello un hombre de bien, gracias **papá!!***

Ma. Estela Alvarado Romero

*Eres la persona más especial y hermosa en mi vida, gracias por darme la vida, sé que al alejarse un hijo de ti, duele en el alma y es difícil acostumbrarse a estar lejos y aun así brindarle tu apoyo incondicional, al decir que todo está bien, gracias **mamá** por tus consejos y apoyo y sobre todo por confiar en mí.*

Hermanos...

Gabriel

José Guadalupe Jesús

Andrés Gerardo Luis

José Fina

Yolanda

Hilda Estela

Ustedes son mi motor, la fuerza que me impulsan a superarme día a día, sé que si el día de hoy yo me esfuerzo por ser mejor y ser un

profesionista, con ello el día de mañana también ustedes lograrán grandes cosas.

Al Ing. José Rodríguez Cabrera (La piraña). Por brindarme sus conocimientos y consejos que me ayudaron a formarme personal y profesionalmente, por impulsarme y creer en mí, con su gran apoyo supe lo que se siente ser un ganador, siempre lo dijiste “Yo les doy las armas, es su decisión utilizarlas”. Gracias!! Pira.

A mis amigos al Ing. Juan Rubén Jaimes Cedillo, Ing. Andrés Briones Montes, Ing. Fernando Barreto Olívar, Ing. Juan Carlos Sánchez Vergara, Ing. Juliána Anzures Hernández, Ing. Paloma Santana García, Ing. José Miguel Moo Moo, y al Ing. Huri Jaimes Cedillo por estar conmigo en las buenas y en las malas y apoyarme durante el transcurso de la carrera, espero y nuestra amistad perdure por siempre.

A la M.C. Montserrat Vargas Negrete

Por su gran amor, cariño, paciencia y por compartirme su vida, y estar conmigo en los momentos difíciles brindándome su apoyo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vi
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DEL APÉNDICE.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
HIPÓTESIS.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Cultivo del Maíz.....	4
Importancia.....	4
Taxonomía.....	4
Morfología.....	5
Anatomía de la Planta.....	6
Germinación.....	6
Raíz.....	6
Tallo.....	6
Hojas.....	6
Flores.....	6
Enfermedades del maíz.....	7
Plagas del Maíz.....	8
Cogollero del Maíz <i>Spodoptera frugiperda</i>	10
Introducción y Distribución.....	10
Ubicación Taxonómica.....	10
Biología y Comportamiento.....	11
Huevo.....	11

Larva.....	11
Pupa.....	12
Adulto.....	12
Daños.....	13
Métodos de Control de <i>Spodoptera frugiperda</i>	14
Control Cultural.....	14
Resistencia vegetal.....	15
Control Químico.....	15
Control Biológico.....	16
Parasitoides.....	16
Bacterias.....	17
Virus.....	17
Nematodos.....	18
Hongos Entomopatógenos.....	18
Modo de Acción de los HEP.....	20
<i>Beauveria bassiana</i>	21
Ubicación Taxonómica.....	21
Morfología.....	22
Importancia.....	22
<i>Metarhizium anisopliae</i>	22
Ubicación Taxonómica.....	23
Morfología.....	23
Importancia.....	23
<i>Nomuraea rileyi</i>	24
Ubicación Taxonómica.....	24
Morfología.....	25
Importancia.....	25
Micoinsecticidas.....	26
Microencapsulación.....	27

MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
Ubicación del Experimento.....	29
Cría de <i>S. frugiperda</i>	29
Reproducción de los Hongos.....	30
Preparación de Medios de Cultivo.....	30
Microencapsulación de los Hongos.....	31
Evaluación de Entomopatógenos Encapsulados en Laboratorio.....	32
Suspensión de Microencapsulados.....	32
Tratamientos Empleados en los Bioensayos.....	32
Evaluación de Entomopatógenos Encapsulados en <i>S. frugiperda</i>	33
Determinación de la CL ₅₀ de Entomopatógenos Encapsulados....	34
Tratamientos Empleados en los Bioensayos.....	34
Evaluación de Entomopatógenos Encapsulados en Plantas de	
Maíz.....	35
Análisis de Datos.....	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
CONCLUSIONES.....	44
LITERATURA CITADA.....	45
APÉNDICE.....	61

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales plagas del maíz en México.....	9
Cuadro 2. Porcentaje de mortalidad de larvas de primer estadio del cogollero del maíz <i>S. frugiperda</i> causado por hongos entomopatógenos microencapsulados.....	37
Cuadro 3. Porcentaje de mortalidad de larvas de segundo estadio del cogollero del maíz <i>S. frugiperda</i> causado por hongos entomopatógenos microencapsulados.....	38
Cuadro 4. Porcentaje de mortalidad de larvas de tercer estadio del cogollero del maíz <i>S. frugiperda</i> causado por hongos entomopatógenos microencapsulados.....	39
Cuadro 5. Porcentaje de mortalidad de larvas de segundo estadio del gusano elotero, <i>Helicoverpa zea</i> causado por hongos entomopatógenos microencapsulados.....	40
Cuadro 6. Concentración letal media CL50 y límites fiduciales de hongos entomopatógenos microencapsulados sobre larvas de primer estadio de <i>Spodoptera frugiperda</i>	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cortes de hojas y cogollo de maíz.....	33
Figura 2. Aspersion de hongos.....	33
Figura 3. Larvas de gusano cogollero <i>S. frugiperda</i> micozadas por <i>N. rileyi</i> , inoculadas en A) segundo estadio y B) tercer estadio.....	39
Figura 4. Líneas de respuesta concentración-mortalidad de <i>N. rileyi</i> y Nr-Bb- Ma (mezcla) encapsulados sobre larvas neonatas de <i>S. frugiperda</i> a los 9 días de exposición.....	42

ÍNDICE DEL APÉNDICE

Cuadro 1. Análisis de varianza, de la mortalidad en larvas de primer estadio de <i>Spodoptera frugiperda</i>	61
Cuadro 2. Análisis de varianza, de la mortalidad en larvas de segundo estadio de <i>Spodoptera frugiperda</i>	61
Cuadro 3. Análisis de varianza, de la mortalidad en larvas de tercer estadio de <i>Spodoptera frugiperda</i>	61
Cuadro 4. Datos obtenidos de bioensayos en laboratorio sobre larvas de <i>S. frugiperda</i> de primer estadio.....	62
Cuadro 5. Datos obtenidos de bioensayos en laboratorio sobre larvas de <i>S. frugiperda</i> de segundo estadio.....	62
Cuadro 6. Datos obtenidos de bioensayos en laboratorio sobre larvas de <i>S. frugiperda</i> de tercer estadio.....	63
Cuadro 7. Datos obtenidos de bioensayos en laboratorio sobre larvas de <i>H. zea</i> de segundo estadio.....	63
Cuadro 8. Datos obtenidos de bioensayos en laboratorio, de <i>N. rileyi</i> sobre larvas de neonatas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	64
Cuadro 9. Datos obtenidos de bioensayos en laboratorio, de (Nr-Bb-Ma) sobre larvas neonatas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	64

INTRODUCCIÓN

El maíz, es originario de México, siendo el alimento principal de los mexicanos. Los antiguos mexicanos crearon razas de maíz para poder cultivarlas en zonas con lluvias escasas, lluvias medianas y hasta con lluvias muy abundantes. La totalidad de los maíces crece en buenas tierras, pero algunos germinan y producen aun en suelos pedregosos, pobres y poco profundos, demostrando así su nobleza, al igual hay maíces adaptados a tierras bajas, cercanas a nivel del mar y otros a las zonas altas, cercanas a los 3000 m de altitud, también hay precoces medianos y tardíos. Las razas y variedades nativas de maíz, han dado origen a las nuevas variedades e híbridos (Lesur, 2005).

El maíz es uno de los tres cereales de mayor importancia en el mundo, ya que tiene un amplio rango de adaptación por sus características muy particulares, también por su diverso uso en la alimentación tanto humana como animal (Ortega, 1987).

El maíz es por mucho el cultivo agrícola más importante de México, desde el punto de vista alimentario, industrial, político y social. Analizando al maíz en relación con el resto de los cereales que se producen en México (trigo, sorgo, cebada, arroz y avena, principalmente), en cuanto a la evolución del volumen de la producción de maíz, la tasa media anual de crecimiento (TMAC) de 1996 a 2006 fue de 2.0%, no obstante los decrementos registrados en 2002 y 2005 en la producción obtenida de -4.1 y -10.8%, respectivamente (SIAP-SAGARPA, 2006).

Entre los insectos más dañinos tenemos a los Lepidópteros (gusano cogollero, gusano elotero, gusano soldado, etc.), que son los más severos a nivel mundial, seguidos de los insectos del suelo, como la gallina ciega y en tercer lugar los vectores de patógenos y succionadores de sabia como pulgones y chicharritas (Ortega, 1987).

El control de plagas con pesticidas 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 químicos no siempre dan buenos resultados, por lo que, se presta hoy día mayor importancia a una agricultura más biológica. Los problemas de insectos requieren cada vez mejores y mayores prácticas de control, ya sean que estas incluyan el mejoramiento genético del cultivo, el uso de parasitoides, depredadores, microorganismos entomopatógenos o insecticidas (Jugenheimer, 1981). Rodríguez (1984) hace referencia que otra alternativa con mucho futuro para el control de plagas es el método biológico que se define como la acción natural o inducida de parasitoides, depredadores y patógenos para reducir la densidad de población de organismos plaga.

Según Estrada (1986), dentro de los entomopatógenos los hongos en general tienen la ventaja de infectar externamente, penetrando por la cutícula del insecto; además de tener un amplio rango de hospederos.

La microencapsulación de organismos ha sido considerada como una alternativa de inmovilización de células a fin de que éstas puedan ejercer sus funciones en forma gradual (Bashan *et al.*, 2002).

Durante la década pasada se ha impulsado en la agricultura el uso de polímeros naturales como agentes inoculantes de bacterias promotoras de crecimiento. La microencapsulación con biopolímeros para proteger a los microorganismos de diferentes factores ambientales como el estrés y permite a la célula, continuar con su desarrollo y metabolismo; estos microorganismos son liberados gradualmente cuando el biopolímero es degradado por la humedad y el pH del suelo. El alginato producido por *Macrocystis pyrifera* es el más comúnmente usado para la encapsulación de células por su gran estabilidad. Pueden ser almacenados a temperatura ambiente por periodos prolongados y manipularse fácilmente (Yabur *et al.*, 2006).

Objetivos

Elaborar productos biológicos a base de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Nomuraea rileyi* en una presentación sólida (microencapsulados) usando como medio solidificante el polímero alginato.

Determinar la capacidad entomopatógena de los microencapsulados mediante bioensayos de actividad sobre *Spodoptera frugiperda* en dieta natural.

Evaluar microencapsulados por bioensayos en plantas de maíz infestadas con el gusano cogollero en invernadero.

Hipótesis

Ho: La eficiencia patogénica de los hongos entomopatógenos microencapsulados es superior a las formulaciones fúngicas convencionales.

Ha: Los microencapsulados de entomopatógenos tienen la misma eficiencia patogénica que las formulaciones fúngicas convencionales.

Palabras clave: Control Biológico, Entomopatógenos, Microencapsulación, Alginato.

REVISIÓN DE LITERATURA

Cultivo del Maíz

Importancia

México es el cuarto productor de maíz en el mundo, pero también es un importante consumidor del mismo. Aunque se cubre prácticamente la totalidad de la demanda del maíz blanco con la producción nacional, el país es deficitario en maíz amarillo, por lo cual se tienen requerimientos de importación superiores a los 5 millones de ton promedio anual (SIAP-SAGARPA, 2006). Rebolledo (1992), menciona que aproximadamente un 51% de la superficie nacional destinada a la agricultura se dedica al cultivo del maíz. En nuestro país su uso principal ha sido como alimento, tanto humano como de aves y ganado, ya que forma parte de la dieta y cultura de los mexicanos (Sánchez *et al.*, 1994).

El maíz es el cultivo más importante de México, desde el punto de vista alimentario, político y social. Este grano se produce en dos ciclos productivos: primavera-verano y otoño-invierno, bajo diversas condiciones agroclimáticas, de humedad, temporal y riego. Durante el periodo 1996-2006 se produjo un promedio anual de 19.3 millones de ton de maíz, que incluye maíz blanco, amarillo y otros, con un valor promedio anual de 29,090 millones de pesos corrientes. La tasa media anual de crecimiento (TMAC) del volumen de producción fue equivalente a 2.0%; por régimen hídrico, fue de 4.4% bajo condiciones de riego y de 0.4% en temporal (SIAP-SAGARPA, 2006).

Taxonomía

El maíz (*Zea mays* L.) es una gramínea anual originaria de América. Actualmente, es el cereal con mayor volumen de producción en el mundo, superando al trigo y arroz (FAO, 2008).

Ubicación taxonómica del maíz de acuerdo al USDA-NRCS (2009)

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Cyperales

Familia: Poaceae

Género: *Zea*

Especie: *Zea mays* L.

Morfología

La planta del maíz es de porte robusto, de fácil desarrollo y producción anual; el tallo es simple, erecto, de elevada longitud pudiendo alcanzar los 4 m de altura, es robusto y sin ramificaciones, parecido al de una caña, no presenta entrenudos y si una médula esponjosa, si se realiza un corte transversal, con inflorescencia masculina y femenina separada dentro de la misma planta; la inflorescencia masculina presenta una panícula (vulgarmente denominada espigón o penacho) de coloración amarilla que posee una cantidad muy elevada de polen en el orden de 20 a 25 millones de granos, en cada florecilla que compone la panícula se presentan 3 estambres donde se desarrolla el polen; la inflorescencia femenina marca un menor contenido en granos de polen, alrededor de los 800 ó 1000 granos y se forman en unas estructuras vegetativas denominadas espádices que se disponen de forma lateral; las hojas son largas, de gran tamaño, lanceoladas, alternas, paralelinervias; se encuentran abrazadas al tallo y por el haz presentan vellosidades, los extremos de las hojas son muy afilados y cortantes; las raíces son fasciculadas y su misión es la de aportar un perfecto anclaje a la planta, en algunos casos sobresalen unos nudos de las raíces a nivel del suelo (SIAP-SAGARPA, 2010).

Anatomía de la planta. De acuerdo a Lesur (2005).

Germinación

La semilla, al entrar en contacto con la humedad del suelo, empieza la imbibición de agua, comienza a hincharse y produce cambios químicos que activan al embrión, con lo que la primera raíz se alarga y sale en dos o tres días.

Raíz

La planta tiene cuatro clases de raíces: 1) raíces seminales que se originan en el embrión y suministran nutrientes en las primeras dos semanas, para luego dejar de funcionar, 2) raíces definitivas; alcanzan hasta dos o tres metros de profundidad, fijan la planta al suelo y mediante ellas se nutre la planta durante todo el ciclo vegetativo, 3) raíces de soporte se originan en los nudos, sobre la superficie del suelo, sirven para favorecer una mayor estabilidad de la planta, tomar algunos nutrientes y agua del rocío y fortalecer el arraigo de la planta contra los problemas del acame, 4) raíces aéreas, estas no alcanzan a llegar al suelo.

Tallo

El tallo de la planta del maíz es leñoso y cilíndrico, con una cantidad de nudos que varía entre 8 y 25, con un promedio de 16.

Hojas

Son alternas y sésiles, variando en número dependiendo de la variedad entre 8 a 25, son alargadas y forman un cilindro o vaina alrededor del entrenudo, pero con los extremos desunidos. Su color es verde pero las hay ligeramente rayadas de blanco o de púrpura.

Flores

El maíz tiene flores masculinas y femeninas en partes separadas de la misma planta (monoica). Las flores masculinas constituyen la espiga que produce el polen,

en tanto que las femeninas están dentro de la mazorca que surge como una rama lateral modificada, con las flores cubiertas por las hojas tiernas del jolote, del que sobresalen los estigmas o estilos, receptores del polen. Esta disposición en la inflorescencia hace que la polinización sea cruzada.

Enfermedades del Maíz

Según Rodríguez y De León (2008), de acuerdo con varios reportes en diferentes cultivos y localidades las enfermedades llegan a causar de 10 a 12% de pérdida en la producción de un cultivo, pero existen localidades específicas en las que son mayores. Se han reportado aproximadamente 125 enfermedades para el cultivo del maíz. Dentro de las principales enfermedades presentes en las diferentes regiones maiceras reportan tres tizones foliares reportados en maíz, dos de ellos son importantes en México: el tizón por *Helminthosporium turcicum* y el tizón por *H. maydis*. Como en el caso anterior existen tres royas afectando al maíz, de las cuales sólo dos son importantes en México, la roya común *Puccinia sorghi* Schwein y la roya *Puccinia pylosa* Under. El follaje es atacado por un complejo de mildews, ocasionado por los patógenos: *Peronosclerospora* spp., *Sclerospora graminicola* y *Sclerophthora* spp. También es atacado por virus, como es el caso del complejo mosaico de la caña de azúcar, producido por los patógenos: Mosaico del enanismo del maíz (MDMV), mosaico de la caña de azúcar (SCMV), mosaico de pasto Johnson (JGMV) y mosaico del sorgo (SrMV). Entre otros virus tenemos al virus del rayado fino (MRF Marafivirus), también se reporta un fitoplasma y un espiroplasma ocasionados por *Phytoplasma* sp., y *Spiroplasma kunkelii* respectivamente. Existen dos pudriciones importantes de tallo y mazorca causadas por hongos del género *Gibberella* (anamorfo *Fusarium* spp.), entre las cuales las dos especies más conocidas son *G. zae* y *G. fujikuroi* respectivamente. Estas enfermedades se presentan en la mazorca de la misma manera.

Valdéz *et al.* (2004) reportan que en América Latina hay muchos virus que atacan el cultivo, siendo uno de los más importantes, el virus del rayado fino del maíz (MRFV), descrito y caracterizado por Gámez (1969, 1983). Este virus es transmitido exclusivamente por el cicadélido *Dalbulus maidis*, y ocasiona pérdidas de 40 a 50% en el peso de las mazorcas en cultivares criollos adaptados a las condiciones locales en Mesoamérica.

Plagas del Maíz

Cisneros (1994) menciona que una limitante para la producción de cultivos alimenticios anuales la constituyen las plagas, que pueden dañarlos en todos los estados de desarrollo. Muchas de las especies de insectos que se alimentan sobre plantas pueden entrar en competencia directa con el hombre haciendo medidas necesarias de prevención y control. Los lepidópteros en estado larval generalmente se alimentan del follaje y otras partes de la planta sobre la que viven, tanto externa como internamente, otros se han adaptado a vivir sobre productos de la planta como semillas y frutos. Al igual Garza (1992) señala que muchos de ellos están restringidos a una región geográfica y frecuentemente también a una sola planta hospedera pero otros, probablemente la mayoría, presentan un amplio espectro de plantas hospederas y su distribución geográfica no está localizada; tal es el caso de los géneros *Diatraea* (Lepidoptera: Pyralidae), *Heliiothis* y *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae).

Se estima que los insectos nocivos del maíz provocan pérdidas promedio de 30% en México, aunque en ciertas condiciones los daños son tan severos que las pérdidas pueden ser totales, las cuales pueden afectar el cultivo en sus diferentes etapas fenológicas (Rodríguez y De León, 2008). En el cuadro 1, se enlistan los insectos plaga que comúnmente atacan al maíz en México.

Cuadro 1. Principales plagas del maíz en México, según Kumul (1983); McGregor y Gutiérrez (1983); Rodríguez y De León (2008).

Hábitat	Nombre común	Nombre científico	Orden y familia		
Plagas de suelo	Gallina ciega	<i>Phyllophaga</i> spp. <i>Anomala</i> spp.	Coleóptera Scarabaeidae		
	Gusano de alambre	<i>Agriotes</i> spp. <i>Melanotus</i> <i>Diabrotica longicornis</i> (Say)	Coleóptera Elateridae		
	Gusano doradillas	alfilerillo, <i>D. balteata</i> LeConte <i>D. undecimpunctata</i> Mannerheim <i>D. virgifera</i> LeConte <i>D. howardi</i> Barber	Coleóptera Chrysomelidae		
	Gusano trozador	<i>Agrotis</i> spp. <i>Feltia</i> spp. <i>Chorizagrotis</i> spp. <i>Peridroma</i> spp. <i>Prodenia</i> spp. <i>Euxoa</i> spp.	Lepidóptera Noctuidae		
	Hormiga	<i>Solenopsis</i> spp. <i>Atta</i> spp.	Hymenóptera Formicidae		
	Plagas del tallo	Barrenador del tallo	<i>Diatraea sacharalis</i> (Fabricius) <i>D. conciderata</i> Heinrich <i>D. magnifactella</i> Dyar <i>Zeadiatraea lineolata</i> Wlk. <i>Z. granciosella</i> (Dyar <i>Z. muellenrella</i> (Dyar y Heinrich)	Lepidóptera Pyralidae	
			Picudo del maíz	<i>Nicentrites testaceipes</i> (Champ.)	Coleóptera Curculionidae
			Picudo del cogollo	<i>Geraeus senilis</i> (Gyllenhal)	
			Pulgón del cogollo	<i>Rhopalosiphum maidis</i> (Fitch) <i>R. padi</i> (Linn)	Hemiptera Aphididae
			Gusano cogollero	<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)	Lepidóptera Noctuidae
Plagas del follaje, flores y fruto	Gusano soldado	<i>Pseudaltia unipucta</i> (haworth)	Lepidóptera Noctuidae		
	Gusano peludo	<i>Estigmene acraea</i> (Drury)	Lepidóptera Artiidae		
	Gusano saltarín	<i>Elasmopalpus lignosellus</i> (Zeller)	Lepidóptera Pyralidae		
	Gusano elotero	<i>Helicoverpa zea</i> (Boddie)	Lepidóptera Noctuidae		
	Frailecillo	<i>Macrodactylus mexicanus</i> (Burm) <i>M. nigripes</i> (Bates) <i>M. virens</i> (Bates)	Coleóptera Scarabaeidae		
	Chapulines, langostas	<i>Brachystola</i> spp. <i>Melanoplus</i> spp. <i>Schistocerca</i> spp.	Orthóptera Acrididae		
	Trips	<i>Frankliniella</i> spp.	Thysanoptera Thripidae		
	Chicharritas	<i>Dalbulus maidis</i> (Del y Wolk). <i>D. elimatus</i> (Ball) <i>D. guevarai</i> (Del)	Hemíptera Cicadellidae		
	Araña roja	<i>Oligonychus mexicanus</i> (McGregor y Ortega) <i>Tetranychus</i> spp.	Acarina Tetranychidae		

Dentro de las plagas antes mencionadas destaca el gusano cogollero del maíz *S. frugiperda* (J. E. Smith) siendo la plaga más voraz y dañina del cultivo del maíz (Rodríguez y De León, 2008).

Cogollero del Maíz *Spodoptera frugiperda*

Este lepidóptero fue 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 remplazo a *Laphygma* por *Spodoptera* (Severini, 1985).

Introducción y Distribución

El gusano cogollero es nativo de las regiones tropicales del hemisferio occidental de los Estados Unidos hasta Argentina. El gusano cogollero se dispersa a grandes distancias anualmente durante los meses de verano. Sin embargo, como regulares y graves plagas, se encuentra en todo los estados del sureste (Capinera, 2008). Según Rodríguez y De León (2008), esta plaga se encuentra ampliamente distribuida en todas las regiones agrícolas tropicales y subtropicales del continente americano. En México se localiza prácticamente en todas las regiones donde se cultiva maíz, aunque sus daños son más severos en el trópico y subtrópico.

Ubicación Taxonómica

Ubicación taxonómica según Borror *et al.* (1989)

Clase: Insecta

Orden: Lepidóptera

Familia: Noctuidae

Género: *Spodoptera*

Especie: *S. frugiperda* (J. E. Smith)

Biología y Comportamiento

Huevo

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. Las larvas nacen a los tres días o menos, cuando la temperatura es elevada ($> 25^{\circ} \text{C}$). (Luginbill, 1928). El huevo es en forma de cúpula, la base es plana y el huevo se curva hacia arriba en un punto ampliamente redondeado en el ápice. El huevo mide unos 0.4 mm de diámetro y 0.3 mm de altura. El número de huevos por masa varía considerablemente, pero a menudo 100 a 200, y la producción total de huevos por hembra, de un promedio de 1500 con un máximo de 2000. La etapa de huevo dura sólo dos o tres días durante los meses de verano (Capinera, 2008).

Larva

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), más tarde se trasladan a diferentes partes de la planta, evitando así la competencia por el alimento y el canibalismo, a partir del tercer estadio se introducen en el cogollo, haciendo perforaciones que son apreciados cuando la hoja se desvaina. 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 (Luginbill, 1928; Bruner y Deschappelles, 1965).

Capinera (2008) señala que por lo general, son seis estadios en el gusano cogollero. El ancho de la cápsula de la región cefálica es de 0.35, 0.45, 0.75, 1.3, 2.0, y 2.6 mm, respectivamente, para estadios 1-6. Las larvas puede llegar a medir 1.7, 3.5, 6.4, 10.0, 17.2, y 34.2 mm, respectivamente, durante los seis estadios. Las larvas jóvenes son de color verdoso con la cabeza negra, la cabeza cambia a

anaranjado en el segundo instar. En el segundo, pero en particular el tercer estadio, la superficie dorsal del cuerpo se convierte en marrón, y comienzan a formarse líneas blancas laterales. En el cuarto al sexto estadios la cabeza es de color marrón rojizo, con manchas blancas, y el cuerpo subdorsal blanco y las líneas laterales. Puntos elevados se producen en el dorso del cuerpo, por lo general son de color oscuro, y tienen espinas. Las larvas tienden a ocultarse en el momento más brillante y caluroso del día. La duración de la fase larvaria tiende a ser alrededor de 14 días durante el verano y 30 días durante el invierno.

El tiempo medio de desarrollo determinado fue de 3.3, 1.7, 1.5, 1.5, 2.0, y 3.7 días para los estadios 1 a 6, respectivamente, cuando las larvas fueron criadas a 25 °C (Pitre y Hogg, 1983). 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 estadios (Blahutiak, 1970; Piedra, 1974; Pérez *et al.*, 1994).

Pupa

La pupación tiene lugar normalmente en el suelo, a una profundidad de 2-8 cm. La larva construye un capullo suelto, de forma oval y de 20 a 30 mm de longitud, mediante la vinculación de las partículas del suelo, junto con la seda. La pupa es de color marrón rojizo, y mide 14 a 18 mm de longitud y alrededor de 4.5 mm de ancho. La duración de la etapa de pupa es de ocho a nueve días durante el verano (Capinera, 2008).

Adulto

El adulto de *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 un color llamativo en las alas delanteras, las traseras son blancas (Luginbill, 1928).

El ciclo de vida oscila entre los 19 y 48 días, lo que está en relación con la temperatura de las siguientes fases; a temperaturas elevadas el ciclo se acorta a una

temperatura de 26.5 °C las hembras ponen 1216 huevos, a 25 °C 944 y a 30 °C se reduce a 386, el período de oviposición de los adultos a 30 °C es de 4 y 3 días para las temperaturas de 20, 25 y 26.5 °C. 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 (Jassic y Reines, 1974; Piedra, 1974).

Fernández (1991) reporta que 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 distancias relativamente grandes; pueden secretar hilos de ceda 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, ésta depende de la textura del suelo, la humedad y la temperatura. En la cavidad la larva se transforma en pupa y luego emerge como adulto a la superficie del suelo.

Daños

Spodoptera frugiperda, es considerado la plaga más importante del maíz en muchas regiones de América (García *et al.*, 1999), Por su voracidad y daños ocasionados al cultivo. Los gusanos se localizan en el cogollo de las plantas, en donde se alimentan de las hojas en formación y las cuales al desarrollarse quedan perforadas y rasgadas; el ataque temprano causa la muerte de plántulas o el retraso en el desarrollo de la planta (Rodríguez y De León, 2008).

El gusano cogollero ataca alrededor de 60 especies de plantas (Andrews, 1988). En maíz este insecto es capaz de disminuir hasta el 90% de rendimiento, si no se controla oportunamente (Banda, 1981). En México, el maíz es la base de la alimentación y afecta económicamente más al rendimiento; si la planta es atacada cuando tiene entre 40 y 60 cm de altura y una edad menor a los 29 días (Banda *et al.*, 1981).

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. (Chávez, 1990; Aponte y Morillo, 1987).

Métodos de Control de *Spodoptera frugiperda*

Restrepo (1988) señala que el manejo integrado de plagas (MIP) plantea el uso racional de métodos culturales, biológicos y químicos para el control de insectos, ácaros y otras plagas. En el MIP el control biológico es primordial, pero se puede justificar o “integrar” el uso adecuado de productos químicos sólo cuando la densidad de la plaga es de tal magnitud que sobrepasa el umbral de daño económico y a la vez, la presencia de enemigos naturales es escasa. Al igual Saad (1999) reporta que entre todas las técnicas de control del MIP, el control biológico es el que ha tenido el mayor desarrollo en México.

Control Cultural

Según Rodríguez y De León (2008), para un buen control de *S. frugiperda* es recomendable, realizar siembras tempranas y en general tener un buen manejo del cultivo. Mitchell (1978) cita que la práctica cultural más importante, empleada ampliamente en los estados del sur de USA, es la siembra temprana y/o variedades de maduración temprana. La cosecha temprana permite que muchas mazorcas de maíz escapen de la mayor densidad de gusano que se desarrolla más adelante en la temporada. All (1988) menciona que la labranza reducida parece tener poco efecto sobre las poblaciones de gusano cogollero. Posteriormente Roberts y All (1993) reportan que se ha observado que retrasa la invasión por las palomillas en campos con extensos residuos de rastrojos, retrasado y reduciendo la necesidad de supresión química.

Resistencia Vegetal

La resistencia parcial está presente en algunas variedades de maíz dulce, pero es insuficiente para una protección completa (Capinera, 2008).

Madriz (1999) menciona que las técnicas biotecnológicas modernas representan nuevas alternativas para el control de enfermedades virales. Algunas de estas estrategias se basan en la expresión *in planta*, de genes virales o de secuencias derivadas del patógeno, mediante técnicas de ingeniería genética y de transformación genética.

Control Químico

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 ha sido baja, 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).

Adamczyk (1999) reporta que larvas de *S. frugiperda* de los estadios primero y quinto alimentadas con hojas y flores blancas de algodón tratadas con chlorfenapyr, emamectin benzoate, L-cyhalothrin, methoxyfenozide, spinosad, y thiodicarb, estos fueron susceptibles a dichos insecticidas.

López *et al.* (2010) reportan a spinoteram como una alternativa sustentable y viable para el manejo de *S. frugiperda*. El CESAVEG (2008), reporta en la campaña, “manejo fitosanitario del maíz”, la autorización del uso de cipermetrina, clorpirifos etil, diazinon y endosulfan para el control de esta plaga en el estado de Guanajuato. Al respecto López *et al.* (2010) reportan a *S. frugiperda* mostrando cierta tolerancia hacia clorpirifos etil (Disparo[®]) y el plaguicida atentó significativamente sobre poblaciones de *Chrysoperla* sp, también mencionan que un compuesto fitotóxico (Floxina-B) mostró efectividad en la supresión de *S. frugiperda* y fue benévolo con la

fauna benéfica, sin embargo ocasionó síntomas severos de fitotoxicidad a la planta de maíz.

Su control con insecticidas químicos ha ocasionado que esta especie adquiera resistencia, se eliminen a sus enemigos naturales y afecte el medio ambiente (Yu, 1991; Pimentel, 1995).

Control Biológico

Como control biológico se entiende la manipulación intencional de las poblaciones de los enemigos naturales de los insectos plaga, con el fin de limitar sus poblaciones. A estos organismos se les llama agentes de control y entre ellos se encuentran insectos depredadores y parásitos, así como microorganismos patógenos de insectos (Asaff *et al.*, 2002). Los diferentes métodos de control biológico constituyen un componente sustentable y ambientalmente seguro del moderno manejo de plagas; son una alternativa deseable, que se ha ido incrementando y por ende el uso de los plaguicidas químicos se ha reducido (Waage, 1991).

Parasitoides

Rodríguez y Arredondo (2007) mencionan que los insectos parasitoides son una clase especial de depredador que generalmente es del mismo tamaño o tamaño parecido que el organismo que ataca, también se caracterizan porque se desarrollan dentro o sobre un organismo, el cual casi siempre muere al ser atacado. El estadio larvario de estos organismos es parasítico, mientras que los adultos son de vida libre y activos para buscar a los organismos que parasitan (huésped).

En nuestro país se han hecho varios estudios sobre diversidad de parasitoides, para los estados de Michoacán, Colima, Jalisco y Tamaulipas. Molina *et al.* (2001) reportan a 11 especies de parasitoides atacando a larvas de *S. frugiperda* representados en tres familias: Ichneumonidae, Braconidae y Eulophidae, alcanzando una tasa de parasitismo de 11.3%. Por otra parte Molina *et al.* (2004) en los estados de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán y Veracruz reportan a 13 géneros de parasitoides himenópteros, representando a tres familias: Braconidae,

Ichneumonidae y Eulophidae alcanzando una tasa de parasitismo de 13.8%. Bahena *et al.* (2010) reporta a estas tres familias para el centro del país.

Además de las antes mencionadas Ríos *et al.* (2009) reportan para Buenavista Coahuila, la presencia del Orden Díptera específicamente de la familia Tachinidae, también Ávila *et al.* (2010) reporta a *Archytas* sp. (Diptera: Tachinidae) en Tamaulipas. Al respecto Jaimes *et al.* (2009) reportan a Tachinidae y *Euplectrus* spp., parasitando a *S. frugiperda* en zacate buffel, en el estado de Nuevo León.

Bacterias

Se conocen aproximadamente 90 especies de bacterias causantes de enfermedades infecciosas en los insectos, de las cuales sólo algunas pocas tienen un alto potencial como agentes de control biológico (Cloutier y Cloutier, 1992).

Una de las alternativas más ampliamente estudiadas para el control biológico es la utilización de *Bacillus thuringiensis*, hoy en día *B. thuringiensis* es el bioinsecticida más utilizado a nivel mundial (Taméz *et al.*, 2005). Serrano *et al.* (2010) reportan que *S. frugiperda* es susceptible a aislados de *B. thuringiensis*. Al igual López *et al.* (2010) en estudios realizados en maíz bajo régimen de riego, reportan a *B. thuringiensis* como una alternativa viable y sustentable para el manejo de esta plaga.

Virus

Del Rincón (2007) menciona que un grupo importante como agentes de control biológico, lo representan los virus entomopatógenos, particularmente los baculovirus, los cuales son los más diversos y se han aislado de manera exclusiva de insectos, principalmente de los órdenes; Lepidóptera, Hymenóptera y Coleóptera. No obstante, la diversidad de virus entomopatógenos es amplia y cada familia en lo particular posee características únicas, que en un momento dado y para una plaga en particular, podrían ser efectivos en el control de la misma.

El nucleopoliedrovirus (NPV) aislado de *S. frugiperda* ha sido reportado como uno de los virus más prevalentes en poblaciones naturales de este insecto por Herniöu *et al.* (2003) y Rios *et al.* (2009) en pruebas de laboratorio, reportando que

cepas de nucleopoliedrovirus aisladas de *Spodoptera frugiperda*, son eficientes para causar niveles de mortalidad considerables en poblaciones de las larvas de gusano cogollero. Larvas neonatas de *S. frugiperda* alimentadas con maíz y tratadas con cuerpos de oclusión del nucleopoliedrovirus aislado de *S. frugiperda*, mezclados con diferentes formulados de polvos humectables, fueron susceptibles a las formulaciones obteniendo valores de mortalidad hasta de 96.46%, en un estudio realizado en condiciones de invernadero (Rios *et al.*, 2010).

Nematodos

Sotelo *et al.* (2009) reportan nematodos *Heterorhabditis* sp., causando una mortalidad de 100% sobre *S. frugiperda*, en pruebas de laboratorio. Al respecto Molina *et al.* (2003) reportan a nematodos mermítidos parasitando larvas de *S. frugiperda* en los estados de Nayarit y Veracruz, representando un 14.21% del total de la mortalidad de las larvas. Lezama (1993) reporta al nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* sobre *S. frugiperda* con una concentración letal CL_{50} de 13 nematodos por larva y a *Hexameris* sp, *Steinernema feltiae* y *Noctuidonema guyanense* como enemigos naturales del gusano cogollero.

Hongos Entomopatógenos

El control biológico con microorganismos entomopatógenos es considerado como una alternativa en Programas de Manejo Integrado (Gardner *et al.*, 1984). Dentro de los grupos patógenos que existen para control microbial se ha dicho que los hongos son los de mayor futuro; ya que a diferencia de los virus o bacterias no necesitan ser ingeridos por el insecto para ser infectivos, si no que matan al hospedero atacándolo tan solo por contacto (Estrada, 1986).

Según Carrillo y Blanco (2009), la utilización de hongos entomopatógenos para el control biológico es una alternativa viable debido a la especificidad sobre sus huéspedes, baja o nula patogenicidad sobre la fauna benéfica, insectos nativos, mínima alteración del ecosistema, además de no afectar ni a los mamíferos ni a los peces.

En los últimos años, ha surgido gran interés en el uso de hongos entomopatógenos (HEP) como agentes de control biológico, habiéndose alcanzado un avance significativo en el desarrollo y manufactura de estos agentes. Los HEP tienen la capacidad de infectar activamente una gran diversidad de insectos; están ampliamente distribuidos en diferentes ecosistemas por lo que se pueden utilizar para el control de plagas de insectos, siendo inocuos para animales de sangre caliente, plantas y demás componentes del ecosistema. Además, los HEP tienen la capacidad de desarrollar epizootias, definida como enfermedades que se extienden a una o varias especies dentro de una región o país, con carácter transitorio, en las poblaciones de insectos plaga (Jackson *et al.*, 1997). Los hongos tienen algunas ventajas únicas entre los entomopatógenos ya que son capaces de infectar al hospedero, por contacto y adhesión de las esporas a las paredes bucales, membranales, intersegmentales o a través de los espiráculos, por lo que la ingestión del microorganismo es innecesaria (Hajek y St Leger, 1994; Pucheta *et al.*, 2006). Hasta el momento se han descrito más de 750 especies de hongos entomopatógenos y el aislamiento de nuevas cepas continúa. Dentro de los más utilizados a nivel mundial se encuentran *Metarhizium anisopliae* (33.9%), *Beauveria bassiana* (33.9%), *Paecilomyces fumosoroseus* (5.8%) y *Beauveria brongniartii* (4.1%) (De Faria y Wraight, 2007).

Muchas de estas especies tienen un amplio rango de hospederos y son patogénicas de diferentes órdenes de insectos como: Lepidóptera, Coleóptera o Hemíptera. Como ejemplos se pueden mencionar *Metarhizium anisopliae*, que ataca ortópteros y hemípteros, en general, *B. bassiana* (coleópteros, lepidópteros y dípteros) los cuales, junto con otros Deuteromycetos, tienen gran potencial como agentes de control biológico de plagas (Zimmerman, 1986).

Se establece así que los hongos son potencialmente los más versátiles entomopatógenos, siendo algunos productores de toxinas, lo que les provee de un potencial para dañar rápidamente; sin embargo, usualmente son patógenos de acción lenta. Estos hongos infectan huevos, larvas, ninfas, pupas o adultos y la infección puede ocurrir después de la germinación de la espora dentro de los intestinos del hospedero o en la superficie de la cutícula (Hajek y St Leger, 1994).

Los hongos entomopatógenos representan una alternativa para el manejo de *S. frugiperda*, entre ellos destacan *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp., *Verticillium* sp., y *Nomuraea rileyi*, los cuales actúan por contacto, invadiendo el cuerpo del insecto y causando la muerte (León y Pulido, 1991).

Modo de Acción de los HEP

El desarrollo de la enfermedad en el insecto está dividido en tres fases: (1) adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto, (2) penetración en el hemocele y (3) desarrollo del hongo, que generalmente resulta en la muerte del insecto (Telles, 2009). Los HEP inician su proceso infectivo en los insectos hospederos cuando las esporas conidias son retenidas por contacto en la superficie del integumento, y se inicia la asociación patógeno-hospedero con la formación del tubo germinativo, dando lugar a la excreción de enzimas hidrolíticas que degradan la cutícula y proporcionan a su vez nutrientes al hongo (St Leger *et al.*, 1986b). Estas enzimas coadyuvan con el proceso de penetración por presión mecánica iniciado por el apresorio, el cual es una estructura especializada formada en el tubo germinativo (López y Claugher, 1990)., que rastrea y reconoce la superficie del insecto para la localización de sitios receptores, habilitando a la hifa para la penetración de la cutícula (Riquelme *et al.*, 1998). El apresorio además de servir de anclaje de la espora, ejerce una presión hacia el interior del insecto (Pucheta *et al.*, 2006)., donde desarrolla cuerpos hifales, que se diseminan a través del hemocele e invaden tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi y hemocitos, ocasionando la muerte, el hongo inicia un crecimiento micelial e invade todos los órganos del hospedero.

Finalmente las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie, donde en condiciones ambientales apropiadas inician la formación de nuevas esporas (Hajek y St Leger, 1994; Pucheta *et al.*, 2006). Como se describe anteriormente, estos HEP poseen un conjunto de mecanismos que les permite penetrar y asimilar los materiales del hospedero, y a la vez superar los mecanismos de resistencia. Las enzimas degradadoras de cutícula destruyen o modifican la integridad estructural del hospedero, inhiben sus procesos selectivos, e interfieren con su sistema regulatorio (Hajek y St Leger, 1994). Durante la

penetración del hongo desde la cutícula del insecto hasta el hemocele, la hifa queda inmersa en proteínas, quitina, lípidos, melanina, difenoles y carbohidratos, ya que el insecto activa su sistema inmune a través de procesos de melanización, esclerotización, fagocitosis, nodulación y encapsulamiento (Pucheta *et al.*, 2006; Feldhaar y Gross, 2008). La mayoría de los tejidos bajo las estructuras cuticulares son inmunológicamente activos y pueden expresar efectores antimicrobianos, incluyendo varios péptidos y especies reactivas de oxígeno, permitiéndole una eficiente respuesta sistémica inmune (Feldharr y Gross, 2008).

Beauveria bassiana

Méndez (1990) menciona que existen muchos reportes de incidencia natural de *B. bassiana* causando epizootias que varían en magnitud sobre insectos de importancia agrícola y forestal en su mayoría.

Ubicación Taxonómica

Según (Alexopoulus y Mims, 1979; McCoy *et al.*, 1988; Samson, 1988).

Reino: Mycetae

División: Amostigomicotina

Clase: Deuteromycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género: *Beauveria*

Especie: *B. bassiana*

Morfología

Beauveria sp. es un entomopatógeno imperfecto con hifas septadas y estructuras reproductivas denominadas conidióforos, sobre las cuales se desarrollan los conidios (Tanada y Kaya, 1993). Se ramifica su micelio para formar conidióforos simples e irregulares que terminan en vértices en forma de racimos; la base de la célula es globosa o abultada con un adelgazamiento en el área de inserción de los conidios, de 2 a 3 μm o 2 a 2.5 μm y esterigmas curvados en forma irregular o dispuestos en forma de zig-zag (Metasav-11, 1997: CB-03, 1999).

Importancia

B. bassiana es un hongo con un amplio espectro de acción, que puede atacar a los insectos en estado de huevo, larva, pupa y adulto, donde generalmente son susceptibles a las micosis del mismo. Dentro de los insectos que controla tenemos dípteros, coleópteros, lepidópteros, hemípteros, y algunas plagas de suelo (*Phyllophaga* sp.) (Hajek y Leger, 1994; Bio-Zental, 1998; CB-03, 1999).

Lezama (1993) reporta cepas de *B. bassiana* causando un porcentaje de mortalidad comprendido entre 67.2 y 90% en huevo, mientras que en larvas neonatas reporta mortalidades comprendidas entre 84.5 y 100% con un TL_{50} de 2.8 hasta 5.9 días

Metarhizium anisopliae

El hongo entomopatógeno *M. anisopliae* (Metsch) Sorokin, tiene distribución cosmopolita y presenta más de 200 especies de insectos hospederos; dentro de ellos, *S. frugiperda* (Maniania y Fargues, 1984).

Ubicación Taxonómica

Según (Alexopoulos y Mims, 1979; McCoy *et al.*, 1988; Samson, 1988).

Reino: Mycetae

División: Amostigomicotina

Clase: Hyphomycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género: *Metarhizium*

Especie: *M. anisopliae*

Morfología

M. anisopliae forma conidióforos simples o agregados, posee conidias alargadas, ovoides o cilíndricas dispuestas en cadena originadas de un conidióforo en forma de botella, las conidias miden de 6 a 8 μm y tienen un color verde olivo por lo que la enfermedad en los insectos se llama “muscardina verde”. Este hongo es considerado cosmopolita (Berlanga *et al.*, 1997; CB-08, 1999).

Importancia

El primer intento de control microbiano con esta especie fue realizado por Metschnikoff en 1879 para el control de larvas de *Cleonus puntiventris* (Curculionidae) Germ, en remolacha azucarera. En 1884 Krassiltschik continuó con estos estudios, obteniendo de 50 a 80% del control de insectos después de 10 a 15 días de la aplicación (McCoy *et al.*, 1988).

Lezama (1993) Menciona a *M. anisopliae* causando porcentajes de mortalidad superiores al 94% sobre *S. frugiperda* en el estadio de huevo. Al igual Lezama *et al.*

(1996) reportan que estudios de laboratorio han demostrado que *S. frugiperda* es susceptible al hongo *M. anisopliae* en los estados biológicos de huevo y larva, con porcentajes de mortalidad del 100% y valores de TL_{50} de 2.5 a 2.9 días en huevo y 1.3 a 3.1 días en larvas, a una concentración de 1×10^8 conidias/mL; sin embargo, no se tienen antecedentes de evaluaciones de este hongo bajo condiciones de campo (Lezama *et al.*, 2005).

Nomuraea rileyi

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 organismo ampliamente distribuido, capaz de infectar no solo a *S. frugiperda*, sino también a una gran diversidad de insectos defoliadores del orden Lepidóptera. En México se ha reportado la existencia de *N. rileyi* controlando poblaciones de *S. frugiperda* llegando a ejercer hasta un 100% de control (Sánchez, 2000; Ríos *et al.*, 2010).

Ubicación Taxonómica

Según (Alexopoulos y Mims, 1979; McCoy *et al.*, 1988; Samson, 1988).

Reino: Mycetozoa

División: Deuteromycetes

Clase: Hyphomycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género: *Nomuraea*

Especie: *N. rileyi*

Morfología

Es una especie muy similar al género *Paecilomyces*. Forma sinemas o grupos de conidióforos ramificados, presenta fiálides engrosadas en la base, terminadas en forma de botella, pero con el cuello más corto que en *Paecilomyces* y las esporas crecen en cadenas con una coloración típica del hongo. Su hifa vegetativa es septada, de pared lisa, hialina o ligeramente pigmentada, su estructura reproductiva es un conidióforo erecto septado que nace de la hifa formando densos grupos de racimos con dos o tres fiálides compactadas alrededor del conidióforo (Hernández y Berlanga, 1996; Berlanga, 1997).

Importancia

El hongo *N. rileyi* es una alternativa promisoría para controlar poblaciones altas de larvas de *S. frugiperda*, ya que las epizootias naturales ocasionadas por este hongo sobre *Spodoptera* y otros lepidópteros son frecuentes. Este hongo imperfecto y dimórfico en su desarrollo es diferente de los hongos oportunistas *M. anisopliae* y *B. bassiana*, tiene algunos requerimientos muy exigentes para su crecimiento, posee un amplio rango de hospederos y no tiene una fase saprofítica en el suelo (Boucias *et al.*, 2000). *N. rileyi* no germina, ni crece, ni esporula a temperaturas superiores a 35 °C, lo cual indica que no afecta a vertebrados homeotérmicos. Los conidios expuestos a jugos gástricos de humanos se inactivan rápidamente. Cuando se administró a ratas en dosis de 1.1×10^7 conidios/litro de aire durante una hora no se observaron anormalidades clínicas, patológicas o histopatológicas (Ignoffo *et al.*, 1979).

Lezama (1993) reporta a *N. rileyi* causando mortalidades del 100% en larvas neonatas de *S. frugiperda* obteniendo TL_{50} comprendidos entre 4.1 y 6.3 días. También reporta que el hongo resultó igualmente virulento en los primeros 5 estadios

larvales mostrando el 100% de mortalidad; en el sexto estadio obtuvo una mortalidad de 77.5%, la CL_{50} registrada para el hongo fue de 9.8×10^4 conidias/mL.

A pesar de lo promisorio que puede resultar el uso de este entomopatógeno, no existe ningún bioplaguicida registrado a base de este hongo, posiblemente por la dificultad que presenta este microorganismo para su producción masiva, ya que tiene requerimientos nutricionales específicos y es de desarrollo muy lento (Villamizar, 2004). El logro de un bioplaguicida a base de este hongo, implica el cumplimiento de diversas etapas que garanticen la obtención de un producto seguro, eficaz y confiable. Dichas etapas comprenden el aislamiento del microorganismo, la evaluación de su actividad controladora, su producción masiva, estudios de preformulación, formulación, determinación de dosis y formas de aplicación, estudios de toxicidad, ensayos de campo, determinación de los mecanismos de biocontrol, estudios de impacto ambiental, caracterización molecular, estudios de mercado y patentamiento, entre otros (Gómez y Villamizar, 2000).

Micoinsecticidas

Recientemente varios micoinsecticidas han entrado al mercado; sin embargo, de las más de 700 especies de HEP actualmente conocidos, sólo 10 especies se han empleado para el control biológico, quedando un número importante con potencial para su aplicación (Hajek y St Leger, 1994; St Leger *et al.*, 1996; Pucheta *et al.*, 2006). La mayor limitación en el desarrollo de micoinsecticidas, es el hecho de que estos requieren mayor tiempo después de la aplicación para el control del insecto, durante el cual los insectos infectados pueden causar serios daños a los cultivos (St Leger *et al.*, 1996).

Según Carrillo (2009), la generación de nuevos productos de origen biológico deberá tener en cuenta la determinación de los medios de cultivo óptimos, así como la optimización del sistema para la obtención masiva de inóculo, que permita una buena relación costo-beneficio en su producción. Se deberán llevar a cabo bioensayos de laboratorio, invernadero y campo, que confirmen la efectividad del

producto una vez formulado. El uso de agentes de control biológico, como son los enemigos naturales y los entomopatógenos, está empezando a asumir un papel importante en el campo, siendo considerable el número de casos exitosos, lo que los coloca como una de las opciones de control importante para el desarrollo de una agricultura sustentable. Sin embargo, aún falta profundizar más en el entendimiento de las bases moleculares, relacionados con la capacidad de los entomopatógenos para regular las poblaciones de insectos plaga. Esto es de trascendental importancia para poder lograr una planeación de estrategias de control adecuadas. Por último, se espera que la aplicación adecuada de biocontroladores, así como de otros métodos alternativos, permita disminuir las pérdidas de las cosechas, además de contribuir a la disminución de los procesos de contaminación del medio ambiente.

Microencapsulación

Los procesos de encapsulación fueron desarrollados entre los años 1930 y 1940 por la National Cash Register para la aplicación comercial de un tinte a partir de gelatina como agente encapsulante mediante un proceso de coacervación.

La encapsulación es un proceso mediante el cual ciertas sustancias bioactivas (sabores, vitaminas o aceites esenciales) son introducidas en una matriz o sistema pared con el objetivo de impedir su pérdida, para protegerlos de la reacción con otros compuestos presentes o para impedir que sufran reacciones de oxidación debido a la luz o al oxígeno. Una ventaja adicional es que un compuesto encapsulado se liberará gradualmente del compuesto que lo ha englobado o atrapado (Reineccius, 1991; Popplewell *et al.*, 1995).

Es una técnica de inmovilización de células. Algunas propiedades típicas del sistema microencapsulado han sido estudiadas, tales como contenido de microorganismos, tamaño de partícula y tiempo de germinación, se preparan mediante el método de conservación-separación en fases, utilizando una etapa intermedia de emulsión múltiple (Bashan *et al.*, 2002).

Diversos experimentos basados en polímeros han sido evaluados, estos han demostrado ser portadores potenciales de bacterias siendo una gran ventaja práctica. La microencapsulación de células vivas las protege contra diversos factores ambientales, además de ser incorporados al suelo son liberados gradualmente cuando el polímero es degradado (Yabur *et al.*, 2006).

Gombotz (1998) cita que los alginatos son uno de los polímeros más utilizados en la microencapsulación. Ellos son extraídos primariamente de tres especies de algas marrones. Estas incluyen *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pyrifera*. Otras incluyen *Laminaria japónica*, *Ecloniamaxima* y *Lesonia negrescens*. Los alginatos son una familia de polisacáridos lineales no ramificados, conteniendo cantidades variables de ácido (1,4') β -D-mannurónico y de ácido α -L-gulurónico. La composición y extensión de las secuencias y el peso molecular determinan las propiedades físicas de los alginatos.

Estas formulaciones presentan muchas ventajas, ya que pueden almacenarse secas a temperatura ambiente por periodos prolongados, pueden ser manipulados fácilmente, ofrecen una calidad constante y un mejor ambiente de acuerdo con las necesidades específicas de las bacterias y el cultivo. El alginato es el material comúnmente usado en la encapsulación de microorganismos para varios propósitos industriales (Weinbrecky *et al.*, 2004, citado por Hernández, 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del Experimento

La propagación y encapsulación de los hongos entomopatógenos se llevó a cabo en el centro de microbiología aplicada (CEMAP) de la empresa GreenCorp Biorganiks de México, S.A. de C.V., ubicado en Saltillo, Coahuila, México. Los bioensayos experimentales se realizaron en la cámara bioclimática No. 10 del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, y el trabajo de campo se realizó en un macro túnel del campo experimental "El Bajío", de la institución antes mencionada. Localizado a 25° 21' 16.88" N, 101° 02' 17.88" W, con una altitud de 1748 msnm

Cría de *Spodoptera frugiperda*

Las larvas del cogollero fueron obtenidas de una cría mantenida en el Departamento de Parasitología de la (UAAAN). Por lo que sólo se llevó a cabo su manejo y reproducción para su posterior utilización en los bioensayos experimentales de este proyecto.

La colonia fue iniciada recolectando larvas de los últimos estadios 5^{to} y 6^{to} de parcelas de maíz infestado en Buenavista, Saltillo, Coahuila, colocándolas en envases de plástico para su traslado al lugar de reproducción. La colonia se estableció en una cámara bioclimática del Departamento de Parasitología de esta Universidad, a una temperatura de 25±2 °C con un fotoperiodo de 12:12 y 50-60 % de HR. Las larvas fueron alimentadas con dieta artificial (Southland Products Incorporated), hasta el estadio de pre-pupa. Las pupas sanas fueron depositadas en vasos de plástico del No. 3, para luego colocarlas dentro de las jaulas de oviposición. Posteriormente se esperó la emergencia de los adultos, los cuales se alimentaron con agua azucarada 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 agentes contaminantes en la cría, posteriormente se colocaron en vasos de plástico de una onza con tapa (Envases Cuevas S.A. de C.V.), que contenían dieta artificial. Cuando las larvas se encontraron en segundo estadio se separaron, colocándose una larva por vaso con dieta artificial, la cual es suficiente durante todo su desarrollo, este procedimiento se debe realizar hasta que se utilicen las larvas en los bioensayos.

Reproducción de los Hongos

Los hongos entomopatógenos empleados en esta investigación (*B. bassiana*, *M. anisopliae* y *N. rileyi*) fueron proporcionadas por el Centro de Microbiología Aplicada (CEMAP) de la empresa GreenCorp Biorganiks de México, S.A. de C.V. Dichas cepas son conservadas tanto en cajas de Petri, como en tubos de ensayo con medio de cultivo y mantenidos en refrigeración a 4 °C para su uso continuo.

Preparación de Medios de Cultivo

Los medio de cultivo fueron preparados en matraces Erlenmeyer. Se usaron dos tipos de medios de cultivo para realizar la siembra, el medio SDA (Sabouraud dextrose agar) fue utilizado para los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae*, el medio V8 (V8, agar-agar) fue utilizado para el hongo *N. rileyi*.

Preparados los medios, se mezclaron en una parrilla de agitación con la ayuda de un magneto. Una vez mezclados se esterilizaron en una olla de presión por un tiempo de 15 min manteniéndose una temperatura constante de 120 °C a 15 lbs aproximadamente.

Se dejaron enfriar y se vaciaron a cajas de Petri, el vaciado se realizó dentro de una campana de flujo laminar para evitar su contaminación. Cada uno de los hongos se sembró por dos métodos, siembra en estría y siembra por inundación,

después se llevaron a la cámara de incubación donde permanecieron durante 10 a 15 días para su crecimiento y esporulación.

Después de la reproducción e incremento de las cepas en suficiente cantidad se realizó la microencapsulación.

Microencapsulación de los Hongos

Al término del periodo de incubación y de la esporulación total de cada caja y tubo de ensayo del cultivo de los hongos en sólido, se agregó una solución de Tween 80 al 0.05% bajo condiciones asépticas y se removió el crecimiento superficial de los microorganismos con una varilla de vidrio y/o espátula estéril. El contenido de la suspensión se colocó en recipientes de vidrio estériles para su concentración y conservación en refrigeración hasta el momento de su uso o de su empleo en formulaciones. Cada frasco se identificó incluyendo la fecha de elaboración, siendo necesario para su control de calidad realizar el conteo de número de esporas por mL, el cual se determinó por medio de una cámara de Neubauer (Muñoz *et al.*, 2000).

La fabricación de los MIC's conteniendo los hongos entomopatógenos se realizó empleando el equipo originalmente diseñado por Carrillo y Bashan (1997), y modificado por Hernández (2008). Se utilizó el mismo procedimiento para todos los hongos respetando tanto pH, tiempos y temperaturas óptimas para cada uno.

Para la formulación de microencapsulados (MIC's) se utilizó una concentración de 1×10^{10} conidias/mL, se tomaron 20 mL de la suspensión de esporas y se mezclaron con 80 mL de alginato de sodio al 1.5 % previamente esterilizado, dejando en agitación por 15 min, se vaciaron al contenedor del microencapsulador y se inició la aspersion sobre una charola estéril de acero inoxidable conteniendo cloruro de calcio (CaCl_2) al 2%. Al hacer contacto la mezcla del alginato más el cultivo de los hongos con el CaCl_2 se formaron las microcápsulas. Las microcápsulas en la solución de CaCl_2 se vaciaron a un matraz estéril, después se separaron los microencapsulados de la solución de CaCl_2 utilizando papel filtro, se

realizó un lavado con solución salina al 0.85% para eliminar totalmente la solución de CaCl₂, finalmente los microencapsulados se lavaron con agua destilada estéril.

Los microencapsulados ya obtenidos y lavados se colocaron en cajas de Petri con papel filtro estéril y se secaron a 40 °C/72h. Se colocaron en frascos hasta su uso. Se realizaron pruebas de viabilidad al momento de hacer el secado de los microencapsulados obteniendo un buen crecimiento y sin contaminación.

Evaluación de Entomopatógenos Encapsulados en Laboratorio

La evaluación en laboratorio consistió en determinar el porcentaje de mortalidad sobre *S. frugiperda*, causada por los hongos entomopatógenos encapsulados a evaluar.

Suspensión de Microencapsulados

Se integraron 0.5 g de las capsulas, en una solución de citrato de sodio en agua destilada al 0.5 M + 0.05% de Tween 80. Se mantuvieron en constante agitación, al transcurso de 12 h se hidrataron y se diluyeron utilizando 50 mL de la solución. Se determinó la concentración de esporas mediante el uso de una cámara de Neubauer (Muñoz *et al.*, 2000), obteniendo con ello los tratamientos a utilizar en los bioensayos.

Tratamientos Empleados en los Bioensayos

T1.- MIC's de <i>Metarhizium anisopliae</i>	4.9x10 ⁵ conidias/mL
T2.- MIC's de <i>Beauveria bassiana</i>	3.48x10 ⁶ conidias/mL
T3.- MIC's de <i>Nomuraea rileyi</i>	7.5x10 ⁵ conidias/mL
T4.- MIC's de (Bb-Ma-Nr)*	1.95x10 ⁶ conidias/mL
T5.-Testigo	(Agua destilada estéril)

*Mezcla de Bb-Ma-Nr: *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *N. rileyi*, en partes iguales.

Evaluación de Entomopatógenos Encapsulados en *S. frugiperda*

Se realizaron cortes de hojas y cogollos de maíz, los cuales fueron colocados en contenedores de plástico transparentes de 250 g (figura 1), estos fueron asperjados con las suspensiones de hongos arriba mencionadas (figura 2), una vez seca la dieta se infestó con larvas (mantenidas en inanición por 8 h). A cada recipiente se le colocó algodón húmedo para proveer la humedad adecuada y las tapas fueron perforadas para la respiración de las larvas. Las suspensiones de conidias de los entomopatógenos se aplicaron en larvas de primero, segundo y tercer estadio, realizando tres bioensayos a la vez por cada estadio. Se usaron cinco contenedores (repeticiones) para cada tratamiento (hongo) con cinco larvas en cada contenedor. Teniendo un total de 75 individuos observados por tratamiento. A cada contenedor se realizaron 4 aspersiones de la suspensión del microencapsulado.



Figura 1. Cortes de hojas y cogollo de maíz.



Figura 2. Aspersión de hongos.

Los tratamientos fueron observados a los cinco, siete y nueve días de haber hecho la aspersión con los MIC's, para medir el porcentaje de mortalidad, posteriormente se observaron para confirmar que realmente la mortalidad fuera causada por el hongo (larvas micosadas).

Determinación de la CL₅₀ de Entomopatógenos Encapsulados

En la determinación de la concentración letal media (CL₅₀) se utilizó a MIC's de *N. rileyi* y la mezcla de MIC's (Bb-Ma-Nr), estas suspensiones de conidias de hongos entomopatógenos fueron las que obtuvieron mortalidades más altas en pruebas anteriores.

Para la evaluación de las suspensiones en larvas de primer estadio, se trabajó con 4 concentraciones de cada una (10^2 , 10^4 , 10^6 y 10^8 conidias/mL, y un testigo con agua estéril) también, se usaron cuatro repeticiones por concentración, colocando cinco larvas por recipiente, teniendo un total de 60 individuos ya que se realizaron tres bioensayos a la vez. Para la realización de estos bioensayos se siguió el mismo procedimiento descrito en los bioensayos anteriores.

Tratamientos Empleados en los Bioensayos

T1.	MIC's de <i>Nomuraea rileyi</i>	2.5×10^8 conidias/mL
T2.	MIC's de <i>Nomuraea rileyi</i>	7.5×10^6 conidias/mL
T3.	MIC's de <i>Nomuraea rileyi</i>	7.5×10^4 conidias/mL
T4.	MIC's de <i>Nomuraea rileyi</i>	7.5×10^2 conidias/mL
T5.	Testigo	(Agua destilada estéril)
T1.	MIC's de (Bb-Ma-Nr)*	2.5×10^8 conidias/mL
T2.	MIC's de (Bb-Ma-Nr)*	1.95×10^6 conidias/mL
T3.	MIC's de (Bb-Ma-Nr)*	1.95×10^4 conidias/mL
T4.	MIC's de (Bb-Ma-Nr)*	1.95×10^2 conidias/mL
T5.	Testigo	(Agua destilada estéril)

*Mezcla de Bb-Ma-Nr: *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *N. rileyi*, en partes iguales.

Evaluación de Entomopatógenos Encapsulados en Plantas de Maíz

Se realizó en los meses de febrero y marzo del 2011, dentro de un macro túnel establecido en el Bajío de la UAAAN. Las plantas de maíz fueron sembradas en macetas protegidas de frío y viento por polietileno, donde se determinó la mortalidad sobre *S. frugiperda*, causada por los hongos entomopatógenos, y estos se emplearon a diferentes concentraciones de conidas arriba mencionadas.

Para la evaluación de las suspensiones de conidas de los hongos entomopatógenos, se usaron larvas de primer estadio, se trabajó con MIC's de *N. rileyi* y (Nr-Bb-Nr) a 4 concentraciones de cada una (10^2 , 10^4 , 10^6 y 10^8 conidas/mL, y un testigo con agua destilada estéril) arriba mencionados, se usaron cinco macetas (repeticiones) con tres plantas cada una por concentración, al tener 5 hojas verdaderas estas fueron asperjadas hasta cubrir completamente la planta, una vez seca se infestó con larvas neonatas de *S. frugiperda* colocando dos larvas por planta, teniendo un total de 30 individuos. Los bioensayos se realizaron tres veces en fechas diferentes.

Los tratamientos fueron observados a los cinco, siete, nueve, 15 y 20 días de haber hecho la aspersión con los MIC's, para medir el porcentaje de mortalidad.

Análisis de datos

Los datos obtenidos de porcentaje de mortalidad por tratamiento, en los diferentes estadios larvales fueron separados por una prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$), mediante un diseño de bloques al azar (SAS, 2001).

En las pruebas de mortalidad para las larvas de primer estadio, se estimó la concentración letal media CL_{50} usando el programa estadístico Proc. Probit SAS System ver. 9.0 (SAS, 2001), además de obtener las líneas de respuesta concentración mortalidad, así como los estimados de los límites de confianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los entomopatógenos asperjados sobre larvas de *S. frugiperda* mediante microaspersores provocaron síntomas como: i) en una etapa inicial una disminución en su alimentación, baja movilidad y, al final de la infección ii) una micosis muy característica de los hongos Hyphomycetes.

El tratamiento MIC's, de *Metarhizium anisopliae*, a una concentración de 4.9×10^5 conidias/mL fue descartado, ya que en los bioensayos no mostró actividad bioinsecticida.

Larvas de *S. frugiperda* de 1^{er} estadio tratadas con hongos entomopatógenos MIC's (Cuadro 2) muestran que hay diferencia estadística significativa en la mortalidad provocada por cada entomopatógeno, siendo el tratamiento a base de la mezcla de MIC's, el que presentó mayor mortalidad en comparación con el resto de los tratamientos, obteniendo el 49.33%; seguido de *B. bassiana* con una mortalidad del 26.67%. El tratamiento a base de *N. rileyi* y el testigo absoluto no mostraron diferencias estadísticas entre ellos, mostrando una mortalidad baja de 5.33 y 0% respectivamente. Estadísticamente estos últimos tratamientos en comparación con *B. bassiana* y la mezcla de entomopatógenos fueron diferentes significativamente debido a la mortalidad que estos provocaron.

Al respecto Maranga *et al.* (2005), en un estudio realizado en laboratorio y campo mostró el incremento de la actividad patogénica al realizar la combinación de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre la mortalidad de la garrapata *Amblyomma variegatum*.

Cuadro 2. Porcentaje de mortalidad de larvas de 1^{er} estadio del cogollero del maíz *S. frugiperda* causado por hongos entomopatógenos microencapsulados.

Tratamiento	Concentración conidias/mL	No. de larvas por Repetición	% de mortalidad por repetición			% Mortalidad ¹	
			R1	R2	R3		
Bb-Ma-Nr	1.95x10 ⁶	25	52	40	56	49.333	A
<i>B. bassiana</i>	3.48x10 ⁶	25	28	28	24	26.667	B
<i>N. rileyi</i>	7.5x10 ⁵	25	12	4	0	5.333	C
Testigo	H ₂ O destilada	25	0	0	0	0	C

DSM=13.836, CV=26.02378

Bb-Ma-Nr: *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *N. rileyi*.

1 Valores con la misma letra son estadísticamente iguales Tukey (P≤0.05)

Al realizar bioensayos de estos mismos tratamientos con larvas de segundo estadio (Cuadro 3) se observa diferencia significativa en cuanto a la mortalidad de la mezcla de MIC's, siendo esta la más efectiva en el control de *S. frugiperda*, con una mortalidad de 42.67%, 10.67 veces mayor con respecto a *B. bassiana* y *N. rileyi* evaluadas de manera individual por lo que aparentemente existe un efecto sinérgico que activa la patogenicidad de ambos entomopatógenos. Se puede observar que el entomopatógeno *B. bassiana* redujo su capacidad de infección en larvas de segundo estadio en comparación con larvas de primer estadio (Cuadro 2), con respecto a los tratamientos MIC's de *B. bassiana* y MIC's de *N. rileyi* se comportaron de la misma manera que el testigo ubicándose en el mismo grupo estadístico (P≤0.05), sin existir diferencias en su actividad entre ellos comparados con los de primer estadio; aun y cuando el coeficiente de variación fue muy amplio en ambos bioensayos. Al respecto Briones (2011), reporta en un estudio realizado en campo la combinación de *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces* sp., sobre *Bactericera cockerelli* (Sulc.), que alcanzó niveles de control de 55.8%, a dosis media, siendo superado solo por *Paecilomyces* sp., con 57.4% de mortalidad a una dosis alta.

Cuadro 3. Porcentaje de mortalidad de larvas de segundo estadio del cogollero del maíz *S. frugiperda* causado por entomopatógenos microencapsulados.

Tratamiento	Concentración conidias/mL	No. de larvas por repetición	% de mortalidad por repetición			% Mortalidad ¹	
			R1	R2	R3		
Bb-Ma-Nr	1.95x10 ⁶	25	48	46	34	42.667	A
<i>B. bassiana</i>	3.48x10 ⁶	25	8	4	0	4.000	B
<i>N. rileyi</i>	7.5x10 ⁵	25	0	8	4	4.000	B
Testigo	H ₂ O destilada	25	0	0	0	0	B

DSM=10.886, CV=32.86841

1 Valores con la misma letra son estadísticamente iguales Tukey (P≤0.05)

El comportamiento de la actividad de entomopatógenos MIC's en larvas de *S. frugiperda* de 3^{er} estadio (Cuadro 4), se mostró que la mezcla de entomopatógenos, fue la que ocasionó la mayor mortalidad en comparación con el resto de los tratamientos, obteniéndose una mortalidad del 46.67%., mientras que los tratamientos MIC's de *B. bassiana* y de *N. rileyi*, presentaron una mortalidad muy baja, ambos, ubicándose en el mismo grupo estadístico respecto del testigo. En este sentido Belmares (2009) reporta que *S. frugiperda*, mostró baja susceptibilidad al hongo *N. rileyi* con mortalidades entre 9 y 14% a una concentración de 5.7x10⁷.

No existe diferencia significativa en cuanto a la mortalidad en 1^{er}, 2^{do} y 3^{er} estadio de *S. frugiperda* de manera general, ya que los valores de mortalidad se comportaron similares en todos los estadios, excepto en el tratamiento de MIC's de *B. bassiana* que obtuvo una mortalidad de 26.67% en larvas de 1^{er} estadio siendo estadísticamente diferente al testigo, sin embargo en el segundo y tercero estadio, su capacidad de infección fue muy baja, comportándose de la misma manera que el testigo (P≤0.05). Al respecto Vega *et al.* (2010), reportan una cepa de *N. rileyi* a una concentración de 2.5X10⁷ y formulada en agua, causando mortalidades de 100%,

70% y 40%, para los estadios de segundo, tercero y cuarto respectivamente. En este estudio se obtuvieron mortalidades diferentes, esto posiblemente debido al método de inoculación.

Cuadro 4. Porcentaje de mortalidad de larvas de 3^{er} estadio del cogollero del maíz *S. frugiperda* causado por entomopatógenos microencapsulados.

Tratamiento	Concentración conidias/mL	No. de larvas por Repetición	% de mortalidad por repetición			
			R1	R2	R3	% Mortalidad ¹
Bb-Ma-Nr	1.95x10 ⁶	25	32	64	44	46.667 A
<i>B. bassiana</i>	3.48x10 ⁶	25	0	4	4	2.667 B
<i>N. rileyi</i>	7.5x10 ⁵	25	4	0	0	1.333 B
Testigo	H ₂ O destilada	25	0	0	0	0 B

DSM=21.561, CV=65.10167

¹ Valores con la misma letra son estadísticamente iguales Tukey (P≤0.05)



Figura 3. Larvas de gusano cogollero *S. frugiperda* micozadas por *N. rileyi*, inoculadas en A) segundo estadio y B) tercer estadio.

El comportamiento de MIC's en larvas de *H. zea* se puede observar en el cuadro 5 donde se aprecia, que este insecto fue más susceptible a la actividad de los entomopatógenos resultando más efectivo *B. bassiana*. Este bioensayo permitió también observar una mayor mortalidad en los tres tratamientos realizados respecto del testigo, a diferencia de *S. frugiperda* donde la actividad de la mezcla de MIC's fue la que desarrollo mortalidad significativa, en *H. zea* la mezcla y los entomopatógenos de manera individual desarrollaron mortalidad diferente y significativa al testigo.

Cuadro 5. Porcentaje de mortalidad de larvas de segundo estadio del gusano elotero, *Helicoverpa zea* causado por entomopatógenos microencapsulados.

Tratamiento	Concentración conidias/mL	No. de larvas por repetición	% de mortalidad por repetición					% Mortalidad ¹	
			R1	R2	R3	R4	R5		
<i>B. bassiana</i>	3.48x10 ⁶	10	50	100	100	50	100	80	A
Mezcla	1.95x10 ⁶	10	50	50	100	100	50	70	AB
<i>N. rileyi</i>	7.5x10 ⁵	10	50	50	50	0	0	30	B
Testigo	H ₂ O destilada	10	0	0	0	0	0	0	C

DSM= 46.207

CV= 45.64355

¹ Valores con la misma letra son estadísticamente iguales Tukey (P≤0.05)

La mortalidad en cada entomopatógeno MIC's en lo individual fue muy baja, posiblemente que esto sea debido a la dificultad en la liberación de las conidias de los microencapsulados en donde estas se encontraban, también a las dificultades que se encontraron en obtener una mezcla homogénea de las microcapsulas en carbonato de calcio y de ácido cítrico, y a la baja concentración a la cual se aplicaron las suspensiones.

El comportamiento de los MIC's de *N. rileyi* y la mezcla medido a través de su CL₅₀ y CL₉₅ se muestran en el cuadro 6, donde se destaca al entomopatógeno *N. rileyi* con una CL₅₀ de 9.6×10^7 conidias/mL. Al respecto Vega *et al.* (2010) reportan suspensiones de *N. rileyi* en aceite a una concentración de 2.5×10^7 , mostrando mortalidades en *S. frugiperda*, con rangos entre 90 y 100% y un tiempo letal medio (TL₅₀) comprendido entre 4.7 y 6.0 días. En este trabajo se obtuvieron mortalidades más bajas posiblemente debido a que la cepa evaluada se formuló.

Céspedes *et al.* (2008) reportan a *N. rileyi* a una concentración de 8×10^7 conidias/mL, causando mortalidades de 100% y de 60% a una temperatura de 22 ± 1 y 27 ± 1 °C respectivamente sobre *S. frugiperda*, mientras que el presente trabajo se realizó en rangos de variación de temperatura que oscila de los 20 a 25°C lo cual muestra que pudo haber influido en la mortalidad.

Cuadro 6. Concentración letal media CL₅₀ y límites fiduciales de hongos entomopatógenos microencapsulados sobre larvas de primer estadio de *Spodoptera frugiperda*.

Entomopatógeno	Conidias/mL				SE
	Límites Fiduciales (95%)				
	Inferior	CL ₅₀	Superior	CL ₉₅	
<i>N. rileyi</i>	3.9×10^7	9.6×10^7	3×10^8	5.5×10^{11}	0.0492
Nr-Bb-Ma	5.6×10^7	6.2×10^8	6.6×10^{10}	3.5×10^{16}	0.0392

Nr-Bb-Ma: *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *N. rileyi*.

En la figura 2, se muestran las líneas de respuesta concentración-mortalidad de larvas de *S. frugiperda*. Se observan diferencias entre los MIC's de la mezcla de Nr-Bb-Ma y *N. rileyi* ya que la línea de la mezcla (Nr-Bb-Ma), muestra una tendencia más pronunciada en comparación con *N. rileyi*. Al respecto Domenico *et al.* (2009) reportan una formulación granular sólida, a base de gránulos de germen de maíz desgrasado y *N. rileyi* a una concentración de 10^7 conidias / g, causando niveles de mortalidad similares a los obtenidos en esta estudio.

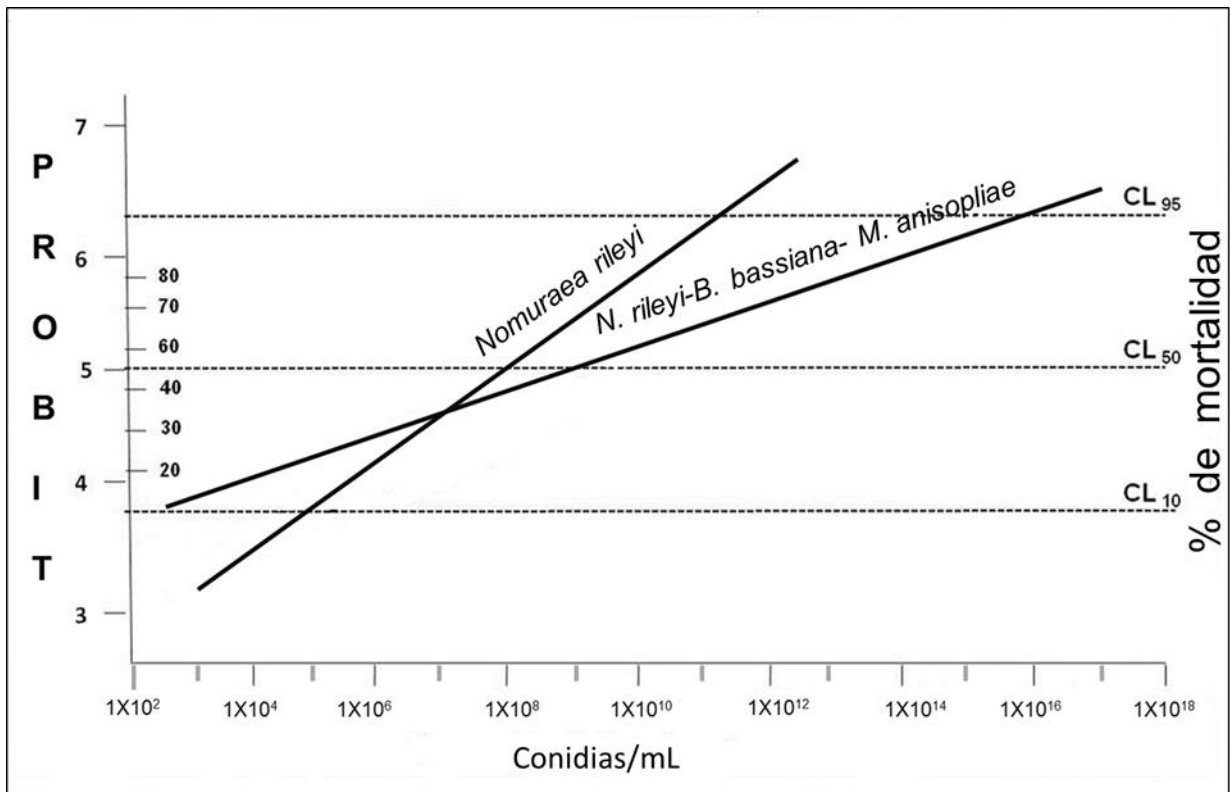


Figura 4. Líneas de respuesta concentración-mortalidad, de *N. rileyi* y Nr-Bb-Ma (mezcla) encapsulados sobre larvas neonatas de *S. frugiperda* a los 9 días de exposición.

Ensayos iniciales con MIC's, al 2% en alginato de sodio mostraron una baja solubilidad en cualquiera de las soluciones mencionadas anteriormente, Muestras de estos materiales diluidas con bicarbonato de sodio a una concentración de 1, 2, 3 y 4% y aplicadas a dieta natural para su evaluación provocaron toxicidad en las hojas de maíz empleadas como dieta, por lo que se empleó una microencapsulación a una concentración inferior al 2% siendo la de 1.5% en alginato el que se empleó para microencapsular.

La microencapsulación como procedimiento de conservación y liberación lenta de material es muy útil para formular, sin embargo las dificultades prácticas al momento de realizar mezclas, dificultan su empleo en la solubilización de microcapsulas, tal y como se encontró en los bioensayos realizados. Un posible empleo de la microencapsulación pudiera ser, utilizando menores concentraciones

de alginato para microencapsular partículas de menor diámetro y solucionar con ello los problemas de mezclado en soluciones acuosas.

Al realizar los bioensayos en plantas de maíz el comportamiento de la actividad de los entomopatógenos MIC's en larvas neonatas de *S. frugiperda* no mostró mortalidad alguna, posiblemente debido a las condiciones climáticas que no fueron favorables para los hongos entomopatógenos, tal y como fueron las bajas temperaturas que se presentaron durante el mes de febrero y la baja humedad relativa, lo que limitó su actividad. Los resultados obtenidos corroboran lo reportado por Devi (2000), quien afirma que el rango óptimo de temperatura de este y otros hongos entomopatógenos, para su desarrollo, patogenicidad y sobrevivencia, fluctúa entre 20 y 30°C. Devi *et al.* (2003) mencionan que dos de los aspectos más importantes en el uso exitoso de hongos entomopatógenos en el control biológico de plagas son, su efectividad y persistencia del inóculo en el campo; por lo tanto, una de las principales limitantes para su utilización es la eventual ocurrencia de condiciones ambientales adversas tales como altas temperaturas, baja humedad relativa, radiación ultravioleta, entre otros.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación podemos concluir lo siguiente:

Las mezclas (Nr-Bb-Ma) de microencapsulados fue la que mostro el mayor porcentaje de mortalidad sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*.

El hongo entomopatógeno *N. rileyi* fue el que se expresó en larvas de primer, segundo y tercer estadio en mayor proporción.

El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*, muestra mayor resistencia a ambas especies de hongos respecto a *Helicoverpa zea* que fue más susceptible.

La concentración letal media (CL₅₀) de *Nomuraea rileyi* para *Spodoptera frugiperda* fue de 9.6×10^7 conidias/mL para el hongo *Nomuraea rileyi*, mientras que para la mezcla de entomopatógenos (Nr-Bb-Ma) fue de 6.2×10^8 conidias/mL.

Las ventajas de microencapsular permiten proteger al ingrediente activo, en este caso conidias de hongos entomopatógenos, asegurar su persistencia, además de aumentar el inóculo inicial en el campo y por ende mejorar el nivel de control sobre el hospedero.

LITERATURA CITADA

- Adamczyk, J. J. Jr., Holloway, J. W., Graves, J. B. 1999. Toxicity of selected insecticides to fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in laboratory bioassay studies. *Florida Entomologist*. 82(2): 230-236.
- Alexopoulos, C. J. y Mims C. W. 1979. *Introductory mycology*. 3^a. Ed. John Wiley y Sons. New York, 1979.
- All, J. N. 1988. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) infestations in no-tillage cropping systems. *Florida Entomologist* 71: 268-272.
- Andrews, K. L. 1988. Latin American research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida entomologist*. 71: 630: 653.
- Aponte, O. y F., Morillo. 1987. Problemática entomológica del maíz en el Estado Português. IX Curso de entomología general y manejo integrado de plagas. Consultado en marzo del 2011. Disponible en: <http://www.miza-ucv.org.ve/plagas-agricolas/fichas/ficha.php?hospedero=316&plaga=173>
- 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.
- Ávila, V. J., Cortez, M. E. y Reyes, R. M. A. 2010. Determinación del parasitismo natural de gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz en el sur de Tamaulipas. *Memorias del XXXIII Congreso Nacional de control biológico*. Uruapan, Michoacán, México. Pp. 138-141.

- Bahena, J. F., Kevin, F. E de L., Cortez, M. E., Sánchez, M. R., García, P. F., Salcedo, M. M., Degen, T., Gaudillat, B. y Aguilar, R. R. 2010. Parasitismo en gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera. Noctuidae) en el centro de México. Memorias del XXXIII Congreso Nacional de control biológico. Uruapan, Michoacán, México. Pp. 204-209.
- 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 (Doctorado en Ciencias), ITESM. Div. Ciencias Agrop. Y Maritimas. Monterrey, México, p. 55-60.
- Banda, T. J. F.; Enkerlin, S. D.; De Alba, F. G. y Garza, B. L. E. 1981. Importancia económica de *Heliothis zea* (Boddie) y determinación del umbral económico, distribución matemática y muestreo secuencial de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) en maíz criollo. Fitófilo. 85: 101-118.
- Bashan, Y., Hernández, J. P. Leyva, L. A. y Bacilio, M. 2002. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. Biology and fertility of soils. 35:359-368 (F.I 1.307).
- Belmares, A. G. G. 2009. Control de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) con *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, en el cultivo de maíz. Tesis de licenciatura, UAAAN, Dpto. de Parasitología. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 39 p.
- Berlanga. P. A. Ma. 1997. Aislamiento, identificación y conservación de hongos entomopatógenos. Memoria del II curso taller de producción de agentes de control biológico, Tecomán, Colima, México. Pp. 18-30.
- Bio- Zentla, 1998. "Bb (*Beauveria bassiana*)", Boletín técnico. Laboratorio de reproducción de hongos entomopatógenos de Zentla, Veracruz, México.

- Blahutiak A. 1970. Influencia de la temperatura en el desarrollo de *Laphygma frugiperda*, serie Poeyana. Instituto de Biología. A.C.C. No.77.
- Borror, D. J., D. M. de Long y C. A Triplehorn. 1989. An introduction to the study of insects. 6th. (ed). Holt Rinehart and Winston. New York. USDA. Pp. 345-378.
- Boucias, D. G.; Tigano, M. S.; Sosa - Gomez, D. R.; Glare, T. R.; Inglis, P W. 2000. Genotypic properties of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. Biological Control. 19 (2): 124-138.
- Briones, 2011. Efectividad biológica de entomopatógenos para el control de pulgón saltador *Bactericera cockerelli* (Sulc.) en el cultivo de chile. Tesis de Licenciatura, UAAAN, Dpto. de Parasitología. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 50 pp.
- Bruner, S. C y J. R. Deschappelles. 1965. La palomilla del maíz o gusano de la yerba y medios de combate. Estación Experimental Agronómica. Santiago de las Vegas. Habana.
- Capinera, J. L. 2008. Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). EENY-098, University of Florida IFAS Extension, Pp. 6.
- Carrillo, R. M.T., y Blanco, L. A. 2009. Potencial y Algunos de los Mecanismos de Acción de los Hongos Entomopatógenos para el Control de Insectos Plaga. Acta Universitaria. Universidad de Guanajuato, México. 19 (2): 40-49
- Carrillo, A., y Bashan, Y. 1997. Microencapsulation as a potential carrier for plant growth-promoting bacteria. *En: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria- present status and future prospects.* (Eds.). A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F.

Kodama, N. Kondo y S. Akino. Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan. pp. 460-463.

CESAVEG, 2008. Folleto. Campaña "Manejo Fitosanitario del Maíz". 20 p. Consultado en marzo de 2011. Disponible en línea: http://www.cesaveg.org.mx/html/folletos/folletos_08/folleto_maiz_08.pdf

Céspedes, Y; del Pozo, E; García, I y Méndez, A. 2008. Efecto de la temperatura sobre el hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson y su efectividad sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Rev. Protección Veg. Vol. 23 (3): 176-182

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.

Cisneros, H. J. 1994. Reproducción de lepidopteros de cereales *Diatraea* spp. *Heliothis zea* (Boddie) y *Spodoptera frugiperda* (Smith) En: Bautista M. N., G. V cota y J. L. C. Sánchez (Eds). Técnicas para cría de insectos. Colegio de posgrado en ciencias agrícolas. Montecillo Edo. de México. p: 49-57.

Cloutier, C. y Cloutier, C. 1992. Les solutions biologique de lutte puor la repression des insects et acarines ravageurs des cultures, Chapitre 2. En: La Lutte Biologique. C. Vincent et D. Coderre (Eds.). Tec & Doc Lavoisier, Québec, Canada. p. 33.

De Faria, M. y S. Wraight, 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control. 43:237–256.

- Del Rincón, C. M. C. 2007. Bioinsecticidas virales, P. 161.pp. 160-178. *En*: L. A. Rodríguez-del-Bosque y H. C. Arredondo-Bernal (Eds.). Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. 303 p.
- Devi, V., Mohan, C., Padmavathi, J., Ramesk, K. 2003. Susceptibility to fungi of cotton Bollworms before and after a natural epizootic of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Hyphomycetes). *Biocontrol Science and Technology*; 13 (3):367-37.
- Devi, V. 2000. Research on microbial control of insect pest at DOR. *Newsletter*. 6 (1): 29-33.
- Estrada, A. P. H. 1986. Enemigos naturales de las principales plagas del maíz. Monografía de licenciatura. U.A.A.A.N. Buenavista, Saltillo Coah. 87 p.
- FAO: FAOSTAT. Producción mundial del maíz en 2008. Consultado en mayo del 2011. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
- Feldhaar, H. y Gross R. 2008. Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualist. *Microbes Infect.* 10: 1082-1088.
- Fernández, R. 1991. Plagas de gramíneas. *En*: Guía de Protección Vegetal. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela. Pp. 155-171.
- Gámez, R. 1969. A new leaf hopper-borne virus of corn in Central America. *Plant Dis. Rep.* 53: 929-932.
- Gámez, R. 1983. The ecology of maize fine virus in the American tropics. *En* R. T. Plum & J. M. Thresh (Eds.). *Plant Virus Epidemiology*. Blackwell Scientific, Oxford, pp: 267-275.

- García, R. F. Mosquera, A. T., Vargas, S. C. A., Rojas, A. L. 1999. Manejo integrado del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Boletín informativo Convenio Corpoica-PROMATTA. Palmira. 19 p.
- Garza, G. E. 1992. Control microbiológico de mosquita blanca. Métodos de control de mosquita blanca en hortalizas. S.A.R.H. Dirección General de Sanidad Vegetal. C.N.R.C.B. Universidad Autónoma de California, Mexicali, B.C. p.99-110.
- Gardner, A. W., Noble, R. y Schwarz, R. D. 1984. The potential of microbial agents in managing populations of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). Florida entomologist. 67: 326-332.
- Gómez, M. I y Villamizar, L. F. 2000. Formulación de bioplaguicidas. *En*: Corpoica-MIR I Curso-Taller Internacional Control Biológico, componente fundamental del manejo integrado de plagas en una agricultura sostenible. Bogotá, Colombia. Editor A. López-Avila. Pp.108-111.
- Gombotz, W. R. y Wee S. F. 1998. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews* . 31: 267-285.
- Hajek, A. E, St Leger R. J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect host. *Annual Review of Entomology*. 39: 293-322.
- Herniöu, E. A., Olszewski, J. A., Cory, J. S. y O'Reilly, D. R. 2003. The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annual Review of Entomology*. 48: 211- 234.

- Hernández, 2008. Biocontrol de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* con microencapsulados de *Bacillus subtilis* y su efecto en el crecimiento y rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Tesis de Maestría, UAAAN, Dpto. de Parasitología. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. p 26 y 35.
- Hernández, V. V. y Berlanga, P. A. M. 1996. Control microbiano con hongos entomopatógenos. Memorias del II curso de actualización en control biológico, Colima, México. Pp. 94-106.
- Ignoffo, C. M., García, C., Kapp, R.W., Coate, W. B. 1979. An evaluation of the risks to mammals of the use of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, as microbial insecticide. Environmental Entomology. 8 (2): 354-359.
- Jackson M. A., McGuire M. R., Lacey L. A., Wraight S. P. 1997. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *P. fumosoroseus*. Mycological Research. 101: 35-41.
- Jaimés, C. J. R., Vega, A. P., Espínola. A. F., Briones, M. A., Anzures, H. Y., Pérez, D. H., Y Sánchez, P. S.R. 2009. Pandora, *Euplectrus* y otros enemigos naturales de *Spodoptera frugiperda* J. Smith y *Mocis* spp. (Lepidoptera: Noctuidae), en pasto buffel en Nuevo León, México. Memorias del XXXII congreso nacional de control biológico. Villahermosa, Tabasco, México. Pp 125-128.
- Jassic, J. y Reines, M. 1974. Estudio experimental de la influencia de la temperatura en la palomilla del maíz. Ciencias. 44: 1-19.
- Jugenheimer, R. W. 1981. Maíz, variedades mejoradas, métodos de cultivo y producción de semillas. Editorial, Limusa, México. 841p.

- Kumul, D. E. 1983. Búsqueda de plantas silvestres del Edo. de Veracruz con propiedades tóxicas contra gusano cogollero en maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) y mosquito casero *Culex quinquefasciatus* Say. Tesis profesional, Parasitología Agrícola, UACH. Chapingo, México. 76 p.
- Lezama, G. R., Alatorre, R. R., Bojalil-Jaber, L. F., Molina-Ochoa, J., Arenas-Vargas, M., González-Ramírez, M. y Rebolledo-Domínguez, O. 1996. Virulence of five entomopathogenic fungi (Hyphomycetes) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs and neonate larvae. *Vedalia*. 3: 35-39.
- Lezama, G. R., Molina, O. J., M. López., A. Pescador., E. Galindo., C. A. Ángel y A. C. Michel. 2005. Efecto del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* sobre el control del gusano cogollero del maíz en campo. *Avances en Investigación Agropecuaria*. 9 (1): 27-32
- 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. Universidad de Colima .Tecomán:159 pp.
- León M., G. A.; Pulido, J. I. 1991. Importancia del control natural del cogollero *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith. En: Memorias seminario *Spodoptera frugiperda* (El gusano cogollero) en sorgo, maíz y otros cultivos. Cali, Colombia. Pp. 78-82.
- Lesur, L. 2005. Manual del cultivo del maíz: Una guía paso a paso. 1^{ra} ed. Editorial Trillas. México D.F. Pp. 17-19.
- López, L. V. y Claugher D. 1990. Appresoria of the nematophagous fungus *V. suchlasporium*. *Micron Microscopy*. 21: 125-130.

- López, V. J., Coria, A. V. M., Muñoz, F. H.J., Nájera, R. M. B. y Orozco, G. G. 2010. Impacto de *Spinoteram* y *Bacillus thuringiensis* sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y *Crisoperla* sp., en una plantación comercial de maíz en Yurécuaro, Michoacán. Memorias del XXXIII Congreso Nacional de control biológico. Uruapan, Michoacán, México. Pp. 304-307.
- Luginbill, P. 1928. The fall armyworm. USDA. Tech. Bull. Pp 34-92.
- Madriz, K. 1999. Molecular studies of the defense responses of maize (*Zea mays* L.) in interaction with Maize Rayado Fino Marafivirus (MRFV). Tesis PhD. The Royal Veterinary & Agricultural University, Copenhagen, Denmark.
- Maniania, N. K. y Fargues, J. 1984. Specificité des hyphomycetes entomopathogènes pour les larves de lepidopteres Noctuidae. *Entomophaga*. 26: 451-464.
- Maranga, R. O; Kaaya, G. P; Mueke, J. M. y Hassanali, A. 2005. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (Ixodidae) in relation to seasonal changes, *Mycopathologia* 159: 527–532.
- McCoy, C. W., Samson R. A. y Boucias D. G. 1988. Entomoptogenous fungi. *En: C. M. Ignoffo. CRC Handbook of Natural Pesticides. Part V Microbial insecticides and entomopathogenous, protozoa and fungi. (Ed.). CRC, Press. Inc. Boca Raton, Florida. Pp. 151-236.*
- McGregor, R. y O. Gutiérrez. 1983. Guía de insectos nocivos para la agricultura en México. Ed. Alhambra, México, D.F. Pp 166.
- Mendez, L. I. 1990. Control microbiano de la broca del fruto del café *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleóptera: Scolytidae) con el hongo *Beauveria bassiana*

(Bals) (Deuteromycetes) en el soconusco, Chiapas. Tesis. CP Montecillos, Chapingo, Edo. Mex. Pp. 33-56.

Metasav-11. 1977. Insecticida biológico, boletín técnico, Instituto de Investigación de Sanidad Vegetal, Cuba.

Mitchell, E. R. 1978. Relationship of planting date to damage by earworms in commercial sweetcorn in north central Florida. *Florida Entomologist* 61:251-255.

Molina, O. J., J. J. Hamm, R. Lezama-Gutierrez, M. López-Edwards, M. González-Ramírez y A. Pescador-Rubio. 2001. A survey of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) parasitoids in the Mexican states of Michoacan, Colima, Jalisco, and Tamaulipas. *Florida Entomologist*. 84:31-36.

Molina, O. J., J. E. Carpenter, R. Lezama-Gutierrez, J. E. Foster, M. González-Ramírez, C. A. Ángel-Sahagún y J. Farías-Larios. 2004. Natural distribution of hymenopteran parasitoids of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Mexico. *Florida Entomologist*. 87: 461-472.

Molina, O. J., Lezama, G. R., González, R. M., López, E. M., Rodríguez, V.M. A y Arceo, P. F. 2003a. Pathogens and parasitic nematodes associated with populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in México. *Florida Entomol.* 86(3): 244-253.

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. Pp 496-498.

- Ortega, C. A. 1987. Insectos nocivos del maíz: Una guía para su identificación en el campo. Edit. Lisboa.106 p.
- 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 p.
- Piedra, F.1974. Effect of different forage diets on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Cuban Journal of Agricultural Science. 8:99-103.
- Pimentel, D. 1995. Amount of pesticide reaching target pests: Environmental impacts and ethics. Journal of Agricultural and Environmental Ethics. 8: 17-29.
- Pitre, H.N. y D.B. Hogg. 1983. Development of the fall armyworm on cotton, soybean and corn. Journal of Georgia Entomological Society. 18:187-194.
- Popplewell, L. M., Black, J. M., Norris, L. y Porzio, M. 1995. Encapsulation systems for flavors and colors. Food Technology. 49 (5): 76- 82
- Pucheta, D. M., Flores, M. A., Rodríguez, N. S., De la Torre M. M. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. Interciencia. 31: 856-860.
- Reineccius, G. A. 1991. Carbohydrates for flavor encapsulation, Food Technology, 45 (3): 144-146
- Restrepo, I. 1988. Naturaleza Muerta. Los Plaguicidas en México, Ediciones Océano, SA, México, D.F.

- Rios, V. C., Cerna, C. E., Sánchez, P. S., Gallegos M.G. 2010. Natural epizootic of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson infecting *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Coahuila México. The Journal of Research on the Lepidoptera. 43: 7-8
- Rios, V. C., Gallegos M. G., Del Rincón, C. M., Cerna, C. E., Sánchez, P. S. R. y Cepeda, M. S. 2009. Control biológico de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) con diferentes aislados de la Poliedrosis Nuclear. Memorias del XXXII Congreso Nacional de control biológico. Villahermosa, Tabasco, México. Pp 228-233.
- Rios, V. C., Gallegos M. G., Del Rincón, C. M., Ruiz, G. O. L., Cerna, C. E. y Cepeda, M. S. 2010. Efecto de formulaciones de formulaciones de NPV sobre larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en invernadero. Memorias del XXXIII Congreso Nacional de control biológico. Uruapan, Michoacán, México. Pp. 58-61.
- Ríos, V. C., G. Gallegos M., J. E. Gómez., P. O. J. Cambero., C. E. Cerna C. y M. Cepeda C. 2009. Reporte preliminar de enemigos naturales del cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en Coahuila, México. Memorias del XXXII congreso nacional de control biológico. Villahermosa Tabasco, México. Pp.158-159.
- 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.
- Roberts, P. M. y J. N. All. 1993. Hazard for fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) infestation of maize in double-cropping systems using sustainable agricultural practices. Florida Entomologist. 76:276-283.

- Rodríguez, A. J. 1984. Importancia del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (Smith), en el cultivo del maíz *Zea mays*. Tesis C.S.A.E.G. Cocula, Gro. 35 p.
- Rodríguez, Del B. L. A. y H. C. Arredondo, B. 2007. Teoría y aplicación del control biológico. 1^{ra} ed. Editorial. Sociedad Mexicana de Control Biológico, A. C. Pp. 12. 303 p.
- Rodríguez, M., R. y C. De León. 2008. El cultivo del maíz. Temas selectos. 1^{ra} ed. Editorial Colegio de Posgraduados, Mundi-Prensa México. Pp. 29-45.
- Saad, I. (1999). Cuaderno de vigilancia tecnológica No. 6: «Cereales». Solleiro, J. y Castañón, Rorario. (Eds.). México, CamBioTec, Instituto de Ingeniería, UNAM. P 13.
- Sagar, CB-03, 1999. "Uso de *Beauveria bassiana* como insecticida microbial ", Ficha técnica, Dirección General de Sanidad Vegetal, CNRCB y CNRF, México.D.F. 4 p.
- Sagar, CB-08, 1999. "Control microbial de mosca pinta *Aenolamia* spp., con *Metarhizium anisopliae* ", Ficha técnica, CNRCB, México. D.F. 4 p.
- Sagar, CB-09, 1999. "*Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, en el control microbiano de lepidópteros plaga", Ficha técnica, CNRCB, México. D.F. 4 p.
- Samson, R. A. 1988. Identification: Entomopathogenic Deuteromycetes. Academic Press. Pp. 194-222.
- Sánchez P.P., I. López R., J. Sánchez P., B. Galván P. y A. Castro E. 1994. Evaluación semicomercial de 16 materiales de maíz bajo condiciones de riego en navolato, Sinaloa. II Congreso latinoamericano de genética XV Congreso de fitogenetica. Monterrey, N.L. Memorias. p.344.

- Sánchez, S. 2000. Entomopathogenous fungi associated whit the cotton aphid in the Texas high plains. *Southwestern entomologist*. 18: 69-70
- SAS Institute. 2001. "SAS User´s Guide. Version 9.0." SAS Institute, Cary, NC USA.
- Serrano, G. O., Sánchez, V. A., Villegas, M. J. y Rosas, G. N. M. 2010. Efecto entomopatógeno de aislados nativos de *Bacillus thuringiensis* contra *Spodoptera frugiperda* y *Spodoptera exigua*. . Memorias del XXXIII congreso Nacional de control biológico. Uruapan, Michoacán, México. Pp 36-38.
- Severini, M. 1985. Contribution a l'étude de la multiplication de Baculovirus de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). memoria (de Des), Univ. París-sud. 40p.
- SIAP-SAGARPA. 2006. Situación actual y perspectivas del maíz en México 1996-2012. Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera. Consultado en marzo de 2011. Disponible en: http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaDerivada/ComercioExterior/Estudios/Perspectivas/maiz96-12.pdf
- SIAP-SAGARPA. 2010. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consultado en marzo de 2011. Disponible en: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=202&Itemid=86
- Sotelo, R. F., Peña, C. G., Hernández, V. V., Trejo, L. A. G., Lina, G. L., Gonzales, F. A., Molina, O. J., y Lezama, G. R. 2009. Evaluación de patogenicidad de dos aislados de *Heterorhabditis* sp., nativos del estado de Morelos sobre *Spodoptera frugiperda*. Memorias del XXXII congreso Nacional de control biológico. Villahermosa, Tabasco, México. Pp 198-200.

- St Leger R., Charney A., Cooper R. 1986b. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogen fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *Journal invertebrate pathology*. 47: 295-302.
- St Leger R., Bidochke M., Roberts, D. 1994. Isoforms of the cuticle degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *M. anisopliae*. *Arch. Biochem and Biophys*. 313: 1-7.
- St Leger, R. J., Joshi L., Bidochka, M. J., Roberts, D. W. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 6349-6354.
- Tanada, Y.; Kaya, H. K. 1993. *Insect Pathology*. Academic press, inc. USA. 664p.
- Tamez, P., Iracheta, M., Pereyra B. 2005. Caracterización de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* toxicas para larvas de lepidópteros y coleópteros, *Ciencias UANL/ Vol. VIII, N° 4*. 477- 482
- Téllez, A., Cruz, M. G., Mercado, Y., Asaff. A., Arana. A. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Rev. Mex. Mic*. 30: 73-80.
- USDA-NRCS. 2009. Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Service. Consultado en marzo de 2011. Disponible en: <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=ZEM>
- A
- Valdez, M., Madriz, K., y Ramirez, P. 2004. Un método de transformación genética de maíz para conferirle resistencia ulterior a enfermedades virales. *Rev. Biol. Trop*. 52(3): 787-793.

- Vega, A. P., Sánchez, P. S. R., y Blanco, A. C. 2010. Activity of oil-formulated conidia of the fungal entomopathogens *Nomuraea rileyi* and *Isaria tenuipes* against lepidopterous larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: 145–149
- Villamizar, L. C., Arriero, C. F. Bosa O., y Marina C. A.. 2004. Desarrollo de preformulados a base de *Nomuraea rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 30(1): 99-105.
- Waage, J. K. 1991. Biodiversity as a resource for biological control. *En* Hawksworth, D. L., (Ed.). *The biodiversity of microorganisms and invertebrates: its role in sustainable agriculture*. C.A.B. International, U.K., pp. 149-163.
- Yabur, R., Bashan, Y., y Hernández-Carmona, G. 2006. Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion. *J. Appl. Phycol.* 19:43–53
- Yu, S. J. 1991. Insecticide resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 39: 84-91.
- Zimmermann, G. 1986. Insect pathogenic fungi as pest control agents. *En: Biological Plant and Health Protection*. Franz, J. M. (Ed.). G. Fischer Verlag, Stuttgart pp. 217-231.

APÉNDICE

Cuadro 1. Análisis de varianza, de la mortalidad en larvas de primer estadio de *Spodoptera frugiperda*.

F.V	G.L	S.C	C.M	F- Valor	Pr> F
Tratamientos	3	4558.67	1519.55	54.27	<.0001
Error	8	224	28		
Total	11	4782.67			

DSM=13.836, CV=26.02378

Cuadro 2. Análisis de varianza, de la mortalidad en larvas de segundo estadio de *Spodoptera frugiperda*.

F.V	G.L	S.M	C.M	F- Valor	Pr> F
Tratamientos	3	3632.00	1210.67	69.85	<.0001
Error	8	138.67	17.33		
Total	11	3770.67			

DSM=10.886, CV=32.86841

Cuadro 3. Análisis de varianza, de la mortalidad en larvas de tercer estadio de *Spodoptera frugiperda*.

F.V	G.L	S.C	C.M	F-Valor	Pr> F
Tratamientos	3	4634.66	1544.88	22.72	0.0003
Error	8	544	68		
Total	11	5178.66			

DSM=21.561, CV=65.10167

Cuadro 4. Datos obtenidos de bioensayos en laboratorio sobre larvas de *S. frugiperda* de primer estadio.

Tratamiento	Repetición	N	% Mortalidad
<i>B. bassiana</i>	1	25	28
<i>B. bassiana</i>	2	25	28
<i>B. bassiana</i>	3	25	24
<i>N. rileyi</i>	1	25	12
<i>N. rileyi</i>	2	25	4
<i>N. rileyi</i>	3	25	0
Bb-Ma-Nr	1	25	52
Bb-Ma-Nr	2	25	40
Bb-Ma-Nr	3	25	56
Testigo	1	25	0
Testigo	2	25	0
Testigo	3	25	0

Cuadro 5. Datos obtenidos de bioensayos en laboratorio sobre larvas de *S. frugiperda* de segundo estadio.

Tratamiento	Repetición	N	% Mortalidad
<i>B. bassiana</i>	1	25	8
<i>B. bassiana</i>	2	25	4
<i>B. bassiana</i>	3	25	0
<i>N. rileyi</i>	1	25	0
<i>N. rileyi</i>	2	25	8
<i>N. rileyi</i>	3	25	4
Bb-Ma-Nr	1	25	48
Bb-Ma-Nr	2	25	36
Bb-Ma-Nr	3	25	44
Testigo	1	25	0
Testigo	2	25	0
Testigo	3	25	0

Cuadro 6. Datos obtenidos de bioensayos en laboratorio sobre larvas de *S. frugiperda* de tercer estadio.

Tratamiento	Repetición	N	% Mortalidad
<i>B. bassiana</i>	1	25	0
<i>B. bassiana</i>	2	25	4
<i>B. bassiana</i>	3	25	4
<i>N. rileyi</i>	1	25	4
<i>N. rileyi</i>	2	25	0
<i>N. rileyi</i>	3	25	0
Bb-Ma-Nr	1	25	32
Bb-Ma-Nr	2	25	64
Bb-Ma-Nr	3	25	44
Testigo	1	25	0
Testigo	2	25	0
Testigo	3	25	0

Cuadro 7. Datos obtenidos de bioensayos en laboratorio sobre larvas de *Helicoverpa zea* de segundo estadio.

Tratamiento	Repetición	N	%Mortalidad
<i>B. bassiana</i>	1	2	50
<i>B. bassiana</i>	2	2	100
<i>B. bassiana</i>	3	2	100
<i>B. bassiana</i>	4	2	50
<i>B. bassiana</i>	5	2	100
<i>N. rileyi</i>	1	2	0
<i>N. rileyi</i>	2	2	50
<i>N. rileyi</i>	3	2	50
<i>N. rileyi</i>	4	2	50
<i>N. rileyi</i>	5	2	0
Bb-Ma-Nr	1	2	50
Bb-Ma-Nr	2	2	50
Bb-Ma-Nr	3	2	100
Bb-Ma-Nr	4	2	100
Bb-Ma-Nr	5	2	50
Testigo	1	2	0
Testigo	2	2	0
Testigo	3	2	0
Testigo	4	2	0
Testigo	5	2	0

Cuadro 8. Datos obtenidos de bioensayos en laboratorio, de *N. rileyi* sobre larvas de neonatas de *Spodoptera frugiperda*.

Tratamiento/concentración	Repetición	% de Mortalidad
<i>N. rileyi</i> 2.5X10 ⁸	1	50
<i>N. rileyi</i> 2.5X10 ⁸	2	65
<i>N. rileyi</i> 2.5X10 ⁸	3	60
<i>N. rileyi</i> 7.5X10 ⁶	1	25
<i>N. rileyi</i> 7.5X10 ⁶	2	25
<i>N. rileyi</i> 7.5X10 ⁶	3	40
<i>N. rileyi</i> 7.5x10 ⁴	1	10
<i>N. rileyi</i> 7.5x10 ⁴	2	5
<i>N. rileyi</i> 7.5x10 ⁴	3	10
<i>N. rileyi</i> 7.5X10 ²	1	0
<i>N. rileyi</i> 7.5X10 ²	2	0
<i>N. rileyi</i> 7.5X10 ²	3	5

Cuadro 9. Datos obtenidos de bioensayos en laboratorio, de (Nr-Bb-Ma) sobre larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda*.

Tratamiento/concentración	Repetición	% de Mortalidad
Mezcla 2.5X10 ⁸	1	40
Mezcla 2.5X10 ⁸	2	40
Mezcla 2.5X10 ⁸	3	45
Mezcla 1.95X10 ⁶	1	20
Mezcla 1.95X10 ⁶	2	25
Mezcla 1.95X10 ⁶	3	35
Mezcla 1.95x10 ⁴	1	20
Mezcla 1.95x10 ⁴	2	15
Mezcla 1.95x10 ⁴	3	10
Mezcla 1.95X10 ²	1	10
Mezcla 1.95X10 ²	2	10
Mezcla 1.95X10 ²	3	10