

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



BIOFORMULADOS DE *Metarhizium rileyi* PARA EL CONTROL DE *Spodoptera frugiperda* EN MAIZ (*Zea mays*)

Tesis

Que presenta VIRIDIANA ANDREA MARTÍNEZ PONCE

como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila,

Noviembre de 2024

BIOFORMULADOS DE *Metarhizium rileyi* PARA EL CONTROL DE *Spodoptera frugiperda* EN MAIZ (*Zea mays*)

Tesis

Elaborada por VIRIDIANA ANDREA MARTÍNEZ PONCE como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



Dr. Sergio Rene Sánchez Peña
Director de Tesis



Dr. Agustín Hernández Juárez
Asesor



Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe
Asesor



Dr. Oswaldo García Martínez
Asesor



Dr. Antonio Flores Naveda
Subdirector de Postgrado

Saltillo, Coahuila,

Noviembre de 2024

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por permitirme formar parte de esta gran universidad y conocer la experiencia de trabajar en campo.

A mi comité de tesis compuesto por los doctores **Sergio René Sánchez Peña, Luis Aguirre Uribe, Agustín Hernández y Oswaldo García Martínez**, por apoyo y tiempo.

A **CONAHCYT** gracias, por brindarme el apoyo económico y permitirme concluir con mi proyecto de investigación.

A mis amigos, compañeros y confidentes, por escucharme, apoyarme y acompañarme en esta bonita aventura: **Arely Cano, Augusto Ceballos, Julián Pliego, Janeth Medina, Adriana Félix, Omar Jiménez, Benjamín Espinoza, Ubilfrido Vásquez, María del Carmen Guijón** y especialmente a **Carolina Delgado** por su apoyo incondicional y su guía durante la maestría ¡GRACIAS, amigos! Siempre en mi corazón.

Por último y no menos importante, a **Ivan González Buentello**, por tu amor, apoyo incondicional y alentarme a no darme por vencida en todo momento.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	13
REVISION DE LITERATURA.....	15
Maíz	15
Principales plagas.....	15
<i>Spodoptera frugiperda</i>	17
Impacto económico.....	17
Síntomas en maíz.....	17
Métodos de control	18
Control químico.....	19
Control biológico	19
<i>Metarhizium rileyi</i>	21
Taxonomía.....	21
Características morfológicas y fisiológicas	22
Producción y formulaciones.....	23
JUSTIFICACIÓN.....	25
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVOS.....	25
Objetivo general	25
Objetivos específicos	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
Lugar de trabajo	26
Origen de las cepas utilizadas.....	26
Origen de los insectos.....	26
Medio de cultivo	27
Porcentaje de germinación.....	27

Producción de conidias in vivo	28
Suspensiones, emulsiones y preparación en salvado	29
Análisis estadístico	29
Objetivo 1. Aislamiento e identificación de cepas.....	30
Objetivo 2. Estimar la virulencia de conidias de <i>M. rileyi</i> producidas in vivo e in vitro sobre <i>S. frugiperda</i> en laboratorio	32
Objetivo 3. Evaluar la mortalidad en laboratorio de larvas de <i>S. frugiperda</i> , por conidias de <i>M. rileyi</i> en emulsiones.....	32
Objetivo 4. Determinar la viabilidad de conidias de <i>M. rileyi</i> en emulsiones bajo dos condiciones de almacenamiento	33
Objetivo 5. Evaluar la mortalidad en campo sobre larvas de <i>S. frugiperda</i> , por conidias de <i>M. rileyi</i> en emulsiones.....	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
Objetivo 1. Aislar e identificar cepas de <i>M. rileyi</i>	35
Objetivo 2. Estimar la virulencia de conidias de <i>M. rileyi</i> producidos in vivo e in vitro contra <i>S. frugiperda</i> en laboratorio	36
Objetivo 3. Evaluar el porcentaje de mortalidad en laboratorio sobre larvas de <i>S. frugiperda</i> , por conidias de <i>M. rileyi</i> en emulsiones	37
Objetivo 4. Determinar la viabilidad de conidias de <i>M. rileyi</i> en emulsiones bajo dos condiciones de almacenamiento	38
Objetivo 5. Evaluar el porcentaje de mortalidad en campo sobre larvas de <i>S. frugiperda</i> , por conidias de <i>M. rileyi</i> en emulsiones.....	39
CONCLUSIONES	42
REFERENCIAS	43
Activity of Emulsion, Suspension and Granular Preparations of <i>Metarhizium rileyi</i> (Hypocreales: Clavicipitaceae) Against <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae on Field Maize	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estadios larvarios de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Ahissou <i>et al.</i> , 2021). .	16
Figura 2. Crecimiento de <i>M. rileyi</i> sobre <i>A. gemmatilis</i> y conidias al microscopio 100x (Idrees <i>et al.</i> , 2021).	23
Figura 3. Producción de conidias in vivo de <i>M. rileyi</i> . A) Larvas de <i>S. frugiperda</i> con micelio previo a la esporulación, B) Larvas de <i>S. frugiperda</i> con conidias, C) Larvas de <i>S. frugiperda</i> en cámara húmeda.....	28
Figura 4. Aislamiento de <i>M. rileyi</i> por estría simple en medio de cultivo agar SYS.....	31
Figura 5. A) Micelio de <i>M. rileyi</i> sobre larvas de <i>S. frugiperda</i> , B) Conidios de <i>M. rileyi</i> sobre larvas de <i>S. frugiperda</i> , C) <i>M. rileyi</i> en agar SYS y D) Morfología microscópica: Formación de fiálides en verticilos y conidias ovoides en cadenas cortas.....	35
Figura 6. Mortalidad media causada por: T1: conidias cultivadas en agar SYS + surfactante al 0.03%, T2: conidias de <i>M. rileyi</i> provenientes de larvas + surfactante al 0.03% y T3: surfactante al 0.03% en agua sobre larvas de <i>S. frugiperda</i> . Barra= error estándar de la media. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Prueba de Tukey, $p<0.05$).	36
Figura 7. Mortalidad media de <i>S. frugiperda</i> en laboratorio causada por: T1: aceite mineral + surfactante al 0.03% + <i>M. rileyi</i> , T2: aceite de soya + surfactante al 0.03% + <i>M. rileyi</i> , T3: aceite mineral + surfactante 0.03%, T4: aceite de soya + surfactante 0.03%, T5: surfactante 0.03%. Barra=error estándar de la media. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Prueba de Tukey, $p<0.05$).....	37
Figura 8. Mortalidad media de <i>S. frugiperda</i> en laboratorio causada por emulsiones almacenadas bajo dos condiciones: AM: Aceite mineral + surfactante	

al 0.03% + *M. rileyi* (día 0, día 45 a 25°C $\pm$ 5°C y día 45 a 4°C), Testigo (CAM): aceite mineral + surfactante al 0.03% (día 0, día 45 a 25°C $\pm$ 5°C y día 45 a 4°C). AS: aceite de soya + surfactante al 0.03%+ *M. rileyi* (día 0, día 45 a 25°C $\pm$ 5°C y día 45 a 4°C), testigo (CAS): Aceite de soya + surfactante al 0.03% (día 0, día 45 a 25°C $\pm$ 5°C y día 45 a 4°C). Barra= error estándar de la media. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Prueba de Tukey, $p < 0.05$). . 39

Figura 9. Mortalidad media de larvas de *S. frugiperda* causada por las formulaciones con *M. rileyi* en Saltillo, Coahuila (cuadro 4). Barra= error estándar de la media. Medias con letra común no son significativamente diferentes (prueba de Tukey, $p < 0.05$). 40

Figura 10. Larvas micosadas por *M. rileyi* colectadas después de siete días de la aplicación en campo de maíz, Saltillo, Coahuila 41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Escala de severidad de daño provocado por los estadios larvarios de <i>S. frugiperda</i> (Meagher <i>et al.</i> , 2016).	18
Cuadro 2. Tipos de proteínas Cry y sus hospederos (Bryant, <i>et al.</i> , 2024).....	21
Cuadro 3. Especies de lepidópteros susceptibles a <i>M. rileyi</i> en diferentes cultivos en el mundo (Li <i>et al.</i> , 2023).	22
Cuadro 4. Tratamientos evaluados sobre larvas <i>S. frugiperda</i> aplicados bajo condiciones de campo en Saltillo, Coahuila.....	34

RESUMEN

BIOFORMULADOS DE *Metarhizium rileyi* PARA EL CONTROL DE
Spodoptera frugiperda EN MAIZ (*Zea mays*)

Por

VIRIDIANA ANDREA MARTÍNEZ PONCE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. SERGIO RENE SÁNCHEZ PEÑA –ASESOR–

Saltillo, Coahuila,

Octubre de 2024

El gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), es una de las plagas más importantes del maíz y otros cultivos a nivel mundial. Los hongos entomopatógenos como *Metarhizium rileyi* (Farl.) (Kepler, S.A. Rehner & Humber, 2014) (Hypocreales: Clavicipitaceae) son una alternativa para su control en la agricultura; sin embargo, existe poca información respecto a formulaciones para su uso como bioinsecticida fúngico, y de los factores abióticos que afectan la infección y el desempeño del hongo. En esta investigación, se probaron conidias de *M. rileyi* (V1) en suspensiones acuosas (= AS) usando surfactante (Bionex) al 0.03% + agua; así como dos emulsiones (= EM): aceite agrícola mineral y aceite de soya cada uno con surfactante al 0.03% + agua; y una formulación semisólida (salvado, SO) contra larvas de gusano cogollero (L1-4). Los tratamientos se aplicaron en laboratorio y campo en Saltillo, Coahuila. Además se incluyeron para comparación conidias del hongo entomopatógeno, *Beauveria bassiana* (Bals.) (como AS, aislamiento BB1) pues este hongo ya es muy utilizado como bioinsecticida. En laboratorio, *M. rileyi* (AS) causó 62% de mortalidad media, mientras que EM resultaron en mortalidad de 70% (aceite mineral) y 48% (aceite de soya). En campo, las suspensiones de *M. rileyi* y *B. bassiana* causaron 32 y 28% de mortalidad media respectivamente; la mortalidad causada por las emulsiones de *M. rileyi* fue: aceite mineral 81% y aceite de soya 61%. Las conidias de *M. rileyi* en salvado causaron 27% de mortalidad media. Las conidias de *M. rileyi* como emulsión (aceite mineral y soya) indujeron un mayor porcentaje de mortalidad sobre el gusano cogollero en comparación con otras preparaciones, lo cual muestra el potencial de las emulsiones con conidias de *M. rileyi* como parte de un programa de manejo integrado de *S. frugiperda* en el cultivo de maíz.

Palabras clave: Bioformulación, Maíz, *Metarhizium rileyi*, *Spodoptera frugiperda*.

ABSTRACT

BIOFORMULATIONS OF *Metarhizium rileyi* FOR THE CONTROL OF
Spodoptera frugiperda IN MAIZE (*Zea mays*)

By

VIRIDIANA ANDREA MARTÍNEZ PONCE

MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. SERGIO RENE SÁNCHEZ PEÑA – CHAIR OF COMMITTEE-

Saltillo, Coahuila,

October de 2024

The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), is one of the most important pests of maize (corn) and other crops worldwide. Entomopathogenic fungi such as *Metarhizium rileyi* (Farl.) (Kepler, S.A. Rehner & Humber, 2014) (Hypocreales: Clavicipitaceae) are an alternative for its control in agriculture; however, there is little information regarding formulations for use as a fungal bioinsecticide, and of abiotic factors that affect the infection and performance of the fungus. In this research, *M. rileyi* (isolate V1) conidia were tested in aqueous suspensions (= AS) using 0.03% surfactant (Bionex) + water; as well as two emulsions (= EM): mineral agricultural oil and soybean oil each with 0.03% surfactant + water; and a semisolid formulation (bran, SO) against fall armyworm larvae (L1-4). The treatments were applied in the laboratory and field in Saltillo, Coahuila. In addition, conidia of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Bals.) (as AS, isolate BB1) were included for comparison, since this fungus is already widely used as a bioinsecticide. In the laboratory, *M. rileyi* (AS) caused 62% mean mortality, while EM resulted in 70% (mineral oil) and 48% (soybean oil) mortality. In the field, suspensions of *M. rileyi* and *B. bassiana* caused 32 and 28% mean mortality respectively; the mortality caused by the *M. rileyi* emulsions was: mineral oil 81% and soybean oil 61%. *M. rileyi* conidia in bran caused 27% mean mortality. *M. rileyi* conidia as emulsion (mineral oil and soybean) induced a higher percentage of mortality on the fall armyworm compared to other preparations, which shows the potential of emulsions with *M. rileyi* conidia as part of an integrated management program of *S. frugiperda* in maize fields.

Keywords: Bioformulation, Maize, *Metarhizium rileyi*, *Spodoptera frugiperda*.

INTRODUCCIÓN

El gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) es una plaga del maíz originaria de América con una amplia gama de plantas hospederas económicamente importantes, incluidos cultivos alimentarios, forrajeros y de fibra como el maíz, *Zea mays* L. (Cyperales, Poaceae); principal cultivo producido en México con más de 27 millones de toneladas de grano (SIAP, 2022). Los insecticidas comúnmente utilizados para el control del gusano cogollero son principalmente organofosforados, carbamatos, piretroides y diamidas; sin embargo, éstos tienen como desventaja la contaminación ambiental, intoxicaciones de humanos y desarrollo de resistencia a los insecticidas por parte de los insectos, además de ser costosos. Una alternativa de control es la utilización de enemigos naturales (control biológico), cuya implementación puede reducir la contaminación ambiental y riesgos a la salud. Un ejemplo de agentes de control biológico son los hongos entomopatógenos *Beauveria* spp., *Metarhizium* spp., y *Cordyceps* spp. (= *Isaria*) probados como bioinsecticidas (Eckard *et al.*, 2014; Casique-Valdés *et al.*, 2015). Las conidias de estos hongos se adhieren a la cutícula quitinosa de los insectos mediante las interacciones hidrofóbicas y enzimáticas; posteriormente ocurre la invasión del huésped, que desemboca en la muerte del artrópodo hospedero (Pendland *et al.*, 1994). En algunas zonas del noreste de México, Estados Unidos y Asia, *M. rileyi* causa epizootias naturales en larvas de lepidópteros en campos de maíz y sorgo, generalmente entre los meses de agosto y noviembre (Maublanc, 1903; Petch, 1925; Getzin 1961; Allen *et al.*, 1971; Sánchez-Peña 1990, 2000; Licona *et al.*, 2023). En los años 70 y 80 hubo gran interés por *M. rileyi* como insecticida biológico en los Estados Unidos (Ignoffo *et al.*, 1976), pero la difícil producción de conidias de *M. rileyi* posiblemente ocasionó que las investigaciones disminuyeran. Sin embargo, existen varias investigaciones de *M. rileyi* como bioinsecticida; la mayoría de las pruebas incluyen suspensiones simples de conidias que consisten en obtener una mezcla heterogénea de agua (fase dispersante) mas una fase dispersa (conidias) que además suele contener

un agente surfactante con el objetivo de mantener la suspensión de conidias (sin sedimentaciones) (Batta 2003).

La suspensión de conidias de hongos entomopatógenos emulsionadas en aceite han demostrado su potencial en el control biológico, debido a su virulencia contra insectos y también su estabilidad ambiental contra factores abióticos. Los aceites agrícolas son mezclas diseñadas para encapsular, transportar, dispersar y adherir ingredientes activos, o como en la presente investigación, conidias de hongos entomopatógenos (Inglis *et al.*, 2002, Batta 2003, Akbar *et al.*, 2005).

En laboratorio, se ha evaluado la efectividad de conidias de *M. rileyi* suspendidas en aceites vegetales contra larvas de *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae), *S. frugiperda*, *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) y *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777) (Lepidoptera: Noctuidae) las cuales causaron hasta 95% de mortalidad de 5-6 días después de la aplicación (Vega-Aquino *et al.*, 2010). Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar y comparar la actividad de suspensiones con conidias de *M. rileyi* en emulaciones con aceite agrícola, suspensiones acuosas y de salvado contra larvas de gusano cogollero en laboratorio y campo.

REVISION DE LITERATURA

Maíz

Principales plagas

Uno de los principales problemas que enfrenta el cultivo de maíz son las plagas y enfermedades; están asociados con baja productividad, problemas fitosanitarios, altos costos de producción (Aldrich et al. 1986). Dentro de los problemas fitosanitarios más importantes, se encuentran las malezas, enfermedades e insectos; estos dos últimos son la principal causa de pérdida de rendimiento, desde el establecimiento del cultivo hasta el almacenamiento (Chand y Cridge, 2020). La identificación correcta de las enfermedades y plagas en los cultivos son vitales, ya que el control de cada una es diferente y esto ayuda a evitar aplicaciones innecesarias de insecticidas y lograr un control eficiente. Existe una diversidad de insectos plaga, dentro de las cuales se encuentran palomillas del orden Lepidóptera: como *S. frugiperda*, *Helicoverpa zea* (gusano elotero), *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) (barrenador del tallo de maíz), *Chilo partellus* (Swinhoe, 1885) (Lepidoptera: Crambidae) (larvas de la palomilla de la espiga del maíz), *Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1796) (Lepidoptera: Crambidae) (palomilla europea del maíz), los daños que provocan son causados por el estadio larvario, donde a través del crecimiento causan daño al elote, grano, al tallo y al follaje de la planta (Blanco et al., 2014; Mays, 2015).

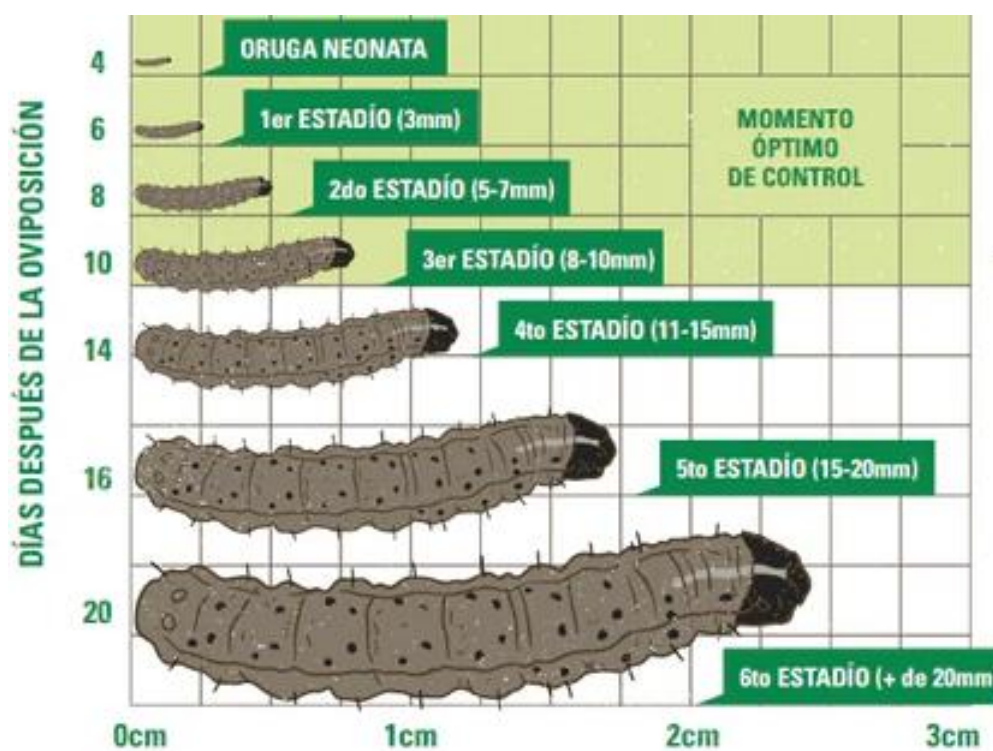


Figura 1. Estadios larvarios de *Spodoptera frugiperda* (Ahissou *et al.*, 2021).

Spodoptera frugiperda

Impacto económico

S. frugiperda, comúnmente llamado gusano cogollero, es una plaga fitófaga que ataca principalmente cultivos como maíz, sorgo, algodón, caña de azúcar, pastizales, algunas solanáceas, plantas ornamentales y otras 100 especies de plantas hospedantes; causa estragos especialmente en maíz. *S. frugiperda* se ha reportado en regiones tropicales y subtropicales de América del Norte y Sur, sin embargo, desde el 2016 ha migrado a otras partes del mundo como África, India, Tailandia, España y China; tan sólo en África las pérdidas han alcanzado US\$ 177.3 millones; en Kenia ha impactado hasta un tercio de la producción anual en 2018. Por otro lado, China reporta hasta US\$ 47 mil millones por año de pérdidas económicas debidas a este insecto (Abrahams *et al.*, 2017; Westbrook *et al.*, 2020; Deshmukh *et al.*, 2021).

Cui *et al.* (2019) observó en un análisis genómico que *S. frugiperda* cuenta con dos genes importantes que facilitan su desplazamiento a nivel mundial: 1. Receptor gustativo (GR) y acetaldéhidooxidasa que contribuyen a la detección de hospedantes y 2. Subunidad de la adenosina trifosfato sintasa mitocondrial y la cadena de ferritina que contribuyen a la resistencia en el vuelo y larga distancia de migración; en climas cálidos durante el verano, las palomillas (estado adulto del insecto) pueden recorrer cientos de kilómetros favoreciendo su dispersión natural (Gutiérrez *et al.*, 2018; Cerna *et al.*, 2022).

Síntomas en maíz

Los síntomas provocados por gusano cogollero del maíz comienzan después de que los huevos eclosionan. Los síntomas típicos son las “ventanas” sobre las hojas causadas por larvas neonatas. El tamaño de estas ventanas es variable, y conforme la larva cambia de estadio, la defoliación aumenta y se esparce a toda la hoja, provocando incluso que ésta se desprenda de la planta. En una defoliación más extensa se puede observar una hoja totalmente dañada con materia fecal de la larva. Con defoliación severa, el desarrollo de la planta se ve afectado, y por

consecuencia se reduce el tamaño de la mazorca y la espiga (Meagher *et al.*, 2016; Sagar *et al.*, 2020). La evaluación del daño foliar del cultivo se puede realizar de la siguiente manera (cuadro 1).

Cuadro 1. Escala de severidad de daño provocado por los estadios larvarios de *S. frugiperda* (Meagher *et al.*, 2016).

Escala	Descripción
0	No hay daño foliar de la hoja
1	Pequeñas lesiones circulares en las hojas
2	Pequeñas lesiones circulares, pequeñas ventanas en las hojas
3	Lesiones pequeñas y alargadas (5-10mm) en 1-3 hojas
4	Lesiones medias (10-30 mm) en 4-7 hojas
5	Lesiones alargadas grandes (>30 mm) en 3-5 hojas
6	Lesiones alargadas (>30 mm) y porciones grandes consumidas en 3-5 hojas
7	Lesiones alargadas (>30 mm) y 50% de la hoja consumida
8	Lesiones alargadas (>30 mm) y 70% de la hoja consumida
9	Defoliación completa

Métodos de control

Para esta plaga, el muestreo es de suma relevancia para tomar medidas de control oportunas en base a la aparición y desarrollo de este insecto. El periodo de cultivo (fecha de siembra), variedades resistentes y asociación de plantas, son métodos culturales que incluye además de rotación de cultivos, cultivos intercalados y la eliminación de hospedantes principales y alternos alrededor del cultivo (Ahissou *et al.*, 2021). El control de *S. frugiperda* inicia en pre-siembra, donde el arado es usado para exponer las pupas a la luz solar y aves depredadoras. El gusano cogollero a menudo es controlado usando insecticidas sistémicos, sin embargo,

la aplicación de diferentes métodos culturales podría ayudar a minimizar el daño y ser efectivo contra la plaga (Sagar *et al.*, 2020).

Control químico

En la siembra se usan híbridos resistentes y cultivos transgénicos; o productos químicos, los cuales son el principal método de control usado en el mundo, entre los ingredientes activos se encuentran: organofosforados y carbamatos que actúan como inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa en el sistema nervioso, que provoca parálisis y muerte. Los productos químicos como clorpirifos, carbosulfán, benzoato de emamectina, y beta cipermetrina se han utilizado ampliamente para controlar el gusano cogollero en África. Bhusal & Bhattarai (2019) reportaron más del 90% de la mortalidad de larvas mediante el uso de spinosad y clorantraniliprol; flubendiamida y spinetoram resultaron tener un mejor rendimiento que los insecticidas tradicionales lambda-cyhalotrina y novaluron. Sin embargo, se ha reportado resistencia de las larvas a estos compuestos y alguno de ellos fueron prohibidos por la residualidad y daño al medio ambiente (Hardke *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2020).

Control biológico

En el control biológico se incluyen grupos de organismos tales como bacterias, virus, hongos, nematodos, y parasitoides, entre otros. Dentro de las ventajas, se encuentra nula contaminación al medio ambiente; no generan resistencia; y en algunos casos existe una interacción específica de depredador, parasitoide u hongo con el huésped. El control biológico es reportado contra *S. frugiperda* en todo el mundo. Kenis (2023) menciona que existe parasitismo de huevos, larvas y pupas: se ha reportado que el parasitismo en huevos por *Telenomus remus* Nixon (Gerling D., 1972) (Hymenoptera: Scelionidae) fue de hasta 50% en África y 30% en China; *Trichogramma chilonis* (Ishii, 1941) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) parasita 24% de los huevos en la India. En Honduras se observó 80% de parasitismo por *Chelonus insularis* (Cresson, 1865) (Hymenoptera: Braconidae) en larvas, y al sur de Texas fue del 43%. En áreas con elevación alta como

Durango (+1,600 m.s.n.m.) se reportaron tasas de hasta 44% de *Campoletis sonorensis* (Cameron, 1886) (Hymenoptera: Ichneumonidae). Otros parasitoides de la familia Tachinidae (Diptera) incluyen a *Lespesia archippivora* (Riley, 1871) y *Winthemia* spp. que emergen desde la pupa; se reportó de 55 hasta 71% de parasitismo, con mayor porcentaje en los meses de julio- agosto.

Bacillus thuringiensis (Berliner, 1915) (Bacillaceae) (Bt) es una bacteria gram-positiva que produce inclusiones cristalinas durante la fase de esporulación; existen dos superfamilias de toxinas: Cry y Cyt. Las proteínas Cry son altamente específicas para cada organismo, son inocuas a humanos, y son biodegradables (Martin y Travers 1989). Se han utilizado como bioinsecticidas en agricultura durante los últimos 40 años. Actualmente se han descrito más de 200 toxinas Cry de Bt. Las toxinas Cry matan al insecto al interaccionar con la membrana de las células del intestino, posteriormente, se insertan en esta membrana formando un poro que termina por romper las células y posteriormente matar al insecto. Cuando un insecto se vuelve resistente, es porque se modificó la proteína que la toxina Cry utiliza como receptor en las células del insecto, es decir la toxina Cry ya no se puede unir a las células y por lo tanto no puede formar el poro o perforación (Dror, et al., 2009; Bryant et al., 2024).

Cuadro 2. Tipos de proteínas Cry y sus hospederos (Bryant, *et al.* 2024).

Tipo de cristal	Grupo	Peso molecula (kDa)	Toxicidad
Bipiramidal	Cry1	130	Lepidópteros
Cubico	Cry2	65	Lepidópteros y Dípteros
Cuadrado aplanado	Cry3	72	Coleópteros
Esférico	Cry4A, Cry4B, Cry10, y Cry11	135,128,78,72	Dípteros

Algunos hongos patógenos de insectos tienen un rango limitado de hospederos, mientras que otras especies tienen un amplio rango de hospederos, por ejemplo, *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Metschn. Sorokin, 1883) (Hypocreales: Clavicipitaceae), *Metarhizium flavoviride* (W. Gams & Rozsypal, 1973) (Hypocreales: Clavicipitaceae) e *Isaria farinosa* (Holmes, 1832) Kepler, B. Shrestha & Spatafora (Hypocreales: Cordycipitaceae) (Licona *et al.*, 2023).

Metarhizium rileyi

Taxonomía

M. rileyi fue descrito como *Botrytis rileyi* cerca de los años 1880's provocando severas infecciones en *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae), *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae), *Trichoplusia ni* (Hübner, 1868) (Lepidoptera: Noctuidae) y *Anticarsia gemmatilis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Erebidae). Más tarde fue renombrado como *Spicaria rileyi* y finalmente como *Nomurea rileyi* por Kish *et al.*, (1974); sin embargo, un análisis molecular usando RAPD y análisis de secuencia (ITS), reportado por

Boucias *et al.*, (2000) determinaron que *N. rileyi* es una especie ubicada filogenéticamente dentro del género *Metarhizium*, es por esto, que en la actualidad se conoce como *M. rileyi*.

Cuadro 3. Especies de lepidópteros susceptibles a *M. rileyi* en diferentes cultivos en el mundo (Li *et al.*, 2023).

Especie	Cultivo	Origen
<i>Achoea janala</i> (Linnaeus, 1758)	Frijol	India
<i>Agrotis ipsilon</i> (Hufnagel, 1766)	Soya	EUA
<i>Spodoptera frugiperda</i>	maíz	México
<i>Spodoptera littoralis</i> (Boisduval, 1833)	Algodón	Israel
<i>Trichoplusia ni</i>	Col, soya y algodón	Rep. dominicana
<i>Heliocoverpa zea</i>	Alfalfa, maíz y soya	África
<i>Pseudoplusia includens</i> (Walker, 1857)	Algodón y soya	EUA

Características morfológicas y fisiológicas

M. rileyi es un hongo entomopatógeno (Ascomycota: Hypocreales); su color varía de blanco-verde pálido a intenso conforme se desarrolla la esporulación. Las hifas son septadas, hialinas, ligeramente pigmentadas, los conidióforos son rectos y septados; forman cadenas divergentes, elipsoidales a veces cilíndricos de color verde pálido. La temperatura óptima para su crecimiento es de 25°C y >80% de humedad relativa (Visalakshi *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2023). La infección comienza con la adhesión del hongo al cuerpo de la larva, continua con la germinación de una conidia (Fig. 3), en un par de días los cuerpos hifales invaden el interior y posteriormente hacia el exterior, produciendo conidias de color blanquecino a verde pálido- intenso señal de la esporulación (Idrees *et al.*, 2021).



Figura 2. Crecimiento de *M. rileyi* sobre *A. gemmatilis* y conidias al microscopio 100x (Idrees *et al.*, 2021).

Producción y formulaciones

Este hongo entomopatógeno cuenta con un crecimiento exigente, ya que requiere de fuentes de nitrógeno como el hidrolizado de levadura, la levadura cervecera o extracto de levadura, necesario para promover su desarrollo micelial, y posterior esporulación; uno de los medios más usados es el medio Sabouraud maltosa con extracto de levadura (SMAY). Esta característica hace que la producción masiva sea difícil y costosa, por otra parte, cuando *M. rileyi* es mantenido a nivel laboratorio, es posible que la patogenicidad/virulencia disminuye al transferirlo constantemente a un medio; sin embargo, la virulencia puede mantenerse al aplicar conidias del hongo sobre hospederos (de Faria y Wraight, 2007; Cepeda *et al.*, 2018;).

Se ha reportado el uso de sustratos sólidos como arroz, soya, sorgo, trigo y cebada como alternativa para solventar estas dificultades (de Faria, *et al.*, 2022). Otro medio sólido usado y con reporte de una alta esporulación de *M. rileyi* fue el uso de granos de mijo. Por otro lado, las condiciones de almacenamiento son relevantes en la producción de masa para la conservación de patogenicidad en las conidias. La crioconservación ha sido reportada para mantener la calidad hasta

18 meses sin afectar la germinación y patogenicidad (Ignoffo y García, 1985, 1982; Wraight y Ramos, 2017).

Para obtener formulaciones de *M. rileyi*, es necesario utilizar productos que permitan la estabilización del hongo; una alternativa es la formulación granular que confiere protección de la radiación UV y servir como sustrato de crecimiento para *M. rileyi*. Otro ejemplo es el granulado derivado de maíz, sin embargo, este puede contener micotoxinas producidas por *Aspergillus flavus* Link (Aspergillaceae) (Maniania y Odulaja, 1998; Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2001).

Una alternativa poco estudiada, son las formulaciones en aceite en combinación con extractos de plantas o aditivos, estos son utilizados sin comprometer la patogenicidad del hongo; sin embargo, el tipo de aceite puede afectar la interacción de *M. rileyi* sobre el insecto y algunos parámetros de la formulación como pH (Vega-Aquino *et al.*, 2010).

Vega-Aquino *et al.* (2010) reporta porcentajes de mortalidad de aceites con conidias de *M. rileyi*: aceite mineral (100%), aceite de canola (93%), aceite de oliva (74%), aceite de girasol (67%), aceite de cacahuete (71%) a los 8 días de la aplicación; siendo más efectivo entre el segundo y tercer estadio de *Spodoptera frugiperda*.

Batta *et al.* (2011) observó porcentajes de mortalidad contra *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) usando una suspensión de conidias de *Zoophthora radicans* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) (57%) y emulsión (suspensión de conidias en aceite, 85%) a una concentración de 1×10^8 conidias/mL. Hasta el momento no existen reportes del uso de conidias *M. rileyi* en emulsiones contra orugas.

JUSTIFICACIÓN

El uso de conidias de *Metarhizium rileyi* en emulsiones puede incrementar su actividad como bioinsecticidas, por lo tanto, es una alternativa que debe investigarse para el manejo de plagas agrícolas.

HIPÓTESIS

El uso de conidias de *M. rileyi* en emulsiones de aceite causará un porcentaje de mortalidad superior al 80% sobre larvas de *S. frugiperda* en laboratorio y campo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de emulsiones de *M. rileyi* sobre larvas de *S. frugiperda* bajo condiciones de laboratorio y campo

Objetivos específicos

1. Aislar e identificar el hongo entomopatógeno *Metarhizium rileyi*.
2. Estimar la virulencia de conidias de *M. rileyi* producidas *in vivo* e *in vitro*.
3. Evaluar el porcentaje de mortalidad en laboratorio sobre larvas de *S. frugiperda*, por conidias de *M. rileyi* en emulsiones.
4. Determinar la viabilidad de conidias de *M. rileyi* en emulsiones bajo dos condiciones de almacenamiento.
5. Evaluar el porcentaje de mortalidad en campo sobre larvas de *S. frugiperda*, por conidias de *M. rileyi* en emulsiones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de trabajo

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Control Biológico y Ecología de insectos, y en las cámaras bioclimáticas del Departamento de Parasitología, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), Saltillo, Coahuila. La parcela experimental (25.357122"N, -101.040596"O) se estableció dentro de la misma universidad.

Origen de las cepas utilizadas

Se aislaron cepas de *M. rileyi* a partir de larvas de *S. frugiperda* colectadas en un campo de maíz ubicado en Pesquería, Nuevo León (25.709446"N-99.795183"O) el 15 de noviembre de 2022. Las larvas se trasladaron al Laboratorio antes mencionado, y se colocaron en cámara húmeda durante 48 horas para promover la producción de conidias, y posteriormente se cultivó en agar SYS (Vega *et al.*, 2010).

Origen de los insectos

Para los diferentes bioensayos realizados en este trabajo, se utilizaron larvas de *S. frugiperda*, así que se estableció una cría de este insecto. Primeramente, se colectaron larvas de campo, que se colocaron individualmente en recipientes de 10 mL, posteriormente se mantuvieron a 25 ± 3 °C, con una humedad relativa > 85% y se les brindó pasto (Poaceae) como alimento (cada tercer día se cambió el alimento). Cuando las larvas entraron a estado de pupa, se preparó un recipiente plástico de 1 L con perforación en la tapa, la cual se cubrió con tela de organza, y dentro se colocó papel de estraza, con un algodón húmedo y las pupas. En cuanto emergieron los adultos se les colocó un algodón empapado de refresco de soda como alimento, y se mantuvieron dentro del recipiente con el fin de que copularan y ovipositaran. En cuanto se observaron los huevecillos estos se colocaron en recipientes de plástico de 500 mL con un algodón húmedo. En cuanto eclosionaron los huevecillos se colocó pasto (Poaceae) para alimentar a las larvas

recién emergidas. Este procedimiento se realizó periódicamente, con el fin de tener suficientes larvas para los diferentes experimentos.

Medio de cultivo

Periódicamente se preparó medio para el aislamiento, cultivo rutinario y producción de los hongos entomopatógenos utilizados en los bioensayos. Se utilizó medio de cultivo agar SYS Agar Sabouraud + 1% extracto de levadura (Solbiosa[®], Guadalajara, México) + 200 mL de caldo de soya (*Glycine max*) [250g de soya en 3L de agua, hervido durante 15 min]]. Se vertieron 15 mL del medio de cultivo descrito anteriormente en cajas Petri de 100 mm y tubos de ensaye con medio inclinado.

Porcentaje de germinación

Previo a cada bioensayo, se realizaron pruebas de germinación de conidias. Primeramente, se tomaron conidias de cada hongo entomopatógeno, se inocularon en tres cajas de Petri con agar SYS y se incubaron a $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, a las 24, 48 y 72 h después de la inoculación, bajo el microscopio, se inspeccionaron tres áreas diferentes en cada caja de Petri con al menos 100 conidias y se registró el número de conidias con tubo de germinación (Boucias y Pendland, 1984; de Faria y Wraight, 2007).

Producción de conidias in vivo

Se preparó una suspensión de conidias de cada hongo a una concentración de 100 mL en agua más 3 μ L de surfactante, se agitó vigorosamente y ajustó hasta obtener una concentración de 1×10^8 conidias/mL, con ayuda de una cámara de Neubauer. Posteriormente, se aplicaron 10 μ L de la suspensión en el dorso de cada larva (estadio L3-4), utilizando una micropipeta (aplicación tópica); cada una, se colocó individualmente en un recipiente de plástico de 20 mL a $25^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ con una humedad relativa $> 85\%$ y se les brindó pasto (Poaceae) como alimento (cada tercer día se cambió el alimento) hasta observar micelio blanco, posteriormente se colocaron en cámara húmeda con un algodón húmedo para favorecer la producción de conidias (Fig. 4). Este proceso se repitió mensualmente hasta el término de la investigación.



Figura 3. Producción de conidias in vivo de *M. rileyi*. A) Larvas de *S. frugiperda* con micelio previo a la esporulación, B) Larvas de *S. frugiperda* con conidias, C) Larvas de *S. frugiperda* en cámara húmeda

Suspensiones, emulsiones y preparación en salvado

Se prepararon suspensiones para las pruebas realizadas en los objetivos 2 al 5. En 100 mL de agua se agregaron 3 μ L de surfactante y 1×10^8 conidias/mL.

Para las emulsiones evaluadas, se utilizaron dos aceites: mineral y de soya. En una licuadora se colocaron 5 μ L del aceite en 100 mL de agua más 3 μ L de surfactante, con una concentración de 1×10^8 conidias/mL. Posteriormente se mezcló en la licuadora comercial Oster durante 15 min, enseguida las suspensiones se filtraron con tela de organza y fueron colocadas en un recipiente etiquetado. Este procedimiento se repitió para todos los tratamientos (Biaggioni *et al.*, 2020; Ingle *et al.*, 2008).

Para la evaluación de los hongos entomopatógenos en gránulos, primeramente, en un recipiente de 10 mL se colocó 1 gr de salvado y dos larvas de *S. frugiperda* con conidias, enseguida se agitó durante cinco minutos. Se tomó una alícuota de salvado y se colocó en un 1 mL de agua, finalmente se ajustó la concentración a 1×10^8 conidias/mL con ayuda de una cámara de Neubauer, y añadiendo el salvado requerido para la dilución (Bindu *et al.*, 2018). Todos los tratamientos se aplicaron dentro de las dos horas posteriores a su preparación.

Análisis estadístico

Los datos de mortalidad se transformaron para la normalización utilizando el procedimiento de raíz cuadrada de arcoseno; Los datos originales se expresaron como proporción. Los datos de mortalidad no se corrigieron debido a que la mortalidad del testigo no fue mayor al 5%. Una vez transformados, los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una comparación de medias, que se efectuó mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05 en VassarStats (Ingle *et al.*, 2008).

Objetivo 1. Aislamiento e identificación de cepas

Se aisló la cepa de *M. rileyi* (V1) a partir de larvas de *S. frugiperda* colectadas en un campo de maíz en Pesquería, N.L. Las larvas se trasladaron al Laboratorio, y se colocaron en cámara húmeda durante 48 horas para promover la producción de conidias, posteriormente se cultivó en agar SYS (Vega *et al.*, 2010, Fig. 5).

La cepa BB1 de *Beauveria bassiana* se obtuvo en un trabajo anterior; fue aislada de suelo agrícola de Galeana, NL, mediante la técnica del insecto cebo (Sánchez-Peña *et al.* 2011).

Para verificar la identificación de las cepas V1 y BB1, se analizaron molecularmente en Biociencia, Monterrey, Nuevo León, México (<http://www.biociencia.com.mx>) para la secuenciación de ADN de un fragmento de la región del Factor de elongación 1 (TEF-1). El ADN se extrajo de cultivo en medio líquido siguiendo el procedimiento de Doyle y Doyle (1987) modificado por SENASICA (2022). Los primers utilizados fueron: EF-1 5'-ATGGGTAAGGARGAGAAGAC-3' y EF-1: 5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3'. La secuenciación de los productos de PCR fue proporcionada por Biociencia. Se compararon secuencias (BLAST) en la base de datos del NCBI para determinar el porcentaje de identidad de especies y se depositaron en la base de datos GenBank.



Figura 4. Aislamiento de *M. rileyi* por estría simple en medio de cultivo agar SYS.

Objetivo 2. Estimar la virulencia de conidias de *M. rileyi* producidas in vivo e in vitro sobre *S. frugiperda* en laboratorio

Para estimar la virulencia de conidias de *M. rileyi* se evaluaron tres tratamientos; 1) suspensión de conidias in vivo (1×10^8 conidias/mL); 2) suspensión de conidias in vitro (1×10^8 conidias/mL) y 3) un testigo (surfactante al 0.03%). Se colocaron 4 repeticiones (40 larvas entre L3 – L4 c/u) por tratamiento, y se aplicaron 10 μ L de los tratamientos a evaluar en cada larva. Finalmente, a los siete días se registró número de larvas muertas. Se consideraron muertas las larvas que presentaban ausencia de movilidad y micelio de coloración blanca o verde (Della y Monteiro, 2008).

Objetivo 3. Evaluar la mortalidad en laboratorio de larvas de *S. frugiperda*, por conidias de *M. rileyi* en emulsiones

Las emulsiones se prepararon con los siguientes compuestos: aceite mineral (Stylet-Oil®, Gowan, Mexicali, México) y aceite de soya (Carrier®, Stoller, Guadalajara) a una concentración de 1×10^8 conidias/mL por cada emulsión, además de 2 testigos con la misma composición, pero sin conidias y un testigo que consistió en una suspensión sin conidias (surfactante al 0.03%) (Celestino *et al.*, 2016). Se colocaron 10 repeticiones (de 10 larvas entre L3 – L4 c/u= 100 larvas en total) por tratamiento, y se aplicaron 10 μ L de los tratamientos a evaluar en cada larva como se indicó previamente. Finalmente, a los siete días se registró número de larvas muertas. Se consideró muertas las larvas que presentaban ausencia de movilidad y micelio de coloración blanca o verde (Biaggioni *et al.*, 2020; Ingle *et al.*, 2008).

Objetivo 4. Determinar la viabilidad de conidias de *M. rileyi* en emulsiones bajo dos condiciones de almacenamiento

Las emulsiones de *M. rileyi* descritas en el objetivo 3, se almacenaron a 4°C (refrigeración) y 25°C $\pm$ 3 °C (ambiente); posteriormente a los 45 días se evaluaron el porcentaje de germinación y su efecto sobre las larvas de *S. frugiperda*. Se colocaron 10 repeticiones (de 10 larvas entre L3 – L4 c/u= 100 larvas en total) por tratamiento, y se aplicaron 10 μ L de los tratamientos a evaluar en cada larva. Finalmente, a los siete días se registró número de larvas muertas. Se consideraron muertas las larvas que presentaban ausencia de movilidad y micelio de coloración blanca o verde.

Objetivo 5. Evaluar la mortalidad en campo sobre larvas de *S. frugiperda*, por conidias de *M. rileyi* en emulsiones

Se evaluaron nueve tratamientos (cuadro 1) siguiendo la metodología ya descrita para suspensiones, emulsiones y preparaciones en salvado (Ingle *et al.*, 2008; Biaggioni *et al.*, 2020). Se incluyeron suspensiones de *B. bassiana* como comparación, pues se trata de un hongo entomopatógeno ampliamente utilizado en control biológico a nivel mundial. Para la prueba de campo, se utilizó una parcela del híbrido de maíz variedad Genex 724 con 26 surcos de 100 metros c/u. Se estableció el cultivo en una parcela experimental de la UAAAN, Saltillo, Coahuila con riego por goteo, no se aplicaron plaguicidas. Previo a la aplicación de tratamientos, se realizó un monitoreo para verificar la presencia de *S. frugiperda*. El bioensayo consistió en 10 repeticiones c/ 10 plantas de maíz (100 plantas en total) por tratamiento con un diseño de bloques al azar y se aplicó 1 mL o 1 gr de cada tratamiento en el centro de la planta de maíz. Finalmente, a los siete días se registró número de larvas muertas. Se consideraron muertas las larvas que presentaban ausencia de movilidad y presencia de micelio de coloración blanca o verde.

Cuadro 4. Tratamientos evaluados sobre larvas *S. frugiperda* aplicados bajo condiciones de campo en Saltillo, Coahuila.

No. Tratamiento	Emulsiones
1	Sin aplicación (control absoluto)
2	0.03% de surfactante en agua
3	0.05% de aceite mineral + 0.03% de surfactante en agua
4	0.05% de aceite de soya + 0.03% de surfactante en agua
5	0.03% surfactante en agua + 1×10^8 conidias/mL de <i>M. rileyi</i> ,
6	0.05% Aceite mineral + 0.03% surfactante + 1×10^8 conidias/mL de <i>M. rileyi</i>
7	0.05% Aceite de soya + 0.03% surfactante + 1×10^8 conidias/mL de <i>M. rileyi</i>
8	Salvado + 1×10^8 conidias/mL de <i>M. rileyi</i>
9	0.03% surfactante + 1×10^8 conidias/mL de <i>B. bassiana</i>

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Objetivo 1. Aislar e identificar cepas de *M. rileyi*.

Se corroboraron las características de crecimiento macro y microscópicas en las larvas infectadas (A, B) y en agar SYS (C); coloración blanquecina que posteriormente se tornó verde (Fig. 6), lo que indica formación de fiálides y conidias ovoides en cadenas cortas (D), lo cual concuerda con lo reportado por Visalakshi *et al.* (2020); Acharya *et al.* (2022). Además, *M. rileyi* (V1) y *B. bassiana* (B1) fueron secuenciadas y la información se compartió en GenBank (código de acceso: PQ479188) para *M. rileyi*.

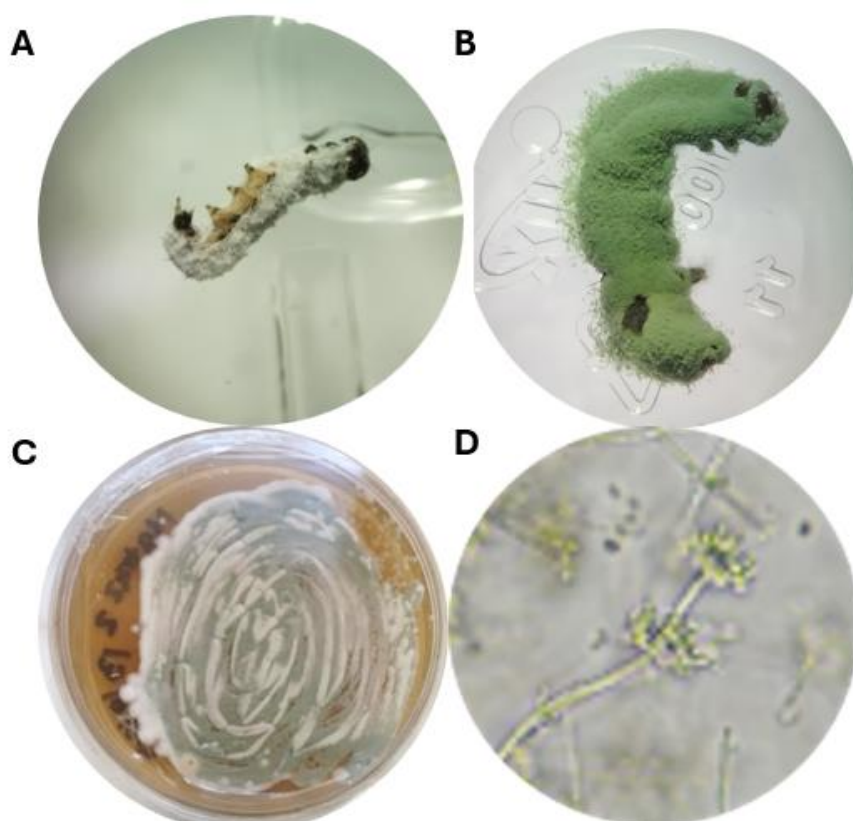


Figura 5. A) Micelio de *M. rileyi* sobre larvas de *S. frugiperda*, B) Conidios de *M. rileyi* sobre larvas de *S. frugiperda*, C) *M. rileyi* en agar SYS y D) Morfología microscópica: Formación de fiálides en verticilos y conidias ovoides en cadenas cortas.

Objetivo 2. Estimar la virulencia de conidias de *M. rileyi* producidos in vivo e in vitro contra *S. frugiperda* en laboratorio

A los siete días de la inoculación, se observó una mayor mortalidad causada por conidias in vitro: $62 \pm \text{SE} = 4.78\%$ (T1) seguido de $37 \pm \text{SE} = 2.5\%$ in vivo (T2) y 0% en el testigo (T3). El análisis estadístico de medias indicó una diferencia significativa ($p < 0.0001$) entre los tres tratamientos (Fig.7). Caro *et al.* (2005) mencionan que los sustratos utilizados para producir conidias de *M. rileyi* afectan la actividad de biocontrol con excepción del sustrato de soya, en el cual se observó un alto rendimiento de conidias que causó mortalidades mayores al 80% en larvas de *S. frugiperda*. Por otro lado, en hongos entomopatógenos como *B. bassiana* y *M. anisopliae*, el crecimiento y la virulencia no se redujeron en cultivos in vitro (de Faria y Wraight, 2007; Cepeda *et al.*, 2018).

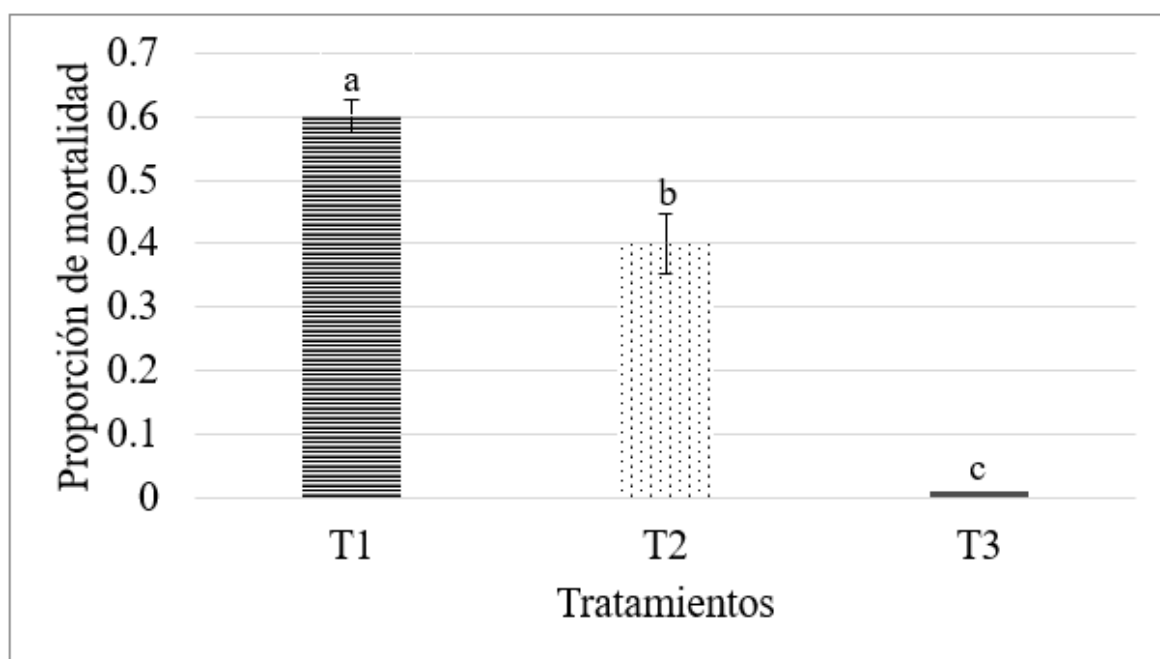


Figura 6. Mortalidad media causada por: T1: conidias cultivadas en agar SYS + surfactante al 0.03%, T2: conidias de *M. rileyi* provenientes de larvas + surfactante al 0.03% y T3: surfactante al 0.03% en agua sobre larvas de *S. frugiperda*. Barra= error estándar de la media. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Prueba de Tukey, $p < 0.05$).

Objetivo 3. Evaluar el porcentaje de mortalidad en laboratorio sobre larvas de *S. frugiperda*, por conidias de *M. rileyi* en emulsiones

La emulsión de aceite mineral causó una mortalidad media del $70 \pm \text{SE} = 2.58\%$ en larvas de *S. frugiperda*, seguido de la emulsión de aceite de soya con $48 \pm \text{SE} = 2.9\%$, en comparación con los testigos (tratamientos 3, 4 y 5), donde no se observó mortalidad. El análisis estadístico indicó una diferencia significativa de $p < 0.0001$ entre los tratamientos 1 y 2. Vega *et al.*, (2010) menciona que el uso de aceite mineral y de soya puede causar mortalidades mayores al 90% de *S. frugiperda* en el laboratorio; estos datos se pueden diferir debido a la composición de la formulación. Batta (2003) menciona que al utilizar formulaciones base aceite con coco y soya, por separado, más conidias de *M. anisopliae* sobre ninfas de *Bemisia tabaci* y *Tetranychus cinnabarinus* causaron 66 y 58% de mortalidad, respectivamente, 3 días posteriores a la aplicación en el laboratorio, lo cual concuerda con nuestros resultados (Fig. 8).

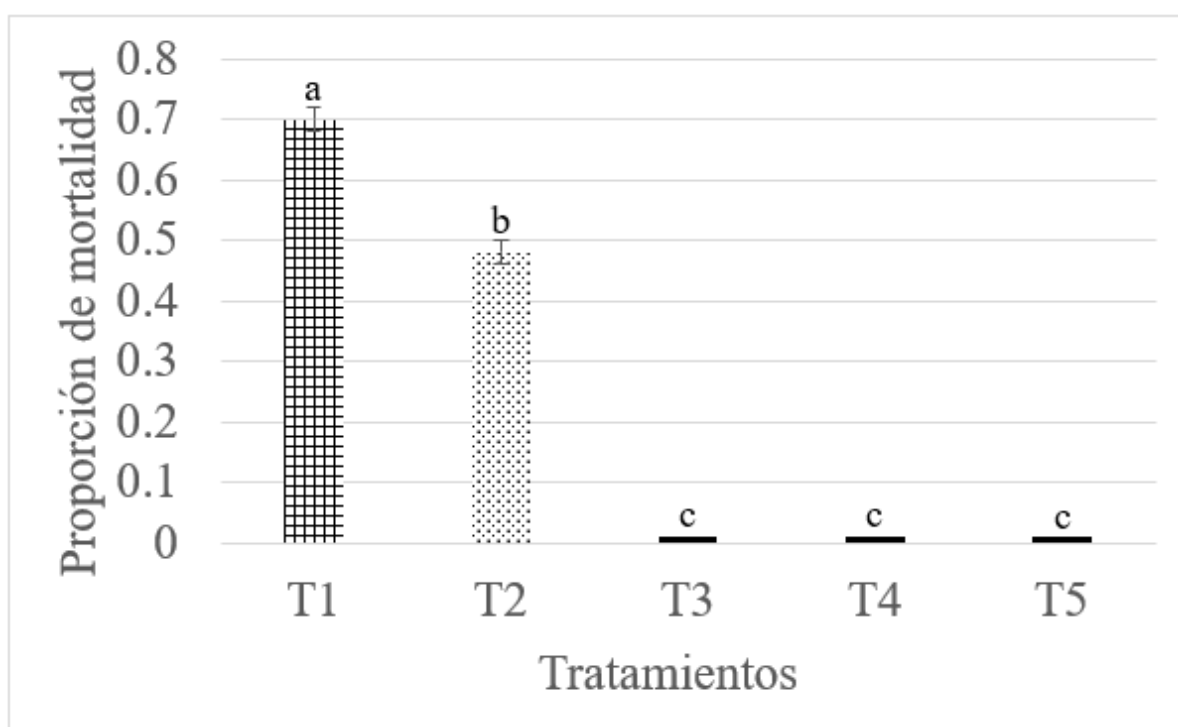


Figura 7. Mortalidad media de *S. frugiperda* en laboratorio causada por: T1: aceite mineral + surfactante al 0.03% + *M. rileyi*, T2: aceite de soya + surfactante

al 0.03% + *M. rileyi*, T3: aceite mineral + surfactante 0.03%, T4: aceite de soya + surfactante 0.03%, T5: surfactante 0.03%. Barra=error estándar de la media. Los valores de medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Prueba de Tukey, $p < 0.05$).

Objetivo 4. Determinar la viabilidad de conidias de *M. rileyi* en emulsiones bajo dos condiciones de almacenamiento

Después de 45 días de almacenamiento a 4°C, la emulsión de aceite mineral almacenada causó $53 \pm SE = 4.6\%$ y el aceite de soya $5.0 \pm SE = 4\%$ de mortalidad media. El análisis estadístico indicó una diferencia significativa de $p < 0.002$ en comparación con el resto de los tratamientos donde no se observó mortalidad (Fig. 9). En cuanto a la emulsión de aceite mineral y aceite de soya almacenada a 4°C, hubo reducciones significativas de 27 y 43%, respectivamente en comparación con la mortalidad causada por emulsiones utilizadas inmediatamente después de su preparación ($p < 0.0001$). Nuestros resultados concuerdan con Montecalvo *et al.*, (2023), mencionan que las condiciones y el tiempo de almacenamiento afectan la eficiencia de las formulaciones en comparación con las formulaciones preparadas y utilizadas en el momento; observaron 20 y 40% de mortalidad en larvas de *S. frugiperda* causadas por conidias de almacenamiento a 4 y 25°C, respectivamente (de Faria *et al.*, 2022; Batta 2003).

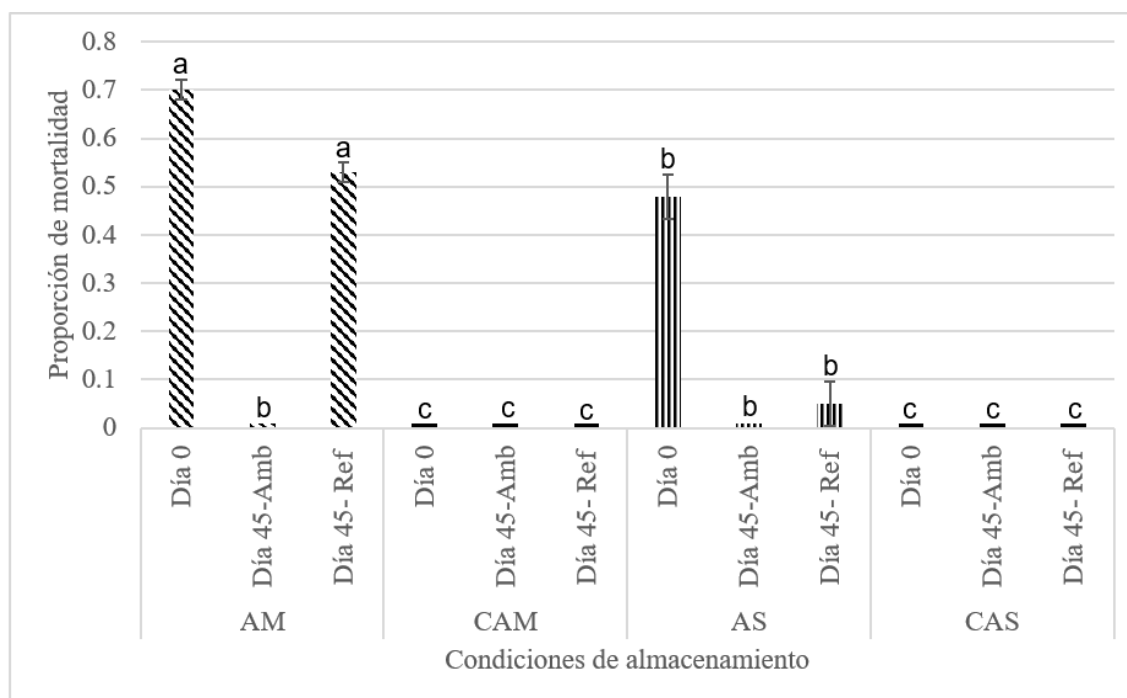


Figura 8. Mortalidad media de *S. frugiperda* en laboratorio causada por emulsiones almacenadas bajo dos condiciones: AM: Aceite mineral + surfactante al 0.03% + *M. rileyi* (día 0, día 45 a 25°C $\pm$ 5°C y día 45 a 4°C), Testigo (CAM): aceite mineral + surfactante al 0.03% (día 0, día 45 a 25°C $\pm$ 5°C y día 45 a 4°C). AS: aceite de soya + surfactante al 0.03%+ *M. rileyi* (día 0, día 45 a 25°C $\pm$ 5°C y día 45 a 4°C), testigo (CAS): Aceite de soya + surfactante al 0.03% (día 0, día 45 a 25°C $\pm$ 5°C y día 45 a 4°C). Barra= error estándar de la media. Los valores de medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Prueba de Tukey, $p < 0.05$).

Objetivo 5. Evaluar el porcentaje de mortalidad en campo sobre larvas de *S. frugiperda*, por conidias de *M. rileyi* en emulsiones

La emulsión de aceite mineral causó $81 \pm SE = 5.77\%$ de mortalidad en larvas de *S. frugiperda* seguido de la emulsión de aceite de soya, salvado y suspensión de *B. bassiana* (T9); en comparación, en los tratamientos testigos no se observó ninguna mortalidad: testigo absoluto (T1), surfactante al 0.03% (T2), aceite mineral + surfactante al 0.03% (T3) y aceite de soya + surfactante al 0.03% (T4). El análisis estadístico indicó una diferencia significativa entre todos los tratamientos ($p < 0.0001$) sin embargo, no hubo diferencia significativa entre las emulsiones de aceite mineral y de soya con conidias de *M. rileyi*. Montecalvo *et al.*, (2023) menciona que al aplicar conidias de *M. rileyi* con aceites directamente al campo, se observó hasta un 50% de mortalidad en larvas; asimismo, menciona que al aplicar una emulsión oleosa y una suspensión líquida puras en campos de maíz sobre larvas de *S. frugiperda* se observaron tasas de mortalidad de 27% y 21%. Deducimos que el porcentaje de mortalidad obtenido en la presente investigación es mayor y se observó en menor tiempo (Biaggioni *et al.*, 2020). González-Morales *et al.* (2009) y Barros *et al.* (2021) mencionan que, al utilizar los productos a base de *B. thuringiensis* y *B. bassiana* en el control de *S. frugiperda* en campo, este último hongo resultó ser el menos efectivo con 49.33% de mortalidad (Fig. 10).

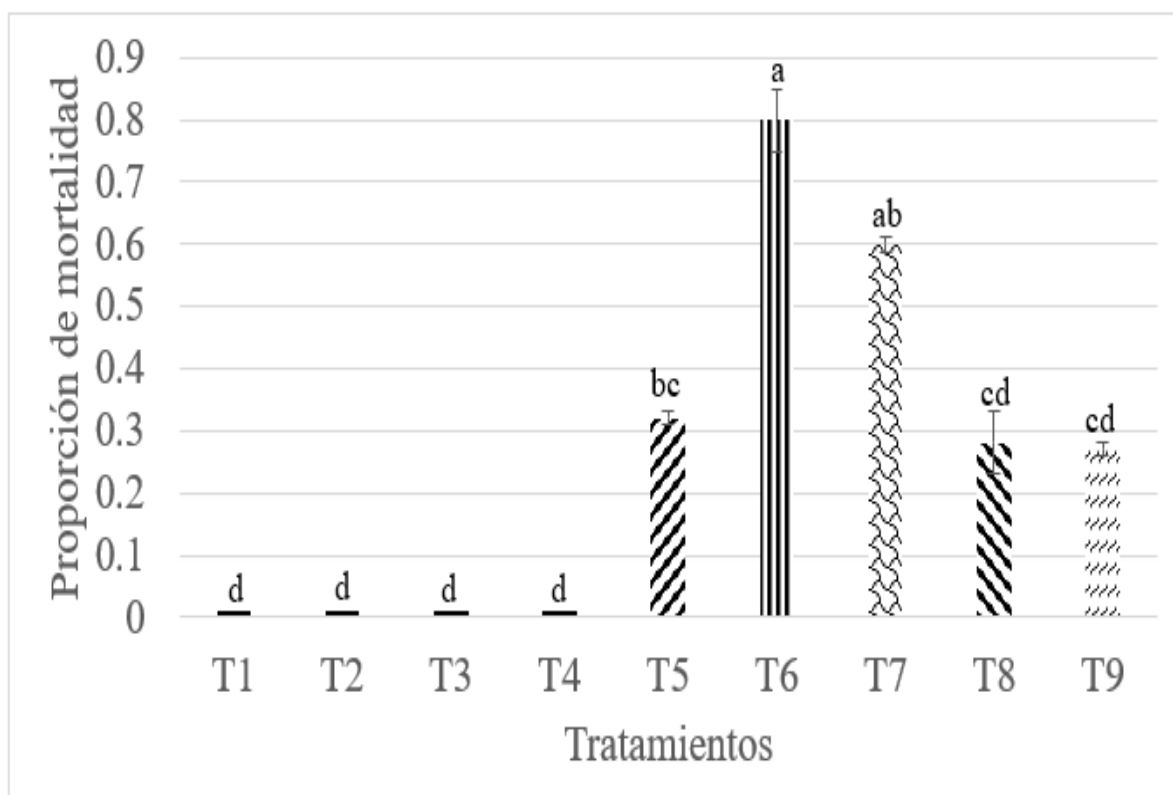


Figura 9. Mortalidad media de larvas de *S. frugiperda* causada por las formulaciones con *M. rileyi* en Saltillo, Coahuila (cuadro 4). Barra= error estándar de la media. Los valores de medias con la misma letra no son significativamente diferentes (prueba de Tukey, $p < 0.05$).



Figura 10. Larvas micosadas por *M. rileyi* colectadas después de siete días de la aplicación en campo de maíz, Saltillo, Coahuila

CONCLUSIONES

El hongo entomopatógeno *Metarhizium rileyi* es un agente promisorio de control biológico de gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda*. En este trabajo, se observó que la producción de conidias en condiciones in vitro no mostró efectos adversos sobre la virulencia de *M. rileyi*, comparado con conidias producidas in vivo (en insectos). Esta consideración es relevante en la producción de este organismo benéfico en medios artificiales.

La emulsión de aceite mineral con *M. rileyi* produjo una mortalidad significativamente mayor en condiciones de campo que en laboratorio.

Una emulsión almacenada durante 45 días a una temperatura de 4°C mantiene su efectividad de mortalidad sobre *S. frugiperda* en pruebas de laboratorio.

Los resultados de este estudio confirman el potencial de *M. rileyi* como una herramienta eficaz de control biológico del gusano cogollero en cultivos de maíz, y asimismo proporcionan una base para el desarrollo de formulaciones y la estandarización de procesos de aplicación en condiciones de campo. Los tratamientos evaluados incluyen preparaciones de fácil implementación en el cultivo de maíz; se pueden aplicar con equipo de aspersión convencional, y los componentes de las mezclas evaluadas se pueden obtener con facilidad en el ámbito agrícola nacional. Retos importantes para la implementación de este hongo en programas de control biológico de *S. frugiperda* consisten en la selección de cepas virulentas y su producción en medio artificial a un costo competitivo y de manera estandarizada.

Esta investigación contribuye al avance de estrategias sostenibles en la agricultura, ofreciendo una alternativa viable a los métodos tradicionales de control químico. Este trabajo, por tanto, tiene implicaciones significativas tanto para la ciencia como para la práctica agrícola, al sentar las bases para futuras investigaciones y aplicaciones comerciales que promuevan un manejo más sostenible y ambientalmente responsable de las plagas agrícolas.

REFERENCIAS

- Abrahams, P., Bateman, M., Beale, T., Clottey, V., Cock, M., & Colmenarez, Y. (2017). Fall Armyworm: Impacts and Implications for Africa. *Outlooks on Pest Management*, 28(5), 196-201.
- Acharya, R., Lee, J. Y., Hwang, H. S., Kim, M. K., Lee, S. Y., Jung, H. Y., Park, I., & Lee, K. Y. (2022). Identification of entomopathogenic fungus *Metarhizium rileyi* infested in fall armyworm in the cornfield of Korea, and evaluation of its virulence. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 111(4). <https://doi.org/10.1002/arch.21965>
- Ahissou, B. R., Sawadogo, W. M., Bokonon-Ganta, A., Somda, I., & Verheggen, F. (2021). Integrated pest management options for the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in West Africa: Challenges and opportunities. A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 25, 192-207.
- Akbar, W., Lord, J. C., Nechols, J. R., & Tisdale, R. A. (2005). Efficacy of *Beauveria bassiana* for red flour beetle when applied with plant essential oils or in mineral oil and organosilicone carriers. *Journal of Economic Entomology*, 98(3), 683-688.
- Aldrich, S. R., Scott, W. O., & Hoeft, R. G. (1986). Modern corn production (3rd ed.). A y L Publications, Inc.
- Allen, G. E., Greene, G. L., & Whitcomb, W. H. (1971). An epizootic of *Spicaria rileyi* on the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*, in Florida. *Florida Entomologist*, 54(2), 189-191.
- Barros, S. K. A., de Almeida, E. G., Ferreira, F. T., & Tuelher, E. S. (2021). Field efficacy of *Metarhizium rileyi* applications against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *Neotropical Entomology*, 50, 976-988.
- Batta, Y. A. (2003). Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Crop Protection*, 22(2), 415-422. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00200-4](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00200-4)
- Batta, Y., Rahman, M. M., Powis, K., Baker, G., & Schmidt, O. (2011). Formulation and application of the entomopathogenic fungus, *Zoopthora radicans* (Brefeld) Batko (Zygomycetes: Entomophthorales). *Journal of Applied Microbiology*, 110, 831-839.
- Bhusal, K., & Bhattarai, K. (2019). A review on fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) and its possible management options in Nepal. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 7(4), 1289-1292.

Biaggioni, R., Sosa, D., & Martins, C. (2020). Efficacy of an oil-based formulation combining *Metarhizium rileyi* and nucleopolyhedroviruses against lepidopteran pests of soybean. *Journal of Applied Entomology*, 144(8), 678-689. <https://doi.org/10.1111/jen.12787>

Bindu, B., Manjula, G. K., & Ramakrishna, R. (2018). Efficacy of oil-based formulations of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson against *Spodoptera litura* in vitro. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(10), 3413-3422. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.710.396>

Blanco, C. A., Pellegaud, J. G., Nava-Camberos, U., Lugo-Barrera, D., Vega-Aquino, P., Coello, J., Terán-Vargas, A. P., & Vargas-Camplis, J. (2014). Maize pests in Mexico and challenges for the adoption of integrated pest management programs. *Journal of Integrated Pest Management*, 5(4), E1-E9. <https://doi.org/10.1603/IPM14006>

Boucias, D., & Pendland, J. (1984). Nutritional requirements for conidial germination of several host range pathotypes of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 43(2), 288-292. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(84\)90153-8](https://doi.org/10.1016/0022-2011(84)90153-8)

Boucias, D., Tigano, M., Sosa, D., Glare, T., & Inglis, P. (2000). Genotypic properties of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Biological Control*, 19, 124-138.

Bryant, T. B., Greene, J. K., Reisig, D., & Reay-Jones, F. P. F. (2024). Continued decline in sublethal effects of Bt toxins on *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in field corn. *Journal of Economic Entomology*. <https://doi.org/10.1093/jee/toae152>

Caro, C., Villamizar, L., Espinel, L., & Cotes, A. (2005). Efecto del medio de cultivo en la virulencia de *Nomuraea rileyi* sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 31(1), 79-88.

Casique-Valdés, R., Sánchez-Lara, B., Ek-Maas, J., Hernández-Guerra, C., Bidochka, M., Guízar-Guzmán, L., López-Arroyo, J., & Sánchez-Peña, S. (2015). Field trial of aqueous and emulsion preparations of entomopathogenic fungi against the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae) in a lime orchard in Mexico. *Journal of Entomological Science*, 50(1), 79-87. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-50.1.79>

Celestino, F. N., Pratissoli, D., & Machado, L. (2016). Control of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) with botanical insecticides and mineral oils. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 38(1), 1-8. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i1.27430>

Cepeda, M., Garrido, F., & Castro, E. (2018). Infección in vitro de cepas de *Beauveria spp.* sobre *Globodera rostochiensis* Wollenweber (1923). *Acta Universitaria*, 28(4), 25-30. <https://doi.org/10.15174/au.2018.1714>

Cerna, E., Arispe, J., Mayo, J., Aguirre, L., Ochoa, Y., Hernández, A., & Castro, E. (2022). Perspectiva actual del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) y su resistencia desarrollada a insecticidas. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 25, 57.

Chand, R. R., & Cridge, B. J. (2020). Upscaling pest management from parks to countries: A New Zealand case study. *Journal of Integrated Pest Management*, 11(1), 8. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmaa006>

CONABIO. (2022). *Maíces: Biodiversidad mexicana*. <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/maices>

Cui, Y., Ren, Y., Lyu, M., Zheng, S., Feng, Q., & Xiang, H. (2019). Genomic divergences between the two polyphagous *Spodoptera* relatives provide cues for successful invasion of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *GigaScience*, 8(7), giz087. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz087>

de Faria, M. R., & Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237-256. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>

de Faria, M., Souza, D. A., Sanches, M. M., & Souza, E. (2022). Evaluation of key parameters for developing a *Metarhizium rileyi*-based biopesticide against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize: Laboratory, greenhouse, and field trials. *Pest Management Science*, 78(3), 1146-1154.

Della Vedova, G., & Monteiro, A. C. (2008). Effect of entomopathogenic fungi on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae under laboratory conditions. *Neotropical Entomology*, 37(3), 293-298. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2008000300002>

Deshmukh, S. S., Prasanna, B. M., Kalleshwaraswamy, C. M., & Bharathi, M. Z. (2021). Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *Indian Journal of Entomology*, 82(3), 349-372. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8075-8_8

Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), 11-15.

Dror, A., Haviva, E., Menachem, K., Noam, R., Michal, S., Baruch, S., & Aviah, Z. (2009). The *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C as a potential bioinsecticide in plants. *Plant Science*, 176, 315–324.

Eckard, S., Ansari, M. A., Bacher, S., Butt, T. M., Enkerli, J., & Grabenweger, G. (2014). Virulence of in vivo and in vitro produced conidia of *Metarhizium brunneum* strains for control of wireworms. *Crop Protection*, 64, 137-142. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.017>

Getzin, L. W. (1961). *Spicaria rileyi* (Farlow) Charles, an entomogenous fungus of *Trichoplusia ni* (Hübner). *Journal of Insect Pathology*, 3, 2-10.

González-Morales, S., Pineda, S., Lezama-Gutiérrez, R., & López-Edwards, M. (2009). Susceptibility of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), to a native *Nomuraea rileyi* strain in Mexico. *Southwestern Entomologist*, 34(2), 121-128. <https://doi.org/10.3958/059.034.0202>

Gutiérrez, R., Mota, D., Blanco, C. A., & Terán-Vargas, A. P. (2018). Field-evolved resistance of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to synthetic insecticides in Puerto Rico and Mexico. *Journal of Economic Entomology*, 112(2), 792-802.

Hardke, J.T., Lorenz III, G.M., Leonard, B.R. (2015). Fall armyworm (Lepidoptera:Noctuidae) ecology in southeastern cotton. *Journal of Integrated Pest Management*. 6(1), 10.

Idrees, A., Qadir, Z. A., Akutse, K. S., Afzal, A., Hussain, M., Islam, W., & Khan, M. F. (2021). Effectiveness of entomopathogenic fungi on immature stages and feeding performance of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Insects*, 12(11), 1044. <https://doi.org/10.3390/insects12111044>

Ignoffo, C. M., & Garcia, C. (1985). Host spectrum and relative virulence of an Ecuadorian and a Mississippian biotype of *Nomuraea rileyi*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 45(3), 346-352.

Ignoffo, C. M., Marston, N. L., Hostetter, D. L., & Garcia, C. (1976). Natural and induced epizootics of *Nomuraea rileyi* in soybean caterpillars. *Journal of Invertebrate Pathology*, 27, 191-198.

Ignoffo, C. M., McIntosh, A. H., Garcia, C., & Hostetter, D. L. (1982). Effects of successive in vitro and in vivo passages on the virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. *Entomophaga*, 27, 371-378.

Ingle, Y. V., Raut, B. T., Pardey, V. P., & Dhake, A. B. (2008). Efficacy of oil formulation of *Nomurea rileyi* against *Helicoverpa armigera* on chickpea. *International Journal of Plant Protection*, 1(2), 88-91. http://researchjournal.co.in/upload/assignments/1_88-91-1.pdf

Inglis, G. D., Jaronski, S. T., & Wraight, S. P. (2002). Use of spray oils with entomopathogens. In A. Beattie, D. Watson, M. Stevens, D. Rae, & R.

Spooner-Hart (Eds.), *Spray Oils Beyond 2000: Sustainable Pest and Disease Management* (pp. 302-312). Sidney, Australia: University of Western Sidney.

Kenis, M. (2023). Prospects for classical biological control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in invaded areas using parasitoids from the Americas. *Journal of Economic Entomology*, 116(2), 331–341. <https://doi.org/10.1093/jee/toad029>

Kish, L., Samson, R., & Allen, G. (1974). The genus *Nomuraea* Maublanc. *Journal of Invertebrate Pathology*, 24(2), 154–158.

Lezama-Gutiérrez, R., Molina-Ochoa, J., Chavez-Flores, O., López-Edwards, M., Pescador, A. R., & Hamm, J. J. (2001). Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok. (Deuteromycetes) to four species of noctuid lepidoptera. *Southwestern Entomologist*, 26(1), 97-103.

Li, L., Zhong, K., Wang, J. L., & Liu, X. S. (2020). Mechanism of *Metarhizium rileyi* to suppress the immune response in *Spodoptera frugiperda* larvae through the Toll signaling pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(23), 6201-6209. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02375>

Licona, K. C., Andrade, E. P., Medina, H. R. (2023). Tolerance to UV-B radiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium rileyi*. *Fungal Biology*, 127(8), 1250-1258. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2023.04.004>

Maniania, N. K., & Odulaja, A. (1998). Effect of temperature and relative humidity on virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*. *Biocontrol Science and Technology*, 8(3), 317-327. <https://doi.org/10.1080/09583159830095>

Martin, P. A. W., & Travers, R. S. (1989). Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(10), 2437-2442.

Maublanc, A. (1903). Sur quelques espèces nouvelles de champignons inférieurs. *Bulletin de la Société Mycologique de France*, 19(3), 291-296.

Mays, D. T. (2015). Mycotoxin management in maize (*Zea mays* (L.)) damaged by lepidopteran pests. Available from Dissertations & <http://0-search.proquest.com.oasis.lib.tamuk.edu/dissertations-theses/mycotoxin-management-maize-i-zea-mays-l-damaged/docview/1761625370/se-2>

Meagher, R. L., Nagoshi, R. N., & Hay-Roe, M. M. (2016). The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in South America: A view from the North. *Florida Entomologist*, 99(3), 495-497. <https://doi.org/10.1653/024.099.0324>

Montecalvo, M. P., Macaraig, J. S., Navasero, M. M., et al. (2023). Effect of emulsifiable concentrate of *Metarhizium rileyi* (Farl.) Kepler, S.A. Rehner &

Humber to third larval instar of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *International Journal of Agricultural Technology*, 19(1), 175-188.

Pendland, J. C., Lopez, C., & Boucias, D. G. (1994). Laminin-binding sites on cell walls of the entomopathogen *Nomuraea rileyi* associated with growth and adherence to host tissues. *Mycologia*, 86(3), 327-335.

Petch, T. (1925). Studies in entomogenous fungi. VII. Spicaria. Transactions of the British Mycological Society, 10(3), 183-189.

Sagar, G. C., Bhusal, A., & Khatri, L. (2020). An introduction of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) with management strategies: A review paper. *Nippon Journal of Environmental Science*, 1(4), 1010. <https://doi.org/10.46266/njes.1010>

Sánchez-Peña, S. R. (1990). Some insect and spider pathogenic fungi from Mexico with data on their host ranges. *Florida Entomologist*, 73(3), 517-522.

Sánchez-Peña, S. R. (2000). Entomopathogens from two Chihuahuan desert localities in Mexico. *BioControl*, 45, 63-78.

Sánchez-Peña SR, San Juan-Lara J, Medina RF. 2011. Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, Mexico, and their virulence towards thrips and whiteflies. *J. Insect Science*.11(1): 1.

SENASICA. (2022). *Protocolo de diagnóstico: Fusarium oxysporum f. sp. cubense Raza 4 Tropical (Marchitez por Fusarium) [Versión 2.0]*. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Dirección General de Sanidad Vegetal, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/765556/Protocolo_Foc_R4T.pdf

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2022). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>

Vega-Aquino, P., Sánchez-Peña, S. R., & Blanco, 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. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.12.002>

Visalakshi, M., Kishore P., Chandra, V., Bharathalaxmi, B., and Upendhar, S. (2020). Studies on mycosis of *Metarhizium (Nomuraea) rileyi* on *Spodoptera frugiperda* infesting maize in Andhra Pradesh, India. *Egyptian Journal of Biological PestControl*.30:135 <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00335-9>.

Westbrook, J. K., López, J. D., & Meagher, R. L. (2020). Long-distance migration of *Spodoptera frugiperda* moths from Texas to the Northern United States and Canada. *Journal of Economic Entomology*, 113(5), 2070-2080. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa155>

Wraight, S. P., & Ramos, M. E. (2017). Effects of inoculation method on efficacy of wettable powder and oil dispersion formulations of *Beauveria bassiana* against Colorado potato beetle larvae under low-humidity conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 27(3), 348-363.

Zhou, X., Zhang, Y., & Li, S. (2020). Effects of *Spodoptera frugiperda* on corn yield and economic thresholds. *Journal of Economic Entomology*, 113(1), 280-289. <https://doi.org/10.1093/jee/toz264>

**Activity of Granular Preparations, Aqueous Suspensions and
Oil Emulsions of *Metarhizium rileyi* (Ascomycota:
Hypocreales) Against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:
Noctuidae) Larvae on Field Maize**

Journal:	<i>Journal of Economic Entomology</i>
Manuscript ID	ECONENT-2024-0415
Manuscript Type:	Research
Date Submitted by the Author:	03-Jun-2024
Complete List of Authors:	Martinez-Ponce, Viridiana; Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro, Parasitologia Camacho-Ponce, Diego; Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro, Parasitologia Sanchez- Peña, Sergio Rene; Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro, Parasitologia
Please choose a section from the list:	Biological and Microbial Control
Field Keywords:	Biological Control, Agricultural Entomology, Field & Forage Crops
Organism Keywords:	Beauveria, Metarhizium, Spodoptera

Activity of Emulsion, Suspension and Granular Preparations of *Metarhizium rileyi* (Hypocreales: Clavicipitaceae) Against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae on Field Maize

Viridiana A. Martinez-Ponce*¹, Diego Camacho-Ponce, Sergio R. Sanchez-Peña¹

¹Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila. *Corresponding author, e-mail: virimartz15@gmail.com

Abstract

Metarhizium rileyi (Farlow) Samson, a well-known entomopathogenic fungus, could be an alternative in agriculture, particularly as a measure for control of the invasive fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (FAW); However, factors like fungal formulation limit their bioinsecticides potential and, consequently affect the infection process. We tested conidia of three native isolates of *M. rileyi*, in aqueous suspensions (in water + surfactant = SW), in emulsions (in agricultural oil + water + surfactant = OSW) and in granules against FAW larvae. These were applied in the laboratory and on two field trials at two semiarid localities in NE México (Pesquería, NL and Saltillo, Coahuila). In the laboratory, *M. rileyi* in SW caused 83.3%, 78.6% and 62.0% mortality, while OSW resulted in mortalities of 70% (mineral oil) and 48% (soybean oil). In the first field test, three *M. rileyi* isolates and one *B. bassiana* isolate (all as SW) induced 26, 27, 32 and 28% mortality, respectively; conidia of three *M. rileyi* isolates in granules caused 37, 29 and 27% mortality. In the second field test, *M. rileyi* conidia induced higher FAW mortality (up to 81%) as OSW of mineral or soybean oil than SW preparations. Overall, these tests demonstrated that FAW can be readily infected on field maize, even in semiarid regions, by applications of *M. rileyi* conidia. OSW preparations caused a higher percentage of mortality than SW against FAW larvae and indicate the potential of *M. rileyi* in integrated pest management of FAW.

Keywords: emulsions, *Metarhizium rileyi*, *Spodoptera frugiperda*, suspensions

Introduction

In México, maize or corn (*Zea mays* L.) is the main crop regarding volume produced, with nearly 27 million metric tons (SIAP 2022). The fall armyworm (FAW) *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) is a ravenous maize pest native to the Americas. This insect is now nearly cosmopolitan (Deshmukh et al. 2021); it has a wide range of economically important host plants besides maize, including food, forage and fiber crops. Insecticides commonly used for FAW control, such as organophosphates, carbamates, pyrethroids and diamides pose serious risks of environmental pollution, human poisoning and insect resistance; they can be economically costly (Gutierrez et al. 2018). An alternative is biological control, as it can reduce environmental pollution and costs of synthetic insecticides. Entomopathogenic fungi such as species of the genera *Beauveria*, *Cordyceps* (= *Isaria*, in part), and *Metarhizium* have been tested as biological insecticides (Eckard et al. 2014; Casique-Valdés et al. 2015; Weber et al. 2022). Conidia of these fungi attach to the chitinous cuticle of insects; there, hydrophobic interactions mediate adhesion and subsequent invasion of the host, eventually causing its death (Boucias and Pendland et al. 1994). In northeastern México, the entomopathogenic fungus *Metarhizium rileyi* sometimes causes natural epizootics on lepidopterous larvae in maize fields, usually between the months of August-November (Sanchez-Peña 1990, 2000). Similar epizootics have been reported in the United States and other locations worldwide, on maize and other crops, (Maublanc 1903; Petch 1925, Getzin 1961, Allen et al. 1971, see references in Licona-Juárez et al. 2023). There was interest on *M. rileyi* as a biological insecticide in the USA in the 70s and 80s (Ignoffo et al. 1976). Competition from emerging synthetic insecticides and the fastidious nature of the microorganism possibly caused research on *M. rileyi* to dwindle. The invasion of the Old World by FAW and a growing impetus to the adoption of IPM

paradigms has caused renewed interest on *M. rileyi*. However, there have been few tests of this fungus as bioinsecticide against FAW worldwide. Most of these tests have used relatively simple suspensions of conidia in water plus a surfactant agent. Oil-in water emulsions of entomopathogenic fungi have demonstrated superior value in biological control of insects (Inglis et al. 2002, Batta 2003). Suspending the conidia in oil or in water-oil mixtures can greatly increase the activity of entomopathogenic fungi against insects (Akbar et al. 2005, Wraight and Ramos 2017). Agricultural oils are mixtures of biological or mineral origin that possess advantageous encapsulating, carrying, dispersing and adhering properties (Stoller Mexico 2024). In the laboratory, suspensions of *M. rileyi* conidia in vegetable and mineral oils were evaluated against immatures of *Chloridea* (= *Heliothis*) *virescens*, *Helicoverpa zea*, *Spodoptera exigua* and *S. frugiperda*, causing up to 95% mortality 5-6 days after application (Vega-Aquino et al. 2010). The objectives of this work were to test and compare the activity of *M. rileyi* conidia in agricultural oil emulsions, in aqueous suspensions and in granular preparations against FAW, in the laboratory and small field trials; we also tested the stability and activity of selected conidial preparations and time periods, against FAW in the laboratory.

Materials and methods

Entomopathogenic fungal isolates.

Collection of *M. rileyi* isolates. We attempted to obtain *M. rileyi* isolates from collected live FAW larvae. These were collected on maize fields at Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Mexico (25.357978, -101.040361) on 15 October 2004 and 20 October 2015; also, at Pesquería, Nuevo León (25.709446-99.795183) on 16 November 2022. Larvae were transferred to the Biological Control Laboratory, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), Saltillo, Coahuila. They were placed individually at 25°C ± 3°C, at greater than 85% relative humidity, and grass leaves (Bermuda grass, *Cynodon dactylon*; Buffelgrass, *Cenchrus ciliaris*, and other Poaceae) as food, provided freshly every 2 days. Larvae were incubated until death or pupation. We searched for growth of entomopathogenic fungi, (as white or green mycelial overgrowth, on dead larvae). These were placed in a moist chamber (90 mm plastic petri dishes lined with moist brown bag paper) for 48 hours in the laboratory. Conidia were taken from larvae with a bacteriological loop, then streaked on 90 mm petri dishes with SYS agar: Sabouraud Agar + 1% yeast extract (both from Solbiosa, Guadalajara, Mexico); 1L agar contained 200 ml of soybean (*Glycine max*) broth/L, obtained after boiling 250 g of soybeans for 15 min in 3 L of water. Agar plates were incubated at 25°C ± 5°C and small pieces of fungal growth on agar was transferred to fresh SYS agar medium to obtain pure cultures and conidia. Additionally, entomopathogenic fungi (*B. bassiana* isolates) were isolated from agricultural soil at Galeana, Nuevo León, using the insect bait method (Sanchez-Peña et al. 2011) and subsequent transferring of conidia to SYS as described above. After isolation all fungal cultures were kept refrigerated in agar slants in screw cap test tubes at 4°C. Selected fungal isolates were

identified by morphology (Acharya et al. 2022) and molecular methods: DNA sequencing of a fragment of the genetic marker translation elongation factor-1 alpha (EF1- α), performed at Biociencia, Monterrey, Nuevo León, México (<http://www.biociencia.com.mx>). DNA was extracted from myceliar growth scraped from agar cultures, following the procedure of Doyle and Doyle (1987) modified by SENASICA (2022). Primers used were: 5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3' and 5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3' (SENASICA 2022; Koo et al. 2023). Sequences were compared (BLAST) in the NCBI database to determine percent identity.

Percent germination of conidia. The percent germination of conidia of isolates used for experiments was determined by preparing Petri dishes with a thin layer (2 mm) of SYS Agar; conidia of each isolate were transferred to three of these agar plates and incubated at 25°C $\pm$ 3°C. Subsequently, at 24, 48 and 72 h after planting, three different areas in each dish with at least 100 conidia were inspected under the optical microscope (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) at 40X and the number of conidia with or without germination tube were recorded (Boucias and Pendland, 1984).

Rearing of *S. frugiperda*. A colony of FAW larvae was established in the laboratory. Larvae collected in maize fields were kept individually in 10 mL plastic containers (25°C $\pm$ 3°C, at relative humidity greater than 85% in containers) and fresh grass (Poaceae) as food *ad libitum*, changed every 2 days. Pupae were confined in 1L clear plastic containers with soft drink- and water-soaked cotton balls, in a 12/12h light/dark photoperiod under diffuse indirect fluorescent light. After >15 days, emergence and mating of adults ensued, and eggs

or neonate larvae were retrieved from containers upon appearance for tests or colony maintenance. Several generations of FAW were reared as described.

Application of *M. rileyi* aqueous suspensions of conidia from artificial medium against *S. frugiperda* larvae in the laboratory

Conidial suspensions were prepared at 1×10^8 conidia/mL for each *M. rileyi* isolate (DCP, C3 and V1) in water + 0.03% surfactant (Bionex, UPL, Saltillo, Mexico). Throughout this report, “surfactant” refers to Bionex. This is a tensoactive/dispersing agent that includes tridecyl alcohol polyethoxylates, polyethoxylated nonylphenol and propylene glycol. Conidia of each isolate were suspended with a commercial blender (two-speed professional Oster BLSTBPST013 blender) for 3 min, then filtered with organza fabric (Li et al. 2020, Shouzhu et al. 2019). For each isolate, 150 larvae (3rd-4th instar) from the laboratory colony were inoculated by topical application, applying 10 μ L of conidial suspension ($=1 \times 10^8$ conidia/larva) on the dorsal abdomen. Larvae in the control group received 10 μ L of water + 0.03% surfactant. Larvae were individually placed in 10 mL plastic containers at $25^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$, relative humidity 85% and grass as food (Poaceae, changed every 2 days). Larval mortality was recorded ten days after inoculation, considering as dead larvae those without motility. Bioassays were conducted on different dates; therefore, statistical comparisons were not performed among dates.

Virulence of *M. rileyi* conidia produced in vivo and in vitro against *S. frugiperda* in the laboratory.

For maintenance of viable fungal cultures, it is sometimes necessary to transfer *M. rileyi* from artificial medium to larvae and vice versa. There are several reasons to do this. The fungus is fastidious to grow on artificial medium, so sometimes it is necessary to pass the fungus from larvae to larvae. Also, reports indicate that there might be changes in the virulence of entomopathogenic fungal conidia produced in vivo or in vitro, especially after repeated subculturing on artificial medium (Lin and Harper 1984; Eckard et al. 2014). Also, at 1–2-year intervals, isolates DCP Y C3 were taken from the refrigerator, transferred to larvae and reisolated in vitro, on artificial media. Therefore, we wanted to compare the virulence of in vivo- and in vitro- produced conidia of *M. rileyi*. Larvae of *S. frugiperda* (3rd-4th instar) were inoculated by topical application of conidia of isolate V1. Treatments were: conidia produced in vitro (on SYS agar); conidia produced in vivo, on infected FAW larvae; and control: water + 0.03% surfactant. All treatments were applied within two hours after preparation. For each isolate, 120 larvae (3rd-4th instar) from the laboratory colony were inoculated by topical application, applying 10 µL of conidial suspension ($=1 \times 10^8$ conidia/larva) on the dorsal abdomen. Larvae in the control group received 10 µL of water + 0.03% surfactant. Afterwards larvae were individually placed in 10 mL plastic containers as described. Larval mortality was recorded after seven days, considering as dead larvae those without motility. There were 10 FAW larvae/replicate and four replicates in each treatment.

Application of emulsions of *M. rileyi* conidia against *S. frugiperda* in the laboratory

Emulsions were prepared using the following oils: Stylet[®] mineral oil (Gowan, Mexicali, Mexico), a paraffinic oil that acts as surfactant and general adjuvant; it has some pesticidal properties at high concentrations (Gowan Mexico 2024). Also, Carrier[®] soybean oil (Stoller,

Guadalajara, Mexico), a vegetable oil-based surfactant and adherent in a mixture containing emulsifiers, surfactants and conditioners (Celestino et al. 2016; Stoller Mexico 2024). These agricultural oils (mineral and soybean) were chosen due to existing information on their use as ingredients of bioinsecticidal preparations of entomopathogenic fungal conidia (Vega-Aquino et al. 2010, Casique-Valdes et al. 2014). Conidia of *M. rileyi* were suspended in these oils and applied to *S. frugiperda* larvae as described. For evaluations, 100 mL of water + 0.03% surfactant + 50 µL of each oil (0.05%) + 1×10^8 conidia/mL were thoroughly mixed in a blender as described for 5 min and filtered with organza cloth. There were three controls: one consisted of 100 mL of water + 0.03% surfactant + 50 µL of each oil separately; the other consisted of water + 0.03% surfactant only (Lopes et al. 2020, Ingle et al. 2008, Vimala et al. 2002), and the absolute control. Conidia of *M. rileyi* were suspended in these oils and applied to *S. frugiperda* larvae. For each isolate, 500 larvae (3rd-4th instar) from the laboratory colony were inoculated by topical application, applying 10 µL of conidial suspension ($=1 \times 10^8$ conidia/larva) on the dorsal abdomen. Larvae in the control group received 10 µL of water + 0.03% surfactant. Afterwards larvae were individually placed in 10 mL plastic containers as described. Larval mortality was recorded after ten days, considering as dead larvae those without motility. There were 10 FAW larvae/replicate and ten replicates in each treatment.

Pathogenicity of *M. rileyi* conidia in emulsions stored at room temperature and refrigeration

Emulsions of both oils + *M. rileyi* (as described above) were stored at 4 and 25°C $\pm$ 3°; after 45 days, the viability of conidia and its effect on *S. frugiperda* larvae were evaluated. For each treatment, 500 larvae (3rd-4th instar) from the laboratory colony were inoculated by

topical application, applying 10 μL of conidial suspension ($=1 \times 10^8$ conidia/larva) on the dorsal abdomen. Larvae in the control group received 10 μL of water + 0.03% surfactant. Afterwards larvae were individually placed in 10 mL plastic containers as described. Larval mortality was recorded after ten days, considering as dead larvae those without motility. There were 10 FAW larvae/replicate and ten replicates in each treatment.

Field test one: Application of aqueous suspensions and granular preparations of *M. rileyi* conidia, at Pesquería, México.

We evaluated two methods of application (aqueous suspension (SW) and granular) of isolates DCP and C3 of *M. rileyi*; all treatments were applied on 28 August 2017, on V10-V14 plants (Ortez and Litch 2024) of Garañon hybrid maize (Pioneer, Cuernavaca, Mexico) in a dryland field located in Pesquería, Nuevo León (25.70017, -99.784572). Isolates were produced following the methods of Casique-Valdés et al. (2015) and references therein, as follows. Regular white rice (100-150 gr) was placed in 30 x 30 cm translucent polyethylene bags and sterilized at 121°C for 15 min in the autoclave; afterwards rice was inoculated in a laminar flow hood with 15 mL of a *M. rileyi* suspension (1×10^8 conidia/mL) from agar cultures and incubated at 25°C for three weeks in the laboratory. Conidia were harvested from the resulting cultures. Treatments were: 7 mL of a suspension of 1×10^8 conidia/mL in water + 0.03% surfactant, prepared in a blender as described; and 5 g of rice overgrown with the fungus (5×10^8 total conidia/plant). The control was water + 0.03% surfactant. Treatments were applied directly in each plant's whorl, either spraying the 7 mL with a manual atomizer (S-16187, Uline, Mexico City) or manually sprinkling 5 g of rice in the whorl with gloved hands. The experimental design consisted of 4 replicates (with 100 plants each) per treatment. Twelve days after application, plants were inspected by opening the whorl

manually and total live larvae and total dead larvae with and without fungus were counted. Leaf damage in each plant was also assessed, considering a scale 1-10, where 1 is minimum and 10 is maximum damage (Meagher et al. 2016).

Field test two: Application of *M. rileyi* aqueous suspensions, oil emulsions and granular preparation, at Saltillo, México.

We evaluated several preparations of *M. rileyi* conidia. A total of nine treatments are described in Table 1; they were applied on Genex 724 commercial hybrid (Genex Seeds, Hermosillo, Sonora, Mexico) V8-V10 maize plants (Ortez and Litch 2024), in a drip-irrigated experimental field at the University on 22 August 2023. All treatments were applied within two hours after preparation. All treatments consisted of liquid preparations excepting one granular preparation. One mL of liquid preparations preparation was applied in each plant whorl. This amount translates to 6×10^{12} *M. rileyi* conidia/hectare, for a theoretical plant density of 60,000 plants/ha (Tadeo-Robledo et al. 2020). The granular treatment 8 (*M. rileyi* conidia on bran granules) was prepared shaking for five minutes in a 10 mL plastic container, 1 g of bran with two FAW larvae covered with *M. rileyi* conidia (inoculated in the laboratory), then adjusted with bran to 1×10^8 conidia/gr; 10 mgr of preparation/plant (1×10^8 conidia/plant) were applied manually to each plant whorl. This amount translates to 6×10^{10} conidia/hectare, for a theoretical plant density of 60,000 plants/ha. This amount of conidia is approximately two orders of magnitude lower than the emulsion treatments in this field test, and lower than the previous application of *M. rileyi* conidia in granules in field test 1 (at Pesquería). Treatment 9 consisted of a SW suspension of the Bb1 isolate of *B. bassiana* at 1×10^8 conidia/mL; one mL of preparation was applied in each plant whorl. All treatments were applied on plants measuring 50-70 cm height. Treatments were evaluated seven days after application; plants were inspected by opening the whorl manually, and total live larvae and total dead larvae with and without fungus were registered per plant and replicate. Experimental design were 10 replicates (10 maize plants each/treatment).

Statistical Analysis

Proportional mortality was calculated, and data obtained were arcsine transformed and processed through analysis of variance (ANOVA) on a completely randomized design, followed by Tukey's mean separation in VassarStats (<http://vassarstats.net/>) (Montecalvo et al. 2023).

Results and Discussion

Collection and isolation of entomopathogenic fungi

Three *M. rileyi* isolates were field-collected: two (C3 and DCP) from Saltillo, Coahuila state; and one (V1) from Pesquería, Nuevo Leon state. In this last case, seven percent of *S. frugiperda* larvae collected (total=70) in Pesquería, Nuevo Leon showed mycoses caused by *M. rileyi*. All isolates were grown on artificial medium as described. One *B. bassiana* isolate (Bb1) was obtained after soil baiting following Sanchez-Peña et al. (2011).

Identification of fungal isolates

Macro- and microscopic characteristics and growth were identical for all three *M. rileyi* isolates. Figure 1 shows fungal growth on infected larvae (A, B) and on artificial medium (C): whitish coloration that eventually turned green, from ensuing formation of 2-3µm ovoid conidia, produced in short chains on whorls of phialides on erect conidiophores (D) (Acharya et al. 2022, Pang et al. 2023). Sequencing and comparison (BLAST) of the EF1-α marker confirmed the identity of *B. bassiana* sensu stricto and *M. rileyi* (GenBank accession numbers PQ479188). The sequence from local isolate *M. rileyi* V1 was 99.56-100.0% identical to isolates from China and México, among others. A living culture of isolate C3 of *M. rileyi* is deposited in the ARSEF collection (USDA-ARS, Ithaca, NY) as ARSEF 11943.

Application of *M. rileyi* aqueous suspensions of conidia from artificial medium against *S. frugiperda* larvae in the laboratory

Six days after inoculation, the control group (exposed to water + 0.03% surfactant) has a mortality of 1.0%. Percent FAW mortalities caused by isolates DCP and C3 were 83.3 and 78.6. These values were significantly different from the control ($p = 0.0081$, $df = 4$, $F = 4.61$;

χ^2 values for each fungal treatment mortality vs. control were 138.0131 and 126.75 respectively; $p < 0.00001$). For V1 strain the resulting FAW mortality was 78.6 percent; this was also significantly different from the control ($p = 0.0001$, $df = 2$, $F = 12.70$; the χ^2 value compared to the control is 86.2241, $p < 0.00001$). Bosa et al. (2004) observed significant mortality (95-100%) on *S. frugiperda* larvae 10 days after application under similar treatments and laboratory conditions.

Virulence of *M. rileyi* conidia produced in vivo and in vitro against *S. frugiperda* in the laboratory

Seven days after inoculation, the control group (exposed to water + 0.03% surfactant) had no mortality. FAW mortalities inoculated with conidia produced in vitro was $62 \pm 4.78\%$ compared to $37 \pm 2.5\%$ caused by conidia produced in vivo, from infected larvae. These values were significantly different ($p = < 0.0001$, $df = 2$, $F = 212.70$) among fungal treatments and the control. Caro et al. (2005) mention that there were significant differences among substrates utilized to produce conidia of *M. rileyi*; a high yield of conidia was obtained on the legume soja derived substrate, and these conidia caused mortalities greater than 80% on FAW larvae.

Application of emulsions of *M. rileyi* conidia against *S. frugiperda* in the laboratory

Seven days after inoculation, the treatment of mineral oil + water + 0.03% surfactant + *M. rileyi* (T1) caused $70 \pm SE = 2.58\%$ mortality in FAW larvae, followed by soybean oil + water + 0.03% surfactant + *M. rileyi* (T2) with $48 \pm SE = 2.9\%$; there were significant differences ($P = < 0.0001$, $df = 4$, $F = 32.74$) among these two treatments (Figure 2). The controls (mineral oil + water + 0.03% surfactant (T3), soybean oil + water + 0.03% surfactant (T4) and water

+ 0.03% surfactant (T5) induced no mortality. Vega-Aquino et al. (2010) reported that *M. rileyi* conidia suspended in mineral and soybean oils can cause *S. frugiperda* mortalities greater than 90% in the laboratory. Batta (2003) used a coconut/soybean oil formulation of *M. anisopliae* against *Bemisia tabaci* nymphs and *Tetranychus cinnabarinus* motile stages, observing 66-100% and 58-93 % mortality 3 days after application in the laboratory.

Pathogenicity of *M. rileyi* conidia in emulsions stored at room temperature and refrigeration

Forty-five days after of storage at 4°C, the mineral oil-*M. rileyi* preparation (T3) caused 53%±4.6 mortality while the soybean oil-*M. rileyi* preparation (T4) caused 5%±4.0% mortality; both 7 days after inoculation (Figure 3). There were significant differences ($P = 0.0022$, $df = 4$, $F = 4.93$) compared to the rest of the treatments where no mortality was observed. The fungus-mineral oil and fungus-soybean oil emulsions stored at 4°C showed significant reductions (27% and 43%, respectively) compared to the same emulsions used immediately after preparation. Our results agree with Montecalvo et al. (2023): storage period and conditions affect the efficiency of formulations compared to conidia prepared and used on the spot; they observed 20 and 40% in mortality on FAW larvae caused by conidia stored at 25°C and 4°C, respectively. See also Batta (2003).

Field test one: Application of aqueous suspensions and granular preparations of *M. rileyi* conidia, at Pesquería, México.

There were no significant differences among *M. rileyi* strains or formulations (granular or suspensions) regarding total larval mortality (Figure 4); all these treatments were in turn different from the control. Recent work reported very similar levels of FAW larval mortality after applications of aqueous suspensions of *M. rileyi* conidia on field maize plants. Barros et al. (2021) and de Faria et al. (2022) obtained maxima of 37.6% and 31.0% total FAW larval mortality after applying *M. rileyi* conidia in aqueous suspensions with surfactant, using similar concentrations to those in the present work. Figure 5 shows the *M. rileyi*-infected larvae (confirmed by fungal development and microscopical observation) for *M. rileyi* strains and formulations (granular or suspensions). The highest proportion of infected larvae was obtained when applying isolate DCP as granules ($P > F = 0.0074$, $df = 4$, $F = 4.75$).

Regarding plant damage, figure 6 shows a maximum 23.3% reduction in plant leaf damage when applying *M. rileyi* treatments. There were no significant differences among *M. rileyi* strains or formulations (granular or suspensions) (Figure 5); all these treatments were in turn different from the control ($P > F = 0.0004$, $df = 4$, $F = 7.79$). Lezama et al. (2005) reported damage reduction in maize plants when using *M. anisopliae* against FAW by spraying 1×10^{12} conidia per hectare.

Field test two: Application of *M. rileyi* aqueous suspensions, oil emulsions and granular preparation, at Saltillo, México.

Seven days after application, the highest FAW mortality (dead larvae with and without fungal growth) was caused by mineral oil + water + 0.03% surfactant + *M. rileyi* (T6) ($81 \pm \text{SE} = 5.77\%$); soybean oil + water + 0.03% surfactant + *M. rileyi* caused $61 \pm \text{SE} = 12.51\%$ (T7), these two treatments were not statistically different. However, dead larvae were not observed in the following (controls): no application (absolute control, T1), water + 0.03% surfactant (T2), mineral oil + water + 0.03% surfactant (T3) and soybean oil + water + 0.03% surfactant (T4). Statistical analysis indicated significant differences ($P = < 0.0001$, $df = 8$, $F = 21.11$) between emulsion, suspensions and granular treatments (Figure 7).

Montecalvo et al. (2023) reported 93% mortality on larvae when applying *M. rileyi* conidia in oil emulsions directly to larvae in the laboratory. Lopes et al. 2020 reported 41.2% maximum mortality when applying an oil-based formulation of *M. rileyi* against lepidopterous pests (the noctuids velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* and soybean looper, *Chrysodeixis includens*) on field soybeans. The *B. bassiana* SW application resulted in 27.0% mean total mortality, similar but significantly lower than a similar formulation of *M. rileyi*.

Granular preparations resulted in 28.0-41.3% mortality (second and first field tests respectively). On the other hand, it should be emphasized that there was at least a difference of two orders of magnitude between the amounts applied/plant between the tests; therefore, a great deal remains to be done regarding formulation and amounts of *M. rileyi* applied. A light granular preparation (i.e. bran-based) could be of interest in some scenarios (like aerial or drone application).

These observations provide basic data on the isolation, performance, preparation of basic formulations and field application of entomopathogenic fungi like native *M. rileyi* isolates on

maize plants against *S. frugiperda* larvae. These results also indicate that the production of conidia in vitro (on artificial medium) did not affect the virulence of *M. rileyi*. The conidia in oil emulsion stored at 45 days at 4°C caused highest mortality than conidial emulsions stored at ambient temperatures; these lost most or all activity after this period. Overall, conidia in mineral and soybean oil emulsions caused the highest mortalities in laboratory and field, respectively. In addition, a modest but significant reduction in maize plant damage was obtained when using suspensions with *M. rileyi*. These results and additional tests (Sanchez-Peña unpublished observations) demonstrate that infecting FAW larvae on maize by applications of *M. rileyi* conidia is relatively straightforward in the field, even in semiarid regions; moderate- to relatively high infection levels can be achieved. It is possible that self-sustaining infection cycles on hosts can be established under favorable field or microclimatic conditions, as reported for caterpillars on field soybeans (Ignoffo et al. 1976); this remains to be demonstrated on maize. Isolate selection is another area that can contribute significantly to improve the control FAW in maize fields, since early research already demonstrated important differences in virulence among isolates of *M. rileyi* from different hosts and geographical areas (Ignoffo and Garcia and 1985). Its high virulence and high specificity towards lepidopterous larvae make *M. rileyi* an attractive biological control agent. The information presented herein provides a baseline for development and deployment of entomopathogenic fungal preparations of *M. rileyi* for field application against FAW larvae.

Acknowledgments

We thank the Dirección de Investigación, UAAAN for projects project No. 1330-3611-2243 and 2332; and Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología, CONAHCYT for providing support and scholarships (1222440) to VMP and DCP.

References Cited

- Acharya R, Lee JY, Hwang HS, et al. 2022. Identification of entomopathogenic fungus *Metarhizium rileyi* infested in fall armyworm in the cornfield of Korea, and evaluation of its virulence. Arch. Insect Biochem. Physiol. 111(4): e21965. <https://doi.org/10.1002/arch.21965>
- Akbar W, Lord JC, Nechols JR, et al. 2005. Efficacy of *Beauveria bassiana* for red flour beetle when applied with plant essential oils or in mineral oil and organosilicone carriers. J. Econ. Entomol. 98(3):683-8.
- Allen GE, Greene GL, Whitcomb WH. 1971. An epizootic of *Spicaria rileyi* on the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*, in Florida. Fla. Entomol. 54(2): 189-191.
- Barros SK, de Almeida EG, Ferreira FT, et al. 2021. Field efficacy of *Metarhizium rileyi* applications against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. Neotrop. Entomol. 50:976-88.
- Batta YA. 2003. Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Crop Prot. 22(2):415-422. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00200-4](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00200-4)

Bindu B, Manjula GK, Ramakrishna R, et al. 2018. Efficacy of oil-based formulations of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson against *Spodoptera litura* in vitro. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 7(10): 3413-3422. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.710.396>

Bosa C, Chávez T, París A, et al. 2004. Evaluación de aislamientos nativos de *Nomuraea rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. Col. Entomol. 30(1): 93-97. <https://doi.org/10.25100/socolen.v30il.9535>

Boucias D and Pendland J. 1984. Nutritional requirements for conidial germination of several host range pathotypes of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. J. Invert. Pathol. 43(2): 288-292. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(84\)90153-8](https://doi.org/10.1016/0022-2011(84)90153-8)

Caro L, Villamizar L, Espinel C. et al. 2005. Efecto del medio de cultivo en la virulencia de *Nomuraea rileyi* sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. Col. Entomol. 31(1): 79-88. <http://doi.org/10.25100/socolen.v31il.9421>

Celestino FN, Pratisoli D, Machado L, et al. 2016. Control of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) with botanical insecticides and mineral oils. Acta Scientiarum. Agronomy. 38 (1):1-8. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i1.27430>

Deshmukh SS, Prasanna BM, Kalleshwaraswamy CM, et al. 2021. Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*). Indian J. Entomol. 82(3): 349-372 https://doi.org/10.1007/978-981-15-8075-8_8

Doyle JJ and Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. Phytochem Bull.19(1): 11-15.

Eckard S, Ansari MA, Bacher S, et al. 2014. Virulence of in vivo and in vitro produced conidia of *Metarhizium brunneum* strains for control of wireworms. Crop Prot. 64: 137-142. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.017>

de Faria M, Souza DA, Sanches MM, et al. 2022. Evaluation of key parameters for developing a *Metarhizium rileyi*-based biopesticide against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize: laboratory, greenhouse, and field trials. Pest Manag. Sci. 78(3):1146-54.

Getzin LW. 1961. *Spicaria rileyi* (Farlow) Charles, an entomogenous fungus of *Trichoplusia ni* (Hübner). J. Insect Pathol. (3): 2-10.

Gutiérrez R, Mota D, Blanco CA, et al. 2018. Field-evolved resistance of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to synthetic insecticides in Puerto Rico and Mexico. J. Econ. Entomol. 112(2): 792-802.

Ignoffo CM, Marston NL, Hostetter DL, et al. 1976. Natural and induced epizootics of *Nomuraea rileyi* in soybean caterpillars. J. Invertebr. Pathol. 27:191-198.

Ignoffo CM, McIntosh AH, Garcia C, et al. 1982. Effects of successive in vitro and in vivo passages on the virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. Entomophaga. 27:371-378.

Ignoffo CM, Garcia C. 1985. Host spectrum and relative virulence of an Ecuadoran and a Mississippian biotype of *Nomuraea rileyi*. J. Invertebr. Pathol. 45(3):346-52.

Ingle YV, Raut BT, Pardey VP, et al. 2008. Efficacy of oil formulation of *Nomurea rileyi* against *Helicoverpa armigera* on chickpea. Int. J. Plant Prot. 1(2):88-91.
http://researchjournal.co.in/upload/assignments/1_88-91-1.pdf

Inglis GD, Jaronski ST, Wraight SP. 2002. Use of spray oils with entomopathogens. Sustainable Pest and Disease Management. 302-12.

Koo YM, Ahsan SM, Choi HW. 2023. Characterization of three *Fusarium* spp. causing wilt disease of *Cannabis sativa* L. in Korea. Mycobiology. 51(3):186-94.

Lezama R, Molina J, López M, et al. 2005. Efecto del hongo entomopatígeno *Metarhizium anisopliae* sobre el control del gusano cogollero del maíz en campo. Avances en Investigación Agropecuaria. 9(1).

Li L, Zhong K, Wang JL, Liu XS. 2020. Mechanism of *Metarhizium rileyi* evading cellular immune responses in *Helicoverpa armigera*. Arch. Insect. Biochem. Physiol. 106(3): e21769. doi: 10.1002/arch.21769.

Licona KC, Andrade EP, Medina HR, et al. 2023. Tolerance to UV-B radiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium rileyi*. Fungal Biol. 127(8):1250-1258. [https://doi:10.1016/j.funbio.2023.04.004](https://doi.org/10.1016/j.funbio.2023.04.004).

Lopes RB, Sosa-Gomez D, Martins C, et al. 2020. Efficacy of an oil-based formulation combining *Metarhizium rileyi* and nucleopolyhedroviruses against lepidopteran pests of soybean. J. Appl. Entomol. 144(8):678-689. <https://doi.org/10.1111/jen.12787>

Maublanc A. 1903. Sur quelques espèces nouvelles de champignons inférieurs. Bull. Soc. Mycol. France. 19(3): 291-296.

Meagher RL, Nagoshi RN, Hay-Roe MM. 2016. The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in South America: A view from the North. *Florida Entomologist*. 99(3): 495-497. <https://doi.org/10.1653/024.099.0324>

Montecalvo MP, Macaraig JS, Navasero MM, et al. 2023. Effect of emulsifiable concentrate of *Metarhizium rileyi* (Farl.) Kepler, S.A. Rehner & Humber to third larval instar of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Int. J. Agric. Technol. 19(1):175-188.

Ortez O and Licht M. 2024. A Guide to Corn Growth and Development. Available from: <https://ohioline.osu.edu/factsheet/anr-0148>

- Pang J, Peng Y, Di T, et al. 2023. Virulence of *Metarhizium rileyi* is determined by its growth and antioxidant stress and the protective and detoxifying enzymes of *Spodoptera frugiperda*. *Insects* 14(13): 260. <https://doi.org/10.3390/insects14030260>
- Pendland JC, Lopez C, Boucias DG. 1994. Laminin-binding sites on cell walls of the entomopathogen *Nomuraea rileyi* associated with growth and adherence to host tissues. *Mycologia* 86(3): 327-335.
- Peng G, Wang Z, Yin Y, et al. 2008. Field trials of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Ascomycota: Hypocreales) against oriental migratory locusts, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) in Northern China. *Crop Prot.* 27(9): 1244-50.
- Petch T. 1925. Studies in entomogenous fungi. VII. *Spicaria*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 10(3):183-189.
- Sánchez-Peña SR.1990. Some insect and spider pathogenic fungi from Mexico with data on their host ranges. *Fla. Entomol.* 73(3): 517-522.
- Sanchez-Peña SR. 2000. Entomopathogens from two Chihuahuan desert localities in Mexico. *BioControl.* 45: 63-78.
- Sanchez-Peña SR, San Juan-Lara J, Medina RF. 2011. Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, Mexico, and their virulence towards thrips and whiteflies. *J. Insect Science.*11(1): 1.

- SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2022. Protocolo de Diagnóstico: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical (Marchitez por *Fusarium*) [Versión 2.0]. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Dirección General de Sanidad Vegetal, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Mexico. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/765556/Protocolo_Foc_R4T.pdf
- Shouzh L, Zhimin X, Xueying W, et al. 2019. Pathogenicity and in vivo development of *Metarhizium rileyi* against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. J. Econ. Entomol. 112(4):1598-1603 <https://doi.org/10.1093/jee/toz098>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2022. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Tadeo-Robledo M, Espinosa-Calderón A, Canales-Islas E, et al. 2020. Grain yield and population densities of new corn hybrids released by the INIFAP and UNAM for the High Valleys of Mexico. Terra Latinoam. 38(3): 507-515.
- Vega-Aquino P, Sánchez-Peña SR, Blanco C. 2010. Activity of oil-formulated conidia of the fungal entomopathogens *Nomuraea rileyi* and *Isaria tenuipes* against lepidopterous larvae. J. Invert. Pathol. 103:145-149. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.12.002>

Vimala PS, Prasad YO, Chowdary A. 2002. Effect of drying and formulation of conidia on virulence of the entomofungal pathogen *Nomuraea rileyi* (F) Samson. Biol. Control. 16(1): 43-48.

Weber DC, Blackburn MB, Jaronski ST. 2022. Biological and behavioral control of potato insect pests. Global Perspectives on Biology and Management. 1:231–276.

Wraight SP, Ramos ME. 2017. Effects of inoculation method on efficacy of wettable powder and oil dispersion formulations of *Beauveria bassiana* against Colorado potato beetle larvae under low-humidity conditions. Biocontrol Sci. Technol. 27(3):348-363.

Table 1. *M. rileyi* preparations applied on maize against fall armyworm. Field test 2, Saltillo, Mexico.

Treatment number	Treatment composition
1	No application (absolute control)
2	water + 0.03% surfactant
3	water + 0.03% surfactant + 0.05% mineral oil
4	water + 0.03% surfactant + 0.05% of soybean oil
5	water + 0.03% surfactant + 1×10^8 <i>M. rileyi</i> conidia/mL
6	water + 0.03% surfactant + 0.05% mineral oil + 1×10^8 <i>M. rileyi</i> conidia/mL
7	water + 0.03% surfactant + 0.05% soybean oil + 1×10^8 <i>M. rileyi</i> conidia/mL
8	bran + 1×10^8 <i>M. rileyi</i> conidia/gram
9	water + 0.03% surfactant + 1×10^8 <i>B. bassiana</i> conidia/mL

Figure 2. Mean *S. frugiperda* mortality (as proportions) in the laboratory caused by: T1: mineral oil + water + surfactant + *M. rileyi*; T2: soybean oil + water + surfactant + *M. rileyi*; T3: mineral oil + water + surfactant; T4: soybean oil + water + surfactant; T5: water + surfactant. Bar = standard error of the mean. Means with the same letter are not significantly different (Tukey test, $p < 0.05$).

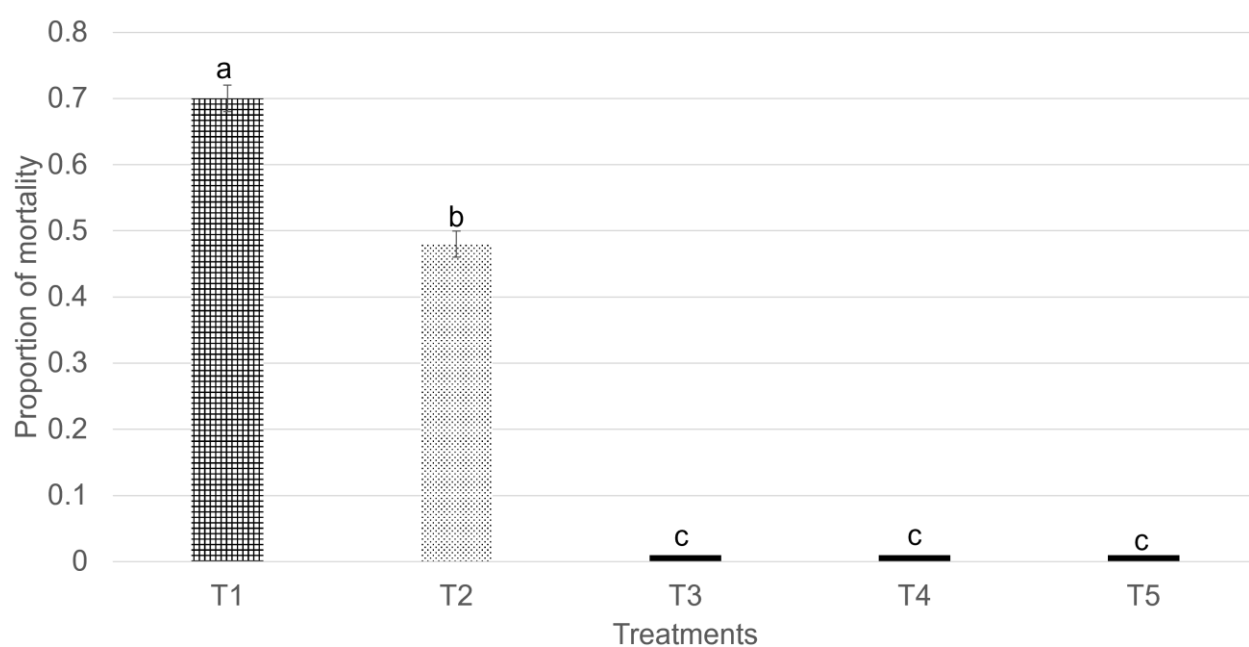


Figure 3. Mean *S. frugiperda* mortality (as proportions) in the laboratory caused by emulsions after different storage conditions and time periods: MO: mineral oil + water + surfactant + *M. rileyi*, used immediately (day 0), stored for 45 days at 25°C ± 5°C (Room) and stored 45 days at 4°C (Ref); CM: control of mineral oil + water + surfactant without conidia. SO: soybean oil + water + surfactant + *M. rileyi* used immediately (day 0), stored for 45 days at 25°C ± 5°C (Room) and stored 45 days at 4°C (Ref); CS: control of soybean oil + water + surfactant without conidia. Means with the same letter are not significantly different (Tukey test, $p < 0.05$).

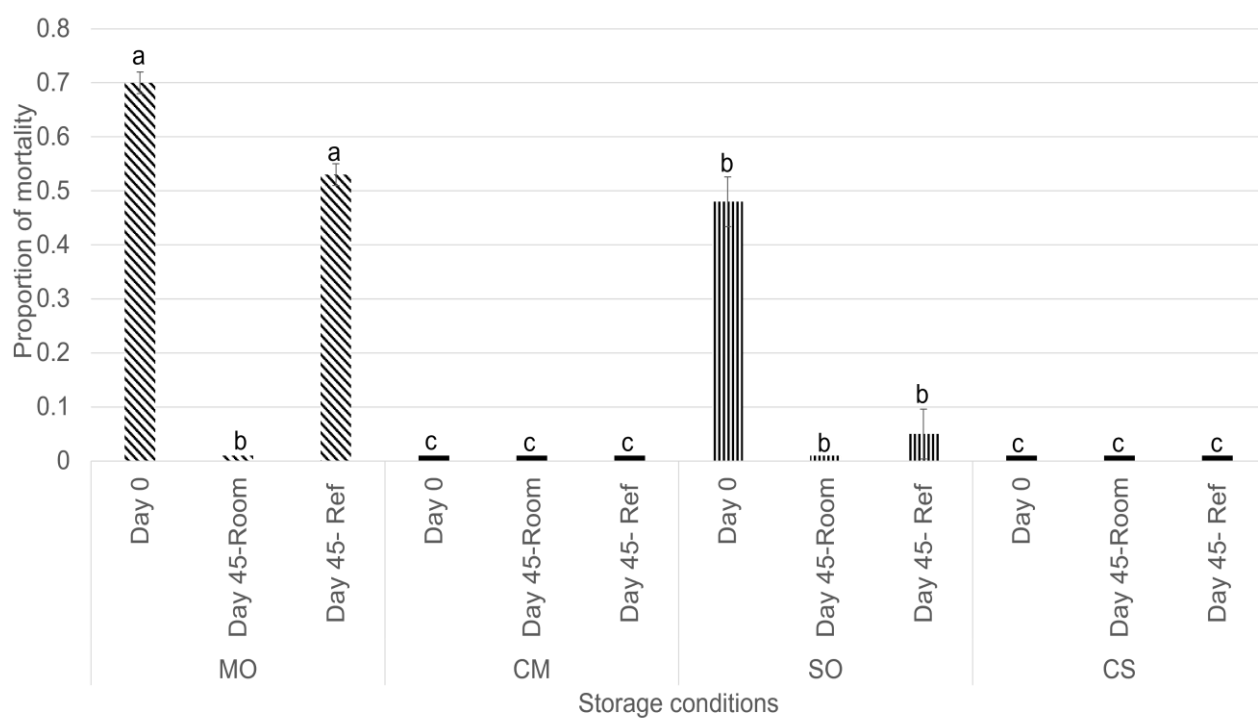


Figure 4. Mean *S. frugiperda* total percent mortality in *M. rileyi* conidial treatments; field test 1, Santa María, Pesquería, Nuevo León. Isolate *M. rileyi* DCP (T1: granular; T2: suspension in water + surfactant); isolate *M. rileyi* C3 (T3: granular; T4: suspension in water + surfactant); T5: control (surfactant in water only). Means with the same letter are not significantly different (Tukey test, $p < 0.05$).

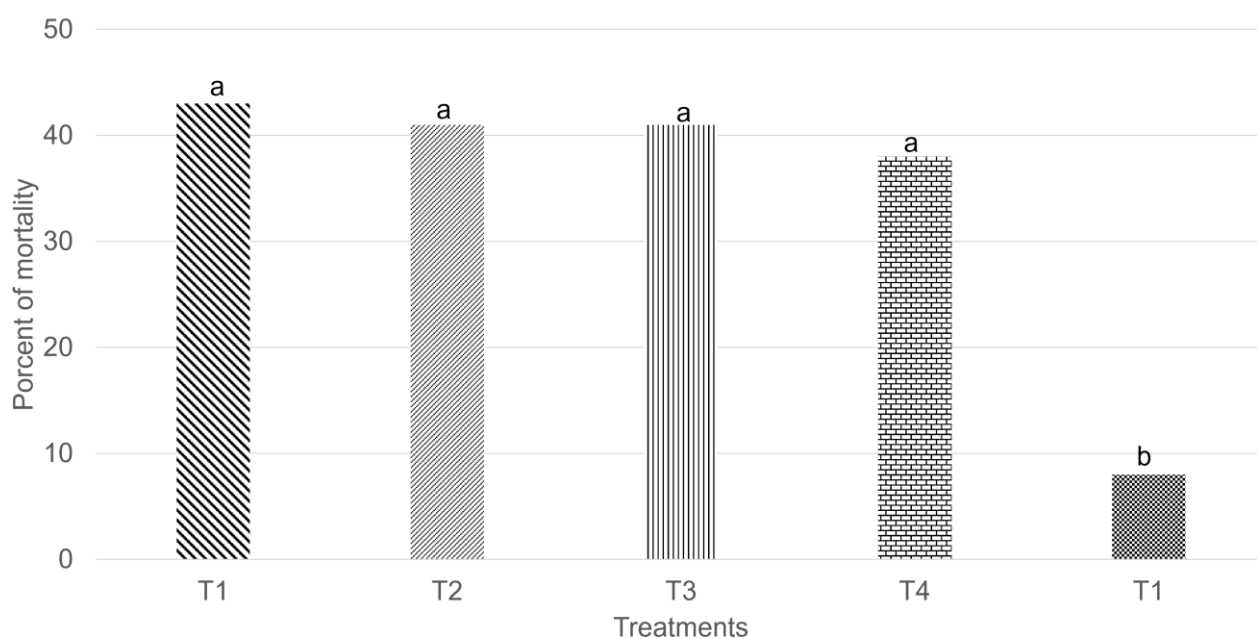


Figure 5. Mean percent *M. rileyi*-infected *S. frugiperda* larvae in *M. rileyi* conidial treatments; field test 1, Pesquería, Nuevo León. Isolates *M. rileyi* DCP and C3 (T1 and T2 respectively), suspensions in water + surfactant; isolates *M. rileyi* DCP and C3 (T3 and T4 respectively), conidia on rice granules; T5: control (water + 0.03% surfactant). Means with the same letter are not significantly different (Tukey test, $p < 0.05$).

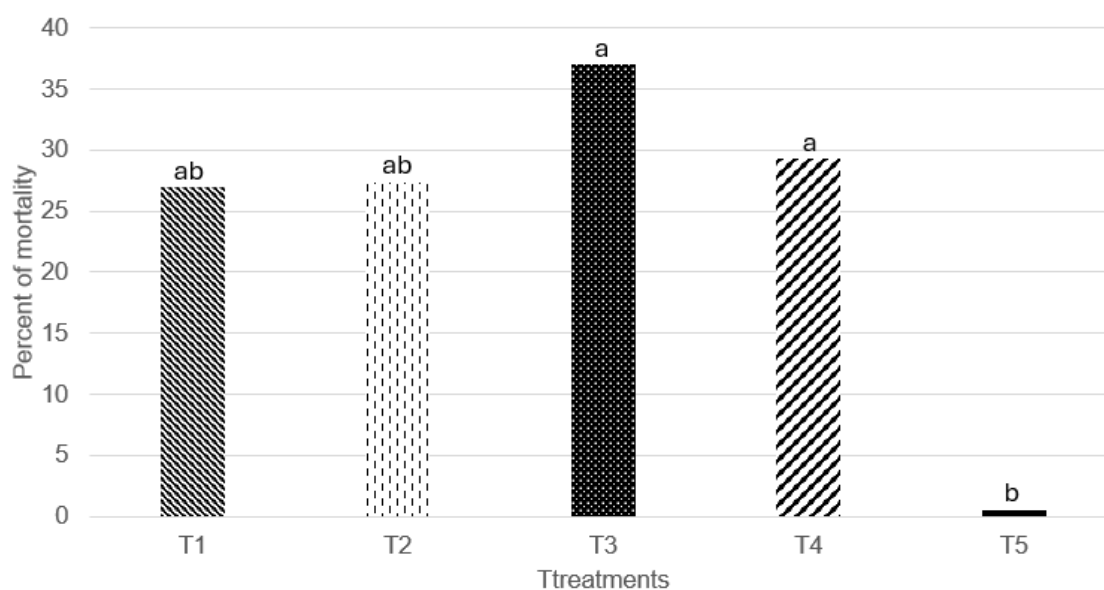


Figure 6. Mean percent plant damage ratings in *M. rileyi* conidial treatments; field test 1, Pesquería, Nuevo León. Isolates *M. rileyi* DCP and C3 (T1 and T2 respectively), suspensions in water + surfactant; isolates *M. rileyi* DCP and C3 (T3 and T4 respectively), conidia on rice granules; T5: control (water + 0.03% surfactant). Means with the same letter are not significantly different (Tukey test, $p=0.0004$).

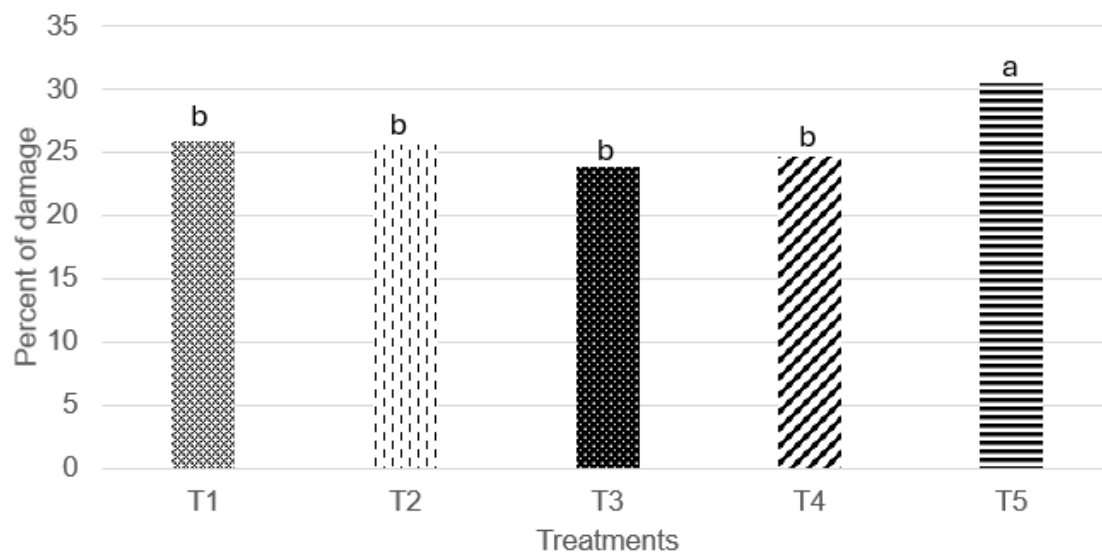


Figure 7. Mean *S. frugiperda* larval mortality (as proportions) caused by *M. rileyi* treatments; field test 2, Saltillo, Coahuila. T1-T4 are controls with no *M. rileyi* conidia (see Table 1 for description). T5: water + 0.03% surfactant + *M. rileyi*; T6: mineral oil + water + 0.03% surfactant + *M. rileyi*; T7: soybean oil + water + 0.03% surfactant + *M. rileyi*; T8: granules (bran) + *M. rileyi*; and T9: water + 0.03% surfactant + *B. bassiana*. Bar = Standard error of the mean. Means with a common letter are not significantly different (Tukey's test, $p > 0.05$).

