



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD SINALOA



Formulación y evaluación de microencapsulados y pellets a base de hongos y nemátodos entomopatógenos para el control del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

HÉCTOR ALEJANDRO LEYVA HERNÁNDEZ

GUASAVE, SINALOA; MEXICO DICIEMBRE DEL 2018



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa el día 10 del mes de diciembre del año 2018, el que suscribe **Héctor Alejandro Leyva Hernández** alumno del Programa de **Doctorado en Ciencias en Biotecnología**, con número de registro **A150315**, adscrito al **CIIDIR Unidad Sinaloa**, manifiesta que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Cipriano García Gutiérrez** y el **Dr. Jaime Ruiz Vega**, y cede los derechos del trabajo titulado **“Formulación y evaluación de microencapsulados y pellets a base de hongos y nemátodos entomopatógenos para el control del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones halexleyva@gmail.com; cgarciag@ipn.mx y jruizv@yahoo.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

HÉCTOR ALEJANDRO LEYVA HERNÁNDEZ



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 06 de Noviembre del 2015

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR- Sinaloa en su sesión ordinaria No. 7 celebrada el día 9 del mes de Julio conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

Leyva Hernández Héctor Alejandro
Apellido paterno Apellido materno Nombre (s)
Con registro:

A	1	5	0	3	1	5
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
Formulación y evaluación de microencapsulados y pellets a base de hongos y nemátodos entomopatógenos para el control del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:
Seleccionar una cepa nativa de hongo entomopatógeno en base a su virulencia para usarse como control para el gusano cogollero

Aislar e identificar nemátodos entomopatógenos
Elaborar formulaciones empleando como ingrediente activo a los hongos y nemátodos

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dr. Cipriano García Gutierrez y Dr. Jaime Ruiz Vega

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en: Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

Héctor Alejandro Leyva Hernández
Aspirante

Dra. Diana Cecilia Escobedo Uribe
Presidente del Colegio

Dr. Cipriano García Gutiérrez

Dr. Jaime Ruiz Vega

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
03 JUN 2016
RECIBIDO
DIRECCIÓN DE POSGRADO



CIIDIR - IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCIÓN



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa siendo las 10:00 horas del día 10 del mes de Diciembre del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR SINALOA para examinar la tesis titulada:

Formulación y evaluación de microencapsulados y pellets a base de hongos y nemátodos entomopatógenos para el control del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)

Presentada por el alumno:

<u>Leyva</u>	<u>Hernández</u>	<u>Héctor Alejandro</u>
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
Con registro:		
A	1	5
0	3	1
5		

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Cipriano García Gutiérrez

Dr. Jaime Ruiz Vega

Dr. Antonio Luna González

Dr. Carlos Ligne Calderón Vázquez

Dr. Sergio García Salas

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Héctor Manuel Esparza Leal



CIIDIR - IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCION

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis seres queridos. Por todas las veces que estuve ausente de ustedes. Por estar conmigo y por ayudarme a superar las dificultades que se iban presentando. Por ser mi fuerza cuando los altibajos (profesionales, laborales, personales y familiares) en este proceso surgieron.

A mis amigos, que permanecen conmigo y me demuestran que los amigos son la familia que uno escoge. Son tantos, que me enorgullece decir que NO LOS MENCIONARÉ uno a uno. Como mis buenos amigos, ustedes saben quienes son. Gracias por ser parte de mi familia.

A **mi abuelo Benjamín**, que además es mi amigo, y a **mis padres Héctor y Mirna** por ser piezas fundamentales en mi autorrealización, cada vez que necesité apoyo para mis experimentos personales. Por apoyarme siempre en hacer tangibles mis ideas y por ser una guía moral y ejemplo a seguir. Espero no fallar en demostrarles cómo y qué tanto es **LO MUCHO QUE LOS AMO** y todo lo que significan para mí. Gracias por darme tanto, muchas veces, sin siquiera pedirlo.

A mi hermana **Karen** y mi cuñado **Santiago**, quienes además de apoyarme, me han dado otra razón para seguirme superando y tratar de ser mejor ser humano: mi sobrina **Emma**, quién **secuestró mi corazón** desde el día que nos conocimos. **Gracias por tanto hermana.**

A **mi esposa Jeisa** (kesha). A quien **decirle TE AMO, es poco**, pues son tantos los motivos que tengo para dedicarle este trabajo. Por apoyarme y acompañarme en el camino del posgrado; Por vivir conmigo y experimentar en carne propia los sacrificios implícitos en este proceso. Sufrió ausencias, indiferencias, desvelos, mal pasadas y muchas dificultades de todo tipo. Pero el merito más grande es que lo hizo siempre con amor y con la mejor disposición, aun cuando fue una lucha que no decidió pelear por cuenta propia, y que a pesar de sus luchas personales y de las dificultades propias de su auto superación, SIEMPRE me demostró que ella está para mí, en mi esquina, recibéndome al terminar un round y preparándose para el siguiente. **Decirte TE AMO, es poco.**

A **mis suegros Ramón e Isabel**, **mi cuñada Jazmín** y **mi sobrina Mailen**, quienes constantemente me brindaron su apoyo y han demostrado ser MI FAMILIA. **Los llevo en mi corazón.**

A **mi amigo Abraham** y a **mi ahijado Oscarín Jr.** por **todo lo que representan para mí.**

A **mi tío Jorge** y a **mis primos Jorgito y Chamincito**, porque cambiaron mi vida y la de toda mi familia. Espero haberles hecho saber siempre lo mucho que los amo.

***Muy orgullosos y agradecidos de haberlos tenido con nosotros.
Con todo el amor, juntos por siempre, esperando el reencuentro.
LOS AMAMOS***

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Cipriano García Gutiérrez** por haberme brindado el apoyo y la confianza para desarrollar este proyecto. Además, por conducirme más allá de la investigación, al trato humanitario y por ser además de mi director de tesis, una persona de confianza y un compañero en la cancha. Gracias por demostrarme a mí y a mis compañeros la diferencia entre líder y jefe.

Al **Dr. Jaime Ruiz Vega** por haberme apoyado de las distintas formas en que, a pesar de la distancia, pudo hacerlo. Además, por haberme recibido y hecho sentir en casa en mi estancia en Oaxaca.

A todos los miembros de mi comité tutorial: **Dr. Antonio Luna, Dr. Carlos Calderón y Dr. Sergio García**. Les agradezco sus sugerencias, críticas constructivas y su siempre educada y bien intencionada forma de asesorarme para desarrollarme como investigador.

Agradezco también a la **M.C. Marcia Cuadras** por haber sido siempre un apoyo paralelo a mis estudios de posgrado y una mano amiga. Le agradezco mucho su transparencia.

Al **M.C. Jeovan Ávila** y a la **M. C. Leticia Peñuelas** por el respaldo y todas las muestras de apoyo personal, profesional y de comprensión que recibí de ustedes en el transcurso de este proceso.

Al personal del CIIDIR (Tino, Aldo, Toño, Gloria, Jorge David, Don Gabriel, Rafa) y en especial a **Fátima, Maggy y Anais**, por dar siempre un extra de sus funciones laborales. Muchas gracias por todo su apoyo.

A mis excompañeros y amigos del laboratorio de Bioinsecticidas **Cosme, Claudia, Arturito, Rojo, Ricardo, Mari Carmen, Guadalupe** y especialmente a **Nadia**, quien además de todo me dio la oportunidad de convertirnos en amigos. También agradezco a mi equipo (**compadre Israel, Cecy y Yareli**) por tantos momentos y experiencias que llevo en mis memorias, y que además, hicieron mas amenas las horas de comida. Gracias por dejarme entrar en sus vidas.

Agradezco a mi primer “kimosabi” **Cerbando Jara** por darme la oportunidad de ser parte de tu formación y por tanto trabajo que me ayudaste a realizar. Gracias por tu disposición y tu flexibilidad.

Gracias a **Lizett y Lizbeth Leal** por ser mis manos derechas. Por las pláticas, por escuchar y por estar siempre dispuestas y de buen modo para trabajar. Gracias por mostrarme el potencial que dos muchachas tan jóvenes pueden tener. Por último, mil gracias por tanto apoyo y por tanta paciencia.

Agradezco también a mi último equipo de trabajo: **Gabita**, por la disposición y el humor para sacar adelante los quehaceres. **Alicia**, mil gracias por siempre ser una persona de confianza y de tan nobles sentimientos. **Adara**, gracias por las muestras de amistad, a pesar de la brevedad en la que pudimos coincidir. **Chevy**, gracias por haberte mostrado siempre como un compañero y amigo. Además de ser un apoyo académico desinteresado y objetivo. **Dra. Sandra**, le agradezco su confianza y su siempre sonriente actitud, admiro su fuerza y su

trabajo. **Héctor Meza, Luis y Néstor**, con ustedes el trabajo a veces fue tan sano y divertido, que parecía juego, gracias por esos momentos.

Agradezco enérgicamente a: **Amada, Brenda** (paquita), **Candelario, Fernanda** (Claritas) **Gloria, Héctor Meza, Jacque, Luis, Majo, Néstor, Priego, Ricardo y Sandy**. Gracias a todos ustedes por hacer del último año un periodo tan fugaz. El tiempo parece pasar lento cuando lo disfrutas, y ustedes me regalaron momentos y vivencias que atesoro en mis memorias. Gracias por recibirme y por ganarse el título de “AMIGOS”.

Por último, quiero agradecer de manera especial a **Nadia**, por los extras que fueron mas allá de nuestra relación laboral. **Lorena**, por brindarme tu amistad y tu apoyo en cuestiones académicas. El haber contado contigo fue más que una gran ayuda, y además, clave para el desarrollo de este proyecto. Gracias por estar para mi y mil disculpas por no haber podido corresponderte como yo quería y como lo mereces. **Miguel**, por tu permanente amistad y siempre dispuesta actitud de ayudarme. También por demostrarme que nuestra amistad fue mas allá de la maestría y por considerarme para asuntos familiares, que se, son importantes para ti. **Cecy**, te agradezco pláticas y momentos que iniciaron y actualmente mantienen una amistad que deseo conservar. **Israel**, te agradezco la oportunidad de establecer una amistad que trascendió hasta nuestras familias, además de ayudarme a realizar y hasta la fecha continuar con el juego de softball, que tantas veces sirvió para extraerme del mundo y la rutina. **Luis**, gracias por la amistad, por el apoyo y por los momentos fraternales. **Tocayo**, gracias por la amistad y por las platicas en el camino, porque además de entretenidas fueron enriquecedoras. **Paquita**, te agradezco las charlas y los ratos de diversión. Así como también las veces que te hiciste presente en momentos difíciles. **Cande**, gracias por ser autentico, transparente y un amigo en toda la extensión de la palabra. **Majo**, muchas gracias por los momentos de sesión y sobre todo por haberme honrado con tu amistad. Gracias por la apertura que tuviste conmigo. Valoro y respeto mucho la confianza que recibí de ti. **Néstor**, te agradezco las platicas y los momentos de risa. También los momentos de seriedad y de trabajo. Gracias también por tu nobleza y tu siempre buena voluntad de hacer las cosas. Por lo anterior, también mis admiraciones. **Amada**, gracias por las a veces breves y a veces largas y profundas charlas. Aprecio mucho que me hayas permitido tu amistad y que me hayas compartido tu sincera persona. Agradezco tu franqueza. **Güerita**, a ti te agradezco tu confianza y tu entregada amistad, las pláticas y todas las veces que personalmente o en compañía de los demás, los días fueron mas llevaderos. Gracias por tu apertura y la satisfacción de ser tu amigo. Mil gracias además por compartirme tus dilemas existenciales, problemas, tristezas y alegrías. **Chilanga**, mil gracias por todas las veces que estuviste conmigo, presencialmente o a la distancia. Te agradezco infinitamente tu apoyo en la realización de este proyecto, pero agradezco mucho mas tu confianza, tu humanidad y por hacerme sentir que contaba contigo. Espero haya podido corresponderte como lo mereces.

A todos ustedes, les agradezco infinitamente por las cosas que fortalecieron nuestra amistad y que además, y tal vez sin querer, me ayudaron a entender cosas del mundo que no necesariamente tenían que ver con ustedes. Ha sido un placer coincidir con ustedes. **Gracias a todos por su bonita y valiosa amistad. Deseo conservarlos para el resto de mi vida y que nuestra amistad crezca y trascienda mas allá del CIIDIR. Los llevo en mi corazón.**

ÍNDICE

RESUMEN	1
OBJETIVOS	7
JUSTIFICACIÓN	9
HIPÓTESIS	10
INTRODUCCIÓN	11
CAPITULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	13
EL CULTIVO DE MAÍZ.....	14
Morfología, crecimiento y desarrollo	15
Importancia del maíz	18
Problemas fitosanitarios del maíz	19
GUSANO COGOLLERO <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith 1797)	20
Ubicación taxonómica	20
Ciclo de vida.....	21
Distribución y control en México.....	23
CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS	24
Hongos entomopatógenos	25
Nemátodos entomopatógenos	31
FORMULACIONES DE HONGOS Y NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS.....	33
Formulación de nemátodos.....	33
Formulación de hongos.....	34
MICROENCAPSULACIÓN DE HONGOS POR SECADO POR ASPERSIÓN PRODUCCIÓN DE PELLETS	36
CAPITULO II: EVALUACIÓN DE LA VIRULENCIA DE <i>Steinernema riobrave</i> Y <i>Rhabditis blumi</i> CONTRA LARVAS DEL TERCER INSTAR DE <i>Spodoptera frugiperda</i>	38
CAPITULO III: EVALUACIÓN DE LA VIRULENCIA Y EFECTO DE SINERGISMO Y ANTAGONISMO DE <i>Steinernema riobrave</i> (POINAR Y RAULSTON) Y <i>Metarhizium anisopliae</i> (METSCHN.) SOROKIN SOBRE LARVAS DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. SMITH).....	53

CAPITULO IV: POTENCIAL DE LA FORMULACIÓN EN PELLETS DE <i>Steinernema riobrave</i> y de <i>Acrobelloides camberenensis</i> Para El Control De <i>Spodoptera frugiperda</i>	68
CAPITULO V: FORMULACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DEL GUSANO COGOLLERO	77
DISCUSIONES INTEGRADORAS	97
CONCLUSIONES GENERALES.....	101
LITERATURA CONSULTADA	103

RESUMEN

El maíz es un cultivo de gran importancia a nivel mundial; sin embargo, adversidades climatológicas, enfermedades y plagas son factores que frecuentemente afectan y ponen en riesgo la producción de este cultivo, trayendo como consecuencia el uso intensivo de agroquímicos, entre estos los pesticidas de amplio espectro. El control biológico de plagas y en particular ofrece una alternativa ecológica al problema del uso de pesticidas químicos. Al respecto, los hongos (HE) y nemátodos entomopatógenos (NE) han sido utilizados para controlar diversos ordenes de insectos, como el orden Lepidoptera, al cual pertenece a la principal plaga del maíz el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797). Estos organismos pueden ser formulados para conservar viabilidad (supervivencia y patogenicidad) hasta el momento de ser aplicados. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue: Desarrollar formulaciones a partir de HE y NE, y evaluar su efectividad para controlar al gusano cogollero en laboratorio. Se emplearon cepas nativas de HE y NE pertenecientes al Laboratorio de Bioinsecticidas del CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa y NE provenientes del CIIDIR-IPN Unidad Oaxaca. Los HE fueron encapsulados por secado por aspersion con el fin de obtener un producto en polvo. Las formulaciones probadas fueron: HE microencapsulados y los NE en Pellets, a las cuales se evaluó la supervivencia del agente de control y mortalidad de gusano cogollero, empleando un diseño experimental completamente al azar y una prueba de comparación de medias de Tukey a un nivel de confianza del 95 % ($\alpha=0.05$). Esta investigación fue dividida en los siguientes estudios: a) Evaluación de la virulencia de *Steinernema riobrave* y *Rhabditis blumi* contra larvas del tercer instar de *S. frugiperda*, donde se evaluó la virulencia de los nematodos *S. riobrave* y la de un aislamiento nativo de *R. blumi*. Ambos NE fueron usados a dosis de 100, 250, y 500 juveniles infectivos (JI/mL) para inocular larvas del tercer instar de *S. frugiperda*. *S. riobrave* causó 90% de mortalidad a 500 JI/mL 96 h post inoculación, mientras que *R. blumi* no causó mortalidad de larvas a las concentraciones y tiempo de evaluación. b) Evaluación de la virulencia y efecto de antagonismo o sinergismo de *Steinernema riobrave* (Poinar y Raulston) y *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin sobre larvas de *S. frugiperda* (J.E. Smith), se evaluó la virulencia del

nemátodo *S. riobrave* en conjunto con el hongo *M. anisopliae* para el control de larvas *S. frugiperda*. Se realizaron pruebas para determinar el posible sinergismo o antagonismo entre estos organismos de control. El nemátodo fue suministrado a dosis de 250 JI/mL, y el hongo a una concentración de 1×10^8 esporas mL⁻¹, mientras que la combinación de ambos entomopatógenos fueron aplicados asperjando 1 mL, a las mismas dosis sobre larvas de tercer ínstar de *S. frugiperda*. Se evaluó mortalidad durante 7 días cada 24 h. El hongo causó una mortalidad del 13% a las 96 h, mientras que el nemátodo mató al 80% a las 48 h. Así mismo, la combinación de organismos mató al 100% de larvas a las 72 h. Los resultados de mortalidad de larvas de tercer ínstar mostraron que fue la virulencia del nemátodo la principal causa de mortalidad, y no fue posible determinar sinergismo entre estos. c) Potencial de la formulación en pellets de *Steinernema riobrave* y de *Acrobeloides camberenensis* para el control de *S. frugiperda*, se colectaron muestras de suelo en campos cultivados con maíz y en las que se colocaron diez larvas de *S. frugiperda* del tercer estadio en cada muestra; se almacenaron a 25 ± 2 ° durante 7 días. Los cadáveres de insectos se colocaron en trampa White para obtener nemátodos. Posteriormente estos se enfrentaron contra larvas de gusano cogollero vivos y muertos por congelación suministrándose 600 JI/ larva. El NE nativo fue caracterizado molecularmente como *Acrobeloides camberenensis* con un 91% de identidad. Los nemátodos *S. riobrave* y *A. camberenensis* se suministraron a dosis de 100, 250 y 500 JI/mL; se contabilizaron larvas muertas cada 24 h durante 7 días. Para la formulación se utilizó *S. riobrave* ya que el nemátodo nativo *A. camberenensis* no demostró ser efectivo para el control de *S. frugiperda* bajo las condiciones de este experimento. Para elaborar los pellets se utilizó Barro rojo (B), Tierra de diatomeas (TD) y Ceniza (C) en tres proporciones: 1:1:1 para el tratamiento 1; 40% B: 40% C: 20% TD tratamiento 2 y 85% B: 10% C: 5% TD para el tratamiento 3. Se obtuvieron pesos medios de T1:0.65g; T2:0.67g; T3=0.69g con un diámetro promedio de 1 cm. Se evaluó semanalmente la supervivencia y virulencia de los NE pelletizados. Los tratamientos 1 y 2 no fueron consistentes al fragmentarse fácilmente en su manipulación. El tratamiento 3 permitió obtener un pellet más estable, siendo el único tratamiento en el que se pudieron observar NE vivos la

primer semana post formulación. d) Formulación de hongos entomopatógenos para el control del gusano cogollero, Se evaluaron las cepas de *Beauveria bassiana* (B1, B3, B4 y B9) y las de *M. anisopliae* (M1 y M2) a concentraciones de 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 esporas mL^{-1} . Se seleccionó la cepa M1 a una concentración de 1×10^8 esporas mL^{-1} debido a la efectividad mostrada. Para la microencapsulación se elaboró una mezcla homogénea de 4 g/L de colorante rojo, 26 g/L de gelatina bovina y 20 mL/L de aceite de maíz; posteriormente se adicionaron 25 mL de agua destilada y se agitó para elaborar una mezcla integral. La mezcla se deshidrató a 40°C durante 24 h. posteriormente se fragmentó y tamizó a través de un tamiz número 6. Para el secado por aspersión, la velocidad de flujo fue de 10 mL/min y la temperatura de entrada en el secador fue de 130°C y de 85°C en la salida. El hongo *M. anisopliae* (M1) causó el 100 % de mortalidad de larvas de primer instar de *S. frugiperda* en 48 h a una concentración de 1×10^8 esporas mL^{-1} . Este tratamiento fue seleccionado para el secado por aspersión, sin embargo se observó que los conidios perdieron viabilidad al no haber germinado a las 18 h post inoculación en PDA a 28°C . En general se considera que es necesario mejorar las formulaciones y continuar con la búsqueda de NE nativos con mayor virulencia sobre *S. frugiperda*. Además, se resalta el potencial de los pellets para continuar con la formulación de NE.

ABSTRACT

Maize is a crop of great importance worldwide; However, climatic adversities, diseases and pests are factors that frequently affect and put at risk the production of this crop, bringing as a consequence the intensive use of agrochemicals, among these the broad spectrum pesticides. The biological control of pests offers an ecological alternative to the problem of the use of chemical pesticides. In this regard, fungi (EF) and entomopathogenic nematodes (EN) have been used to control various orders of insects, such as the order Lepidoptera, to which the main corn pest belongs, the armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797). These organisms can be formulated in order to conserve viability (survival and pathogenicity) until they are applied. Therefore, the objective of this research was: to develop formulations from EF and EN and to evaluate their effectiveness in controlling the fall armyworm in laboratory. Native strains of EF and EN were used, belonging to the Bioinsecticides laboratory from CIIDIR-IPN Sinaloa and EN coming from CIIDIR-IPN Oaxaca. EF were encapsulated by spray drying in order to obtain a powder product. The EN were formulated in and were previously reproduced in *Galleria mellonella* larvae. The formulations tested were: microencapsulated EF and Pelletized EN, which were evaluated determining the survival of the control agent and determining the number of dead fall armyworm larvae. The experiment was carried out under a completely randomized experimental design and a comparison test of Tukey's means was performed at a confidence level of 95% ($\alpha = 0.05$).

This investigation was divided into the following studies: a) Evaluation of the virulence of *Steinernema riobrave* and *Rhabditis blumi* against third instar *Spodoptera frugiperda* larvae, where the virulence of the *S. riobrave* nematode and a native isolation of *R. blumi*. Both EN were used at 100, 250, and 500 infective juveniles (IJ/mL) doses to inoculate third instar *S. frugiperda* larvae. *S. riobrave* caused 90% mortality at 500 IJ/mL 96 h after inoculation, whereas *R. blumi* did not cause larval mortality at the concentrations and time of the evaluation. *S. riobrave* has been considered viable to evaluate its effectiveness on the control of *S. frugiperda* in the field. b) Evaluation of the virulence and effect of antagonism or synergism of *Steinernema riobrave* (Poinar and Raulston) and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.)

Sorokin on larvae of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), The virulence of *S. riobrave* EN and *M. anisopliae* EF for the control of *S. frugiperda* larvae was evaluated. Tests were performed to determine the possible synergism or antagonism between these control organisms. The nematode was supplied at a dose of 250 IJ/mL, and the fungus at 1×10^8 spores mL⁻¹ concentration, while the combination of both entomopathogens were applied by spraying 1 mL at the same doses on third instar *S. frugiperda* larvae. Mortality was evaluated during 7 days every 24 h. The fungus caused a mortality of 13% at 96 h while the nematode killed 80% at 48 h. Likewise, the combination of organisms killed 100% of larvae at 72 h. The mortality results of third instar larvae showed that the virulence of the nematode was the main cause of mortality and was not possible to determine any other effect of synergism between these. c) Potential of the formulation in pellets of *Steinernema riobrave* and *Acrobelloides camberenensis* for the control of *Spodoptera frugiperda*, soil samples were collected in fields cultivated with corn and in which ten third instar *S. frugiperda* larvae were placed in each sample; were stored at 25 ± 2 ° for 7 days. Insect corpse were placed in a White trap to obtain nematodes. Subsequently, these were confronted against live death larvae and dead by freezing, providing 600 IJ/larvae. Native EN was molecularly characterized as *Acrobelloides camberenensis* with 91% identity. EN *S. riobrave* and *A. camberenensis* were supplied at doses of 100, 250 and 500 IJ/mL; dead larvae were counted every 24 h for 7 days. For the formulation, *S. riobrave* was used since the native nematode *A. camberenensis* did not prove to be effective for the control of *S. frugiperda* under the conditions of this experiment. Red clay (B), diatomaceous earth (TD) and ash (C) were used to produce the pellets in three proportions: 1: 1: 1 for treatment 1; 40% B: 40% C: 20% TD treatment 2 and 85% B: 10% C: 5% TD for treatment 3. Mean weights of T1 were obtained: 0.65g; T2: 0.67g; T3 = 0.69g with an average diameter of 1 cm. Survival and virulence of the pelleted EN were evaluated weekly. Treatments 1 and 2 were not consistent in fragmenting easily in their handling. Treatment 3 allowed obtaining a more stable pellet, being the only treatment in which live EN could be observed the first week post formulation. d) Formulation of entomopathogenic fungi for the control of the fall armyworm, *Beauveria bassiana* (B1, B3, B4 and B9) and *M. anisopliae* (M1 and M2)

strains were evaluated at concentrations of 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 and 1×10^8 spores mL^{-1} . Strain M1 was selected at a concentration of 1×10^8 spores mL^{-1} due to the effectiveness shown. For microencapsulation, a homogenous mixture of 4 g/L of red dye, 26 g/L of bovine gelatin and 20 mL/L of corn oil was prepared; subsequently, 25 mL of distilled water was added and stirred to make an integral mixture. The mixture was dehydrated at 40 °C for 24 h. subsequently it was fragmented and sieved through a number 6 sieve. For spray drying, the flow rate was 10 mL/min and the entry temperature in the dryer was 130 °C and 85° C at the exit. The fungus *M. anisopliae* (M1) caused 100% mortality of first instar *S. frugiperda* larvae in 48 h at a concentration of 1×10^8 spores mL^{-1} . This treatment was selected for spray drying, however it was observed that the conidia lost viability because they did not germinate at 18 h post inoculation in PDA at 28 °C. In general it is considered that it is necessary to improve the formulations and continue with the search for native NE with greater virulence on *S. frugiperda*. In addition, the potential of the pellets to continue with the formulation of NE is highlighted.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Formular hongos y nemátodos entomopatógenos como microencapsulados y pellets para el control del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) del maíz *Zea mays* (L).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Producir una cría axénica de *Spodoptera frugiperda*
2. Aislar e identificar nematodos entomopatógenos (NE)
3. Determinar por bioensayos el aislado de hongo entomopatógeno (HE) y nemátodo (NE) mas virulento contra el gusano cogollero del maíz
4. Evaluar la infección combinada de HE y NE previamente seleccionados sobre gusano cogollero del maíz
5. Formular los HE y NE mas sobresalientes
6. Evaluar la efectividad de las formulaciones para el control de *S. frugiperda* en laboratorio

Los resultados de este trabajo se presentan en los siguientes capítulos:

Capítulo I: Revisión bibliográfica: El cultivo del maíz, gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith 1797), control biológico de plagas, hongos entomopatógenos, nemátodos entomopatógenos, formulaciones de hongos y nemátodos entomopatógenos, microencapsulación por secado por aspersión y producción de pellets.

Capítulo II: Primer artículo publicado en la revista Southwestern Entomologist reconocida por Journal Citation Reports (JCR), correspondiente a los objetivos específicos 2 y 3: "Evaluación de la Virulencia de *Steinernema riobrave* y *Rhabditis blumi* contra Larvas del Tercer Instar de *Spodoptera frugiperda*".

Capítulo III: Segundo artículo sometido a la Revista Chilena de Entomología correspondiente al objetivo específico 4: “Evaluación de la virulencia y efecto de antagonismo o sinergismo de *Steinernema riobrave* (POINAR Y RAULSTON) y *Metarhizium anisopliae* (METSCHN.) SOROKIN sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH)”.

Capítulo IV: Nota científica sometida a la revista Southwestern Entomologist reconocida por Journal Citation Reports (JCR), correspondiente a los objetivos específicos 2, 5 y 6: “Potencial de la formulación en Pellets de *Steinernema riobrave* y de *Acrobelloides camberenensis* para el control de *Spodoptera frugiperda*”.

Capítulo V: Trabajo de tesis no incluido en los manuscritos para publicación en revistas: “Formulación de hongos entomopatógenos para el control del gusano cogollero”.

JUSTIFICACIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los principales alimentos a nivel mundial y ha jugado un importante papel en el desarrollo de las civilizaciones humanas. En México, el maíz es el cultivo más importante y se utiliza principalmente para la elaboración de alimentos, siendo el más sobresaliente la tortilla, además de servir de alimento para ganado.

El estado de Sinaloa es el principal productor de maíz en el país, sin embargo, el cultivo se ha visto severamente afectado y su producción en riesgo debido a la presencia de una amplia variedad de insectos plaga, entre las cuales *Spodoptera frugiperda* es considerada la principal plaga del maíz ya que puede llegar a causar grandes pérdidas económicas si no se realiza un adecuado manejo de la misma.

El uso de insecticidas químicos ha sido empleado intensivamente para controlar a esta y otras plagas; sin embargo, el uso indiscriminado de los mismos, ha generado una resistencia por parte del insecto, lo que ha conllevado a usar cada vez más producto, lo cual ha traído contraproducentes consecuencias a la salud humana, fauna benéfica y al medio ambiente.

Debido a la problemática ocasionada por el control químico, ha surgido un creciente interés en el empleo de organismos que puedan desempeñarse como agentes de control biológico, contrarrestando así el uso de productos químicos y los efectos que estos generan.

El uso de hongos y nemátodos entomopatógenos como agentes de control biológico, se ha incrementado debido a que poseen un intervalo de especificidad a ciertas especies de insectos plaga sin afectar a especies no blanco, lo que es además una alternativa más amigable con el ambiente. Así mismo, sus características y particular modo de acción sugieren potencial para ser utilizados simultáneamente como agentes de control combinados,.

Sin embargo, el empleo de HE y NE se ve limitado por la formulación en la que estos se hayan elaborado, buscando conservar su viabilidad. Por lo que el presente proyecto se enfoca en tal procedimiento.

HIPÓTESIS

A nivel de laboratorio al menos una formulación de hongos y nematodos entomopatógenos formulados en microencapsulados o pellets será efectiva para el control del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El maíz es un cultivo de gran importancia a nivel mundial, pues además de proporcionar un completo aporte nutricional, es la base para elaborar distintos alimentos. En México, constituye el principal cultivo y es fuente de insumo para la ganadería y agroindustria, además de formar parte de la alimentación diaria del pueblo mexicano (Paliwal et al., 2001; SAGARPA, 2014).

El estado de Sinaloa es el principal estado productor de este cultivo, ocupando los primeros lugares en producción de maíz grano y semilla en 2013 (SIAP-SAGARPA, 2014). Sin embargo, dicha producción se ve en riesgo al enfrentarse a diversas enfermedades y plagas, siendo el gusano cogollero *S. frugiperda* (J.E. Smith, 1797), la principal plaga del maíz, llegando a causar hasta el 60 por ciento de las pérdidas (CIMMYT, 2004; CESAVEG, 2012).

Para el control de gusano cogollero se han empleado insecticidas químicos sintéticos de amplio espectro, lo que ha provocado una gran contaminación ambiental, efectos negativos para la salud humana y fauna benéfica, y en ocasiones sin obtener el control deseado sobre la plaga (Mahr et al., 2008; Cortez et al., 2011). Además, otra consecuencia grave ha sido la generación de resistencia a insecticidas químicos, lo que ha intensificado el uso de control químico incrementando los problemas que este conlleva (León et al., 2012).

El control biológico es una alternativa para el control de plagas que reduce dichos efectos nocivos, es altamente específico contra las plagas objetivo y amigable con el ambiente (Mahr et al., 2008; Nava et al., 2012). Sin embargo, el complejo de enemigos naturales representa un campo amplio de investigación, pues aún es poco conocido, por lo que hay un gran interés en desarrollar métodos de control biológico contra el gusano cogollero, el cual es susceptible a hongos, nemátodos y a otros microorganismos entomopatógenos (Ruiz et al., 2013).

El uso de HE y NE como agentes de control biológico, ha sido empleado debido a sus características de reproducción, rango de hospederos y modo de acción, parasitando y reproduciéndose, resultando en más cuerpos infecciosos que matarán más insectos. Uno de los órdenes de insectos que pueden ser atacados por estos organismos es el orden *Lepidoptera* (mariposas y polillas) como lo es el gusano

cogollero. Estos insectos con metamorfosis completa normalmente son parasitados en sus estadios larvales, aunque algunos pueden ser parasitados cuando pupan o cuando son adultos (Mahr et al., 2008).

Para la aplicación de estos organismos, estos tienen que colocarse en su forma activa en un agente portador (formulación), el cual debe desarrollarse en materiales que garanticen la supervivencia de estos en sus etapas infectivas por un periodo necesario hasta el momento de su aplicación (Hussein y Abdel-Aty, 2012) por lo que se deben de tomar en cuenta una serie de factores al momento de elaborar formulaciones, ya que dependiendo del material portador o de la especie fue el resultado obtenido (Miles et al., 2012). La misma especie puede tener diferentes resultados dependiendo de la formulación en la que se haya elaborado, o diferentes pueden responder de manera distinta a una misma formulación (Hussein y Abdel-Aty, 2012). Por lo que el desarrollar nuevas tecnologías y formulaciones que favorezcan tanto la supervivencia como la patogenicidad de los agentes de control biológico es un área de oportunidad por explotar. Por lo anterior, el presente estudio tuvo por objetivo: Formular microencapsulados y pellets a base de HE y NE, buscando mantener su viabilidad y conservar la patogenicidad contra el control del gusano cogollero.

CAPITULO I:
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

EL CULTIVO DEL MAÍZ

El maíz es uno de los granos alimenticios más antiguos, pertenece a la familia de las Poáceas (gramíneas), tribu Maydeas, y es la única especie cultivada de este género. Otras especies del género *Zea*, comúnmente llamadas teosinte y las especies del género *Tripsacum* conocidas como arrocillo o maicillo son formas salvajes parientes de *Z. mays*. Son clasificadas como del “nuevo mundo” porque su centro de origen está en América.

El maíz cultivado es una planta completamente domesticada que ha vivido y evolucionado junto al hombre desde tiempos remotos. El maíz no crece en forma salvaje y no puede sobrevivir en la naturaleza, siendo completamente dependiente de los cuidados del hombre.

El maíz es una de las especies cultivadas más productivas. Es una planta C4 con una alta tasa de actividad fotosintética. Tiene el más alto potencial para la producción de carbohidratos por unidad de superficie por día. Fue el primer cereal a ser sometido a rápidas e importantes transformaciones tecnológicas en su forma de cultivo, tal como se pone en evidencia en la bien documentada historia del maíz híbrido en los Estados Unidos de América y posteriormente en Europa. El éxito de la tecnología basada en la ciencia para el cultivo del maíz ha estimulado una revolución agrícola generalizada en muchas partes del mundo (Paliwal et al., 2001).

El maíz, junto con el trigo y el arroz, es uno de los principales alimentos básicos del mundo, y su demanda continúa en crecimiento (FAO, 2002), es un cereal que a diferencia de otros, contiene altas concentraciones de aminoácidos esenciales que influye en la asimilación de proteínas. El 72 % del peso del grano corresponde al almidón, otros azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa oscilan del 1 al 3%, el contenido de proteína es de alrededor del 8 al 11%, los ácidos grasos varían del 3 al 18%, la fibra varía de un 10 a un 15%, los minerales contenidos corresponden al 1.3% y las vitaminas liposolubles e hidrosolubles los valores corresponden a 1 mg/kg y 20 µg/g, respectivamente (FAO, 1993; Benítez, 2006).

Morfología, crecimiento y desarrollo

El maíz necesita de 450 a 600 mm de agua por temporada, la cual es adquirida principalmente de las reservas húmedas del suelo. Por cada milímetro de agua consumida, son producidos alrededor de 15 kg de grano. Al llegar a la madurez, cada planta de maíz habrá consumido 250 L de agua (Plessis, 2003). La planta del maíz es de aspecto robusto. Recuerda al de una caña. Tiene un solo tallo de gran longitud, sin ramificaciones, que puede alcanzar hasta 4 m de altura. Al hacerle un corte presenta una médula esponjosa. La planta tiene flores tanto masculinas como femeninas. La inflorescencia masculina es un espigón o penacho amarillo que puede almacenar de veinte a 25 millones de granos de polen. La femenina tiene menos granos de polen, mil como máximo, y se forman en unas estructuras vegetativas denominadas espádices.

Las hojas son largas y extensas, con terminación en forma de lanza, o lanceoladas, de extremos cortantes y con vellosidades en la parte superior. El área total en la etapa de madurez puede exceder el metro cuadrado por planta. Sus raíces son fasciculadas, o sea, todas presentan más o menos el mismo grosor, y su misión es aportar un perfecto anclaje a la planta. En algunos casos pueden verse los nudos de las raíces a nivel del suelo (Plessis, 2003; SAGARPA, 2014).

Etapas de crecimiento y desarrollo

Las diferentes etapas de crecimiento duran desde que la semilla es plantada y alcanza a formarse una plántula visible por encima de la superficie del suelo, hasta cuando la planta alcanza una etapa de madurez biológica.

Etapa de crecimiento 0; Germinación y emergencia (VE)

Esta etapa corresponde al periodo desde que la semilla es plantada hasta la emergencia de la plántula. Durante la germinación, el punto de crecimiento y el tallo se encuentran 2 a 4 cm debajo de la superficie del suelo. En temperaturas altas, las condiciones de humedad propician que la plántula emerja entre 6 y 10 días, sin embargo, en condiciones secas o de bajas temperaturas, este proceso puede tardar

dos semanas más. El rango óptimo de temperatura para la germinación esta entre 20 y 30°C, mientras que la humedad optima del suelo debe ser de aproximadamente 60% de la capacidad del suelo (Plessis, 2003; Pioneer, 2015).

Etapa de crecimiento 1 (Etapa V3)

Despliegue completo de 4 hojas. El número máximo de hojas y brotes laterales esta predeterminado y una hoja nueva se despliega cada tres días aproximadamente. En esta etapa, el punto de crecimiento se encuentra todavía debajo de la superficie del suelo y las partes aéreas están limitadas a vainas y hojas. En esta etapa ocurre también el inicio de la floración. Los pelos de la raíz están creciendo de las raíces nodales a medida que las raíces seminales dejan de crecer. (Plessis, 2003; Pioneer, 2015).

Etapa de crecimiento 2

Despliegue completo de 8 hojas. Durante este periodo, el área del follaje incrementa de 5 a 10 veces, mientras que la masa del tallo incrementa de 50 a 100 veces. Comienza la formación de mazorcas. El vástago empieza a desarrollarse desde los nodos debajo de la superficie del suelo. El punto de crecimiento en esta etapa es de 5 a 7.5 cm sobre la superficie del suelo (Plessis, 2003).

Etapa de crecimiento 3 (Etapa V4)

Despliegue completo de 12 hojas. Todos los brotes se han producido y la espiga en el punto de crecimiento empieza a desarrollarse rápidamente. Los brotes laterales que llevan mazorcas se desarrollan rápidamente del sexto al octavo nodo por encima de la superficie del suelo y el número potencial de brotes de semillas de la mazorca ya se ha determinado (Plessis, 2003; Pioneer, 2015).

Etapa de crecimiento 4 (Etapa V5)

Despliegue completo de 16 hojas. El tallo se alarga rápidamente y la espiga está casi completamente desarrollada, formándose en el extremo del punto de crecimiento. Los estigmas comienzan a desarrollarse y a prolongarse desde la base de la

mazorca superior. La altura de la parte aérea de la planta es de aproximadamente 8 pulgadas (Plessis, 2003; Pioneer, 2015).

Etapa de crecimiento 5 (Etapa VT)

Aparecimiento de estigmas y derrame de polen. Todas las hojas están completamente desplegadas y la espiga ha sido visible de dos a tres días. Los brotes laterales soportan la mazorca principal así como las brácteas casi han alcanzado la madurez. En este punto, la demanda de nutrientes y agua es alto. Además, La planta está cerca de alcanzar su altura máxima, inicia la liberación de polen que dura de una a dos semanas (Plessis, 2003; Pioneer, 2015).

Etapa de crecimiento 6 (Fase reproductiva R1)

Las mazorcas, los brotes laterales y las brácteas están completamente desarrolladas, el almidón empieza a acumularse en el endospermo (Plessis, 2003)

Etapa de crecimiento 7

La masa del grano continua en incremento y los azúcares son convertidos en almidón (Plessis, 2003).

Etapa de crecimiento 8

Los azúcares desaparecen del grano. El almidón se acumula en la corona del grano y se extiende hacia abajo (Plessis, 2003).

Etapa de crecimiento 9

Cuando el grano ha alcanzado su masa seca máxima, una capa de células negras se desarrolla en la base del grano. Los granos son fisiológicamente maduros y solo la humedad contenida debe ser reducida (Plessis, 2003).

Etapa de crecimiento 10

Aunque los granos hayan alcanzado la madurez fisiológica, deben secarse antes de alcanzar la madurez biológica. Bajo condiciones favorables, el secado ocurre aproximadamente 5 % por semana hasta el nivel de 20%, después de lo cual hay una desaceleración (Plessis, 2003).

Importancia del maíz

En 2013, el total de la producción mundial de maíz superó las 4606 millones de toneladas (FAOSTAT, 2014). Actualmente el maíz es el segundo cultivo por su producción a nivel mundial, después del trigo y superando al arroz, es además el primer cereal en rendimiento de grano por hectárea y el segundo después del trigo en producción total. Es un importante alimento, tanto para los humanos como para los animales, además de servir como materia prima para la elaboración de diversos productos, ningún cultivo lo supera en la variación de ambientes en los que puede ser cultivado aunque la mayor parte del maíz es cultivado a altitudes medias, pero se cultiva también por debajo del nivel del mar en las planicies del Caspio y hasta los 3 800 msnm en la cordillera de los Andes. Más aún, el cultivo continúa a expandirse a nuevas áreas y a nuevos ambientes (Paliwal et al., 2001).

En México, el maíz es el cultivo más importante. El maíz blanco en grano se utiliza principalmente para la elaboración de las tradicionales tortillas y tamales, pero de él también pueden obtenerse aceite e insumos para la fabricación de barnices, pinturas, cauchos artificiales y jabones. El maíz amarillo en grano también se utiliza para consumo humano en una amplia variedad de platillos; sin embargo, su principal destino es la alimentación del ganado y la producción de almidones (SAGARPA, 2014).

En 2013, la superficie total sembrada de maíz fue de 8,060,789.54 ha, generando una producción de 35,325,272.75 t, por lo que el rendimiento alcanzado fue de 36.37 t/ha, lo cual generó un valor de producción de \$83,651,658,750 (SIAP-SAGARPA, 2014).

En Sinaloa se obtienen los rendimientos más altos a nivel nacional, lo cual se explica por la calidad de su suelo, así como por el uso intensivo de capital, lo cual se traduce en utilización de maquinaria y equipo, además de asistencia técnica y semillas altamente productivas. Sinaloa, ocupó el primer lugar en producción de maíz grano en 2013, con una producción de 3,627,777.51 t, correspondiente al 10% de la producción nacional, generando un valor de producción de \$12,026,665,110; además, ocupó el cuarto lugar en producción de maíz grano semilla con una producción de 245 t (SIAP-SAGARPA, 2014).

Sin embargo, aun cuando la producción de maíz es elevada y la economía es autosuficiente en maíz blanco, no lo es en maíz amarillo, el cual es insuficiente para satisfacer la demanda nacional del mismo, de modo que se ha tenido que recurrir a la importación de maíz convirtiéndolo en el producto agrícola más importado de los Estados Unidos. En 2012 México importó 9 millones 515,000 t de maíz, de las cuales 87.9% provino de EU; el resto de Sudáfrica y Brasil (FAO, 2014).

Problemas fitosanitarios del Maíz

El cultivo de maíz puede ser afectado por una serie de agentes patógenos, vectores o plagas que causan importantes daños económicos a su producción y ponen en riesgo la seguridad alimentaria (Paliwal et al., 2001). Dentro de las enfermedades más comunes causadas por hongos destacan el carbón de la espiga *Sphacelotheca reiliana* (Khun), la Roya común *Puccinia sorghi*, el Tizón foliar *Exserohilium turcicum*, la Pudrición de tallo y antracnosis foliar *Colletotrichum graminicola*, la Pudrición de raíz *Pythium aphanidermatum* y *Fusarium* spp. , la Pudrición de tallo *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium* spp. y las Manchas foliares o tizón *Helminthosporium maydis* (CIMMYT, 2004; SAGARPA, 2010; CESAVEG, 2012). Por otro lado, bacterias y virus también son causantes de enfermedades en maíz, como el achaparramiento del maíz *Spiroplasma kunkeli* y el Mosaico del maíz VMM (CIMMYT, 2004).

Respecto a las plagas, hay una gran variedad de insectos que afectan al cultivo del maíz, donde los más comunes son el Barrenador del tallo *Diatraea* sp., la Araña roja *Olygonychus mexicanus* y *Tetranychus* sp, el Chapulin *Sphenarium purpurascens*,

Melanoplus differentialis y *Taeniopoda eques*, la Gallina ciega *Phyllophaga* sp., *Cyclocephala* sp., *Diplotaxis* sp., *Macroductylus* sp. y *Anomala* sp., los Trips *Frankliniella williamsi*, el Gusano alfilerillo *Diabrotica* balteada, al Gusano trozador *Agrotis* sp., el Gusano elotero *Helicoverpa zea*, el Gusano soldado *Spodoptera exigua* y el Gusano Cogollero *S. frugiperda* (J.E. Smith, 1797), siendo esta última la plaga más importante del maíz en México, llegando a causar hasta el 60% de las pérdidas (CIMMYT, 2004; SAGARPA, 2010; CESAVEG, 2012; León et al., 2012; Valdez et al., 2012).

GUSANO COGOLLERO *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith 1797)

El gusano cogollero es nativo de las regiones tropicales del hemisferio occidental, desde los Estados Unidos de América hasta Argentina y afecta a casi todas las zonas productoras. Es un fuerte volador, por lo cual se dispersa largas distancias anualmente durante el verano (Capinera, 2008; SAGARPA, 2010). Presenta 6 estadios larvales que es cuando produce daños a los cultivos y dichas larvas, de hábitos gregarios y canibalísticos se establecen en el cogollo de la planta, alimentándose de las inflorescencias sin desarrollar de las plantas jóvenes, lo que genera un daño simultáneo sobre varios pliegues, pues las hojas están enrolladas en sí mismas, de manera que al momento del despliegue de las hojas, estas muestran perforaciones simétricas o desgarradas, según sea el tamaño y la población de larvas alimentándose. Por otro lado, si el maíz es pequeño y se suscita un ataque masivo, las plantas pueden ser totalmente defoliadas, y en caso de maíces grandes, el extremo de defoliación puede llegar hasta la permanencia de la nervadura central (Villa y Catalán, 2004; SAGARPA, 2010; CESAVEG, 2012).

Ubicación taxonómica

El Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS, por sus siglas en inglés) clasifica a *S. frugiperda* (J.E. Smith, 1797) de la siguiente manera:

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Lepidoptera

Familia: Noctuidae

Género: *Spodoptera*

Especie: *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797)

Ciclo de vida

El ciclo de vida (Fig. 1) se completa con alrededor de 30 días en el verano, 60 días en primavera y otoño y de 80 a 90 días en invierno. El número de generaciones existentes en un área varía respecto a la aparición de adultos dispersos (Capinera, 2008).

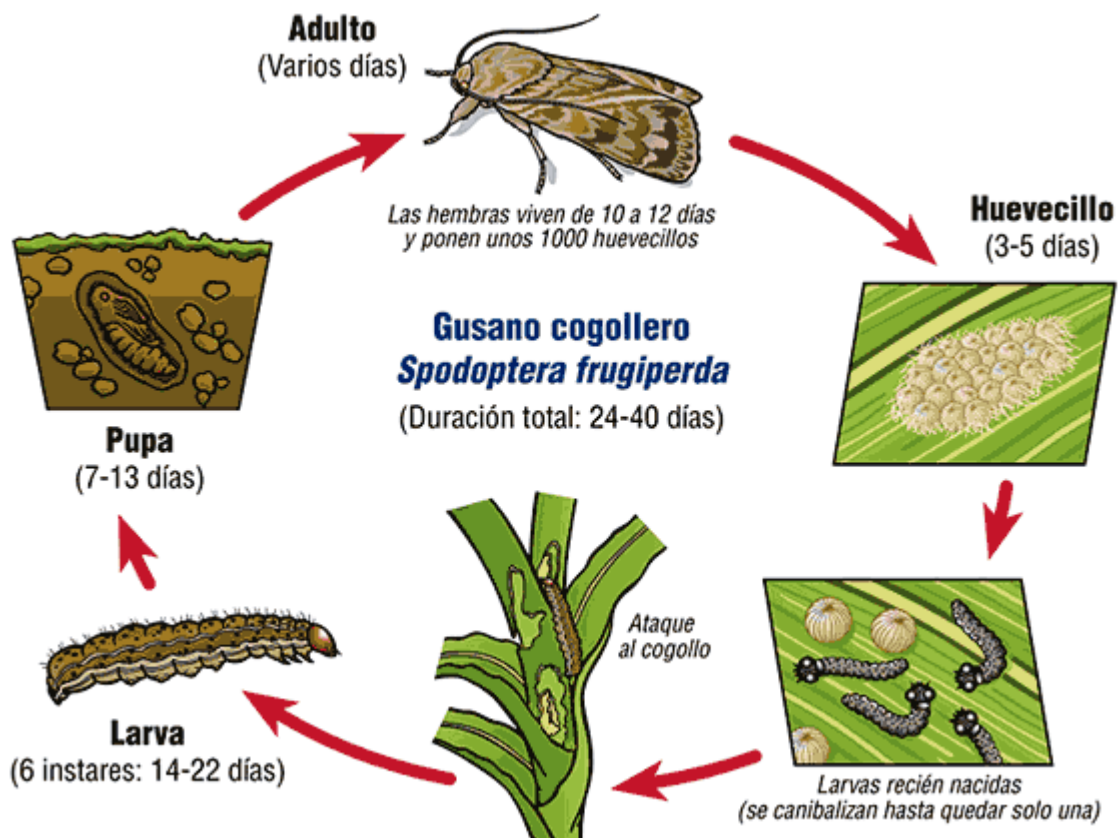


Figura 1. Ciclo de vida de *S. frugiperda* (J. E. Smith, 1797).

Huevos

Los huevos son en forma de cúpula, de color blanco-cremoso y son de un tamaño aproximado de 0.5mm de diámetro. Esto son depositados en masa, mayormente en el envés de las hojas, aunque puede ser también en el haz y una vez depositados son cubiertos con finas escamas del adulto (Capinera, 2008; López, 2012).

Larva

El estadio larvario incluye por lo general 5 ó 6 estadios larvales (ínstars), distinguiéndose por el tamaño y el color de las larvas. Durante el desarrollo se pueden diferenciar perfectamente los ínstars a los que pertenece, debido a las mudas a consecuencia de cambios hormonales causantes de variaciones en tamaño, comportamiento y morfología (Villa y Catalán, 2004; López, 2012).

Primer ínstar

Al salir de los huevos, la larvas miden aproximadamente 1.5 mm de largo, son de color blanquecino, cabeza negra y prominente, y el cuerpo cubierto de pelos finos (López, 2012).

Segundo ínstar

La longitud de las larvas es de 8mm y la cabeza es de color café oscuro, al final de este ínstar es notable la sutura en la parte frontal de la cabeza en forma de "Y" (López, 2012).

Tercer ínstar

Las larvas miden aproximadamente 15 mm de largo, la cabeza es de color café claro, de cuerpo alargado y más robusto, presenta bandas longitudinales de color café claro y blanco (López, 2012).

Cuarto instar

Las larvas miden hasta 25 mm de largo, presentan unas bandas longitudinales de color verde claro y café claro, muestra muy notablemente 4 puntos en los últimos segmentos abdominales y la cabeza es de color café (López, 2012).

Quinto instar

La larva está en su máximo desarrollo, alcanzando de 34 a 44 mm de longitud, es una larva grande y robusta (López, 2012).

Pupa

Mayormente la pupa se desarrolla en el suelo, es café rojizo y puede llegar a medir hasta 18 mm de longitud; se desarrolla en un rango de temperatura que fluctúa entre los 28 °C y 30 °C. Este periodo puede durar de 8 a 9 días en verano y de 20 a 30 días en Invierno (López, 2012).

Adulto

Son palomillas nocturnas con mucha movilidad, facilitando que se puedan desplazar para encontrar cultivos de los cuales alimentarse, prefieren los climas templados con una humedad relativa alta en el ambiente. Los machos, a diferencia de las hembras, poseen manchas de color blanco en la parte central y final de las alas anteriores. Viven aproximadamente 10 días en condiciones favorables y ovipositan desde los 5 días de haber emergido de la pupa (López, 2012).

Distribucion y control en México

La distribución del gusano cogollero es muy amplia, encontrándose en todas las zonas productoras de maíz, sin embargo, es más abundante su presencia en las regiones tropicales y subtropicales (SENASICA, 2009). Su presencia y daños en la República Mexicana se han reportado en los siguientes estados: Baja California Norte, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Colima, Jalisco, Michoacán, Chihuahua, Durango, San Luis Potosí, Guanajuato, Tamaulipas, Hidalgo, Puebla, México, Guerrero, Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Campeche, Quintana Roo y Yucatán (López, 2012).

En Sinaloa, para el control de gusano cogollero se recurre exclusivamente a insecticidas químicos sintéticos de amplio espectro, con más de veinticinco años en el mercado, con lo que se provoca elevada contaminación ambiental con múltiples efectos negativos y en ocasiones sin obtener el control deseado sobre la plaga (Cortez et al., 2011). Por otro lado, el empleo descontrolado de productos químicos para controlar al gusano cogollero ha traído consecuencias como la generación de resistencia, esta se ha presentado a compuestos organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides tanto en Estados Unidos de América como en México aun cuando se llevó una rotación de grupos toxicológicos por regiones (León et al., 2012). Otra problemática de estos hábitos descontrolados de aplicación de agentes químicos, ha sido la contaminación y sus efectos nocivos tanto para la salud humana como para la fauna benéfica, por ejemplo, los insectos polinizadores y los enemigos naturales de insectos plaga (Mahr et al., 2008; Cortez et al., 2011), por lo que el control biológico es un método de control de plagas ha sido una alternativa a estos métodos nocivos, pues son altamente específicos contra las plagas objetivo y amigables con el ambiente, pues no empeoran la contaminación del medio ambiente. La diferencia principal entre el control químico y el biológico, es que, dado que los enemigos naturales necesitan de sus hospederos para sobrevivir, el control biológico funciona mejor cuando hay una población pequeña de insectos plaga (Mahr et al., 2008; Nava et al., 2012).

En México, el complejo de enemigos naturales es escasamente conocido, sin embargo, hay un alto interés en desarrollar métodos de control biológico para controlar al gusano cogollero, el cual es susceptible a hongos, nemátodos y a otros microorganismos patógenos (Ruiz et al., 2013).

CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS

El control biológico representa una alternativa al uso de insecticidas. Es la manipulación intencional de poblaciones de organismos benéficos vivos, llamados enemigos naturales, con el fin de limitar las poblaciones de insectos plaga con la intención, no de erradicar a los insectos plaga, pero si con la intención de mantenerlos a niveles de tolerancia tales que no causen daños severos.

Virtualmente, todas las plagas tienen enemigos naturales y con un manejo apropiado, estos enemigos naturales pueden controlar a dichas plagas; y aunque el control biológico no controlara a todas las plagas todo el tiempo, este puede ser la base de un enfoque llamado Manejo Integrado de Plagas, el cual combina una variedad de métodos de control de plagas. El control biológico puede ser efectivo, económico y seguro, y podría ser más ampliamente usado de lo que es hoy día (Mahr et al., 2008).

Los enemigos naturales de los insectos plaga son un grupo diverso de organismos, incluyendo depredadores, insectos parásitos, nemátodos y una variedad de microorganismos entomopatógenos, estos últimos incluyen virus, bacterias, hongos y otros microorganismos, que aunque no son capaces de causar enfermedades epidemiológicas, son importantes para la supresión constante de las poblaciones de plagas. Un hecho muy importante es que, estos organismos patógenos son justamente específicos para el huésped, lo que evita que dañe a organismos no-objetivo como los insectos benéficos, humanos, animales de crianza, vida silvestre o plantas (Mahr et al., 2008).

Hongos entomopatógenos

Los HE son un grupo de microorganismos que emplean a diferentes órdenes de artrópodos como hospederos para desarrollar parte de su ciclo de vida y a diferencia de los virus, bacterias y protistas, que deben ser ingeridos, los hongos poseen un modo único de infección, donde las esporas de los hongos usualmente germinan en el exterior de la cutícula de los insectos y sus hifas penetran a través de ella, esto es por qué los hongos entomopatógenos son capaces de infectar huevos (Asi et al., 2013). Dado que no necesitan ser ingeridos para parasitar, son los únicos patógenos importantes capaces de infectar insectos que se alimentan de savia. Algunos HE no producen crecimiento superficial o producen muy poco; la mayoría son patógenos obligados o facultativos y algunos son simbióticos, su crecimiento y desarrollo están limitados principalmente por las condiciones ambientales externas, independientemente del hospedero, la alta humedad y temperatura adecuada favorecerán la esporulación y germinación de esporas, siendo limitada su efectividad

en condiciones secas. Son organismos heterótrofos, que poseen células quitinasas, normalmente no móviles. La dispersión de las esporas se realiza por contaminación ambiental a través del viento, la lluvia e incluso individuos enfermos al entrar en contacto con otros sanos. Normalmente son especies específicas o de amplio espectro de hospedantes (insectos y ácaros). El hongo sale del insecto enfermo a través de las aperturas (boca, ano, orificios de unión de los tegumentos y artejos) y en el exterior forma sus estructuras fructíferas y produce esporas. Los insectos enfermos no se alimentan, presentan debilidad y desorientación y cambian de color, presentando manchas oscuras sobre el tegumento que corresponden con las esporas germinadas del hongo (Mahr et al., 2008; Archuleta, 2012).

El ciclo de la enfermedad fúngica inicia con la adhesión de la espora al cuerpo del insecto y sucede cuando la espora del primero es depositada en la superficie de este último; este proceso está mediado por la presencia de moléculas sintetizadas por el hongo denominadas adhesinas y ocurre en tres etapas sucesivas: la adsorción de la espora a la superficie mediante el reconocimiento de receptores específicos de naturaleza glicoprotéica en el insecto, la adhesión o consolidación de la interfase entre la espora pregerminada y la epicutícula y finalmente, la germinación y desarrollo hasta la formación del apresorio para comenzar la fase de penetración, la cual inicia con un mecanismo físico-químico que consiste en la presión ejercida por una estructura fúngica denominada haustorio, el cual deforma primeramente la capa cuticular rompiendo luego las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula; posteriormente debido a la acción enzimática – de actividades hidrolíticas tales como proteasas, lipasas y quitinasas– se degrada el tejido en la zona de penetración facilitando la entrada del hongo; este proceso depende del grosor de la cutícula, la esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales. Otro mecanismo utilizado para penetrar al hemocele es a través de la cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas del insecto, dado que el tracto alimenticio es húmedo, la espora puede germinar rápidamente en este ambiente; sin embargo, los fluidos digestivos pueden destruir o degradar la hifa germinativa y en algunos casos la digestión de estructuras fúngicas puede causar la muerte por toxicidad más que por micosis. Por último, la replicación en el hemocele, generalmente los hongos

realizan transición dimórfica de micelio a levadura y una vez que han evadido el sistema inmune del insecto, se produce una septicemia, induciendo a síntomas fisiológicos anormales como convulsiones, carencia de coordinación, comportamientos alterados y parálisis. La muerte sobreviene por una combinación de efectos que comprenden el daño físico de tejidos, toxicosis, deshidratación de las células por pérdida de fluido y consumo de nutrientes (Mahr et al., 2008; Archuleta, 2012).

Cuando el hongo entra al cuerpo del insecto, se enfrenta al sistema inmunológico de este, por lo que ha tenido que desarrollar mecanismos de defensa como cambios estructurales en su pared celular o producción de toxinas así como de metabolitos secundarios; de modo que al aislarlos y probarlos contra insectos, se ha demostrado su poder insecticida. Cuando se forma una pared celular, este se desarrolla como protoplasto, evadiendo el reconocimiento por los hemocitos circulantes en el hemocele y una vez que el insecto no aporta más nutrientes (nitrógeno), las fases levaduriformes retoman su crecimiento micelial. Por último, cuando las condiciones de humedad y temperatura son las adecuadas, las hifas del hongo emergen nuevamente al exterior del cadáver del insecto, donde esporula, esperando que ocurra la dispersión de las esporas (Archuleta, 2012).

Las características de la infección por el hongo pueden o no mostrar síntomas al inicio de la enfermedad, en algunos casos se pueden observar manchas necróticas en donde el hongo ha penetrado, sin embargo, al avanzar el periodo de infección los insectos generalmente se muestran inquietos, menos activos, presentan debilidad y desorientación y cambian de color, su apetito se reduce y pierden coordinación; cambian de color además de presentar manchas oscuras correspondientes a esporas germinadas. Posterior a eso el insecto muere, se endurece volviéndose quebradizo y se cubre de micelio, siendo la momificación la característica particular de infección por hongos, esto es seguido por la esporulación del hongo sobre el cadáver, lo cual dependerá de la humedad relativa y la temperatura, específicamente cuando la atmósfera está saturada el micelio emergerá a través del integumento y

desarrolla 10 conidióforos, si no el cadáver permanece momificado, compacto y frágil (Archuleta, 2012; SENASICA, 2014).

Se han descrito entre 80,000 y 120,000 especies de hongos (Webster y Weber, 2007), sin embargo las especies de hongos entomopatógenos que han sido usados para el control de insectos son pocas, entre ellas están *Verticillium lecanii*, *Hirsutella thompsonii*, *Nomurae rileyi*, *Aschersonia aleyrodis*, además de los hongos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* los cuales han sido empleados mayormente como agentes de control biológico de insectos plaga (Espinoza 2003; Mohammadbeigi y Port, 2015)

Beauveria bassiana es un hongo de distribución cosmopolita, filamentoso de la división Ascomycota que afecta a más de 700 especies de insectos, descubierto por producir la muscardina blanca en el gusano de seda (Butt et al., 2002).

El género *Beauveria* se caracteriza por sus células conidiógenas de forma globosa a forma de botella, las cuales sostienen los conidios originados en forma simpoidal o acrópeta en un raquis de apariencia en zigzag. El distintivo principal de este género esta en base a la morfología de los conidios, los cuales son de apariencia lisa, hialina, de 1.5 a 5.5 μm y de forma globosa a cilíndrica (Rehner et al., 2011). *B. bassiana* crece con facilidad en medio de cultivo, de apariencia blancuzca produce hifas vegetativas en donde las células conidiógenas forman verticilos densos en forma de botella, de base ancha y extendiéndose en un raquis en forma de zigzag formando esporas asexuales llamadas conidios de apariencia globosa-elipsoidal, lisas y hialinas (Webster y Weber, 2007; Blond, 2012) (Fig. 2).

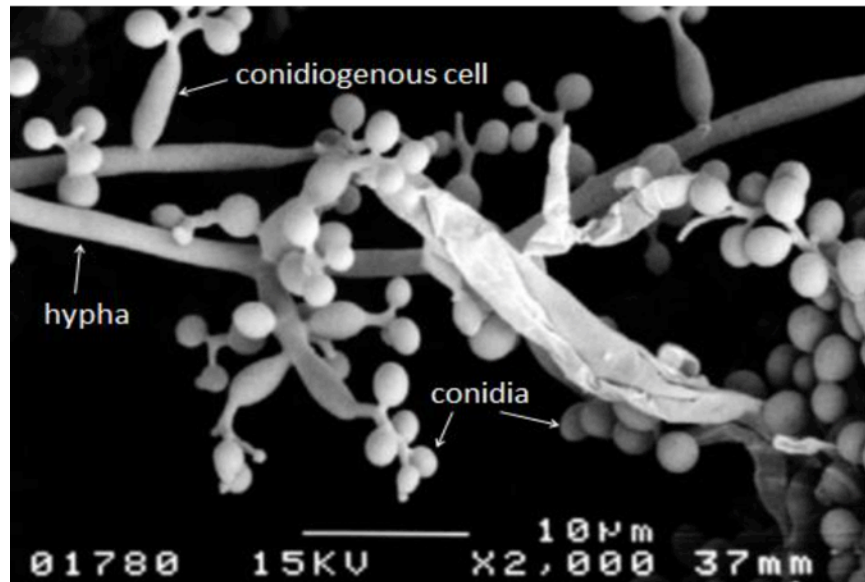


Figura 2. Micrografía de *B. bassiana* mostrando sus estructuras (Blond, 2012).

Clasificación taxonómica de *B. bassiana*

Reino: Fungí

División: Ascomiceta

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Cordycipitaceae

Género: *Beauveria*

Especie: *bassiana*

Metarhizium anisopliae es un hongo imperfecto, cosmopolita que presenta reproducción asexual. Es un hongo filamentoso causante de la enfermedad de la muscardina verde en insectos (Webster y Weber, 2007). En medio de cultivo crece lentamente mostrando columnas verdosas en forma cilíndrica, presenta micelio septado, esporas alargadas y se forman en cadenas originadas en fiálides cilíndricas.

Los conidios pueden ser hialinos o mostrar ligera pigmentación verde oliva produciéndose en cadenas de basipétalos compactados (Bazán, 2002; Acosta, 2006; Archuleta, 2012) (Fig. 3).

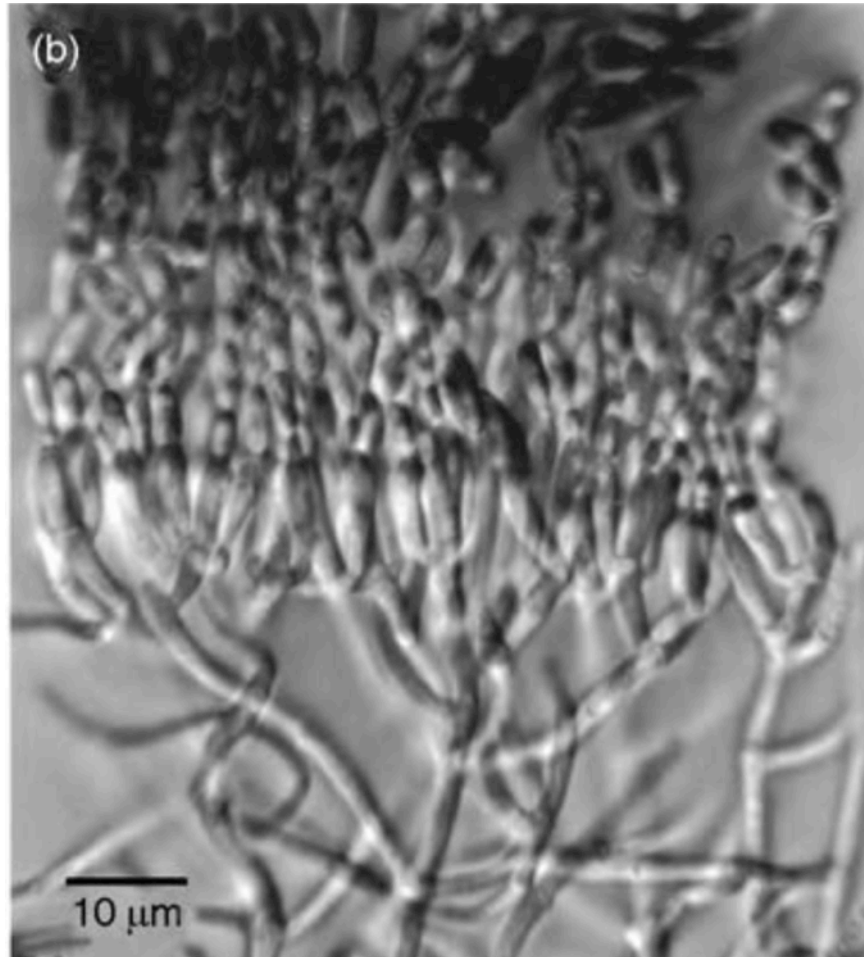


Figura 3. Estructura morfológica de *M. anisopliae* (Webster y Weber, 2007).

Clasificación taxonómica de *M. anisopliae*

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Género: *Metarhizium*

Especie: *anisopliae*

Nemátodos entomopatógenos

Son gusanos pequeños que atacan y matan insectos que viven en hábitats húmedos, específicamente en agua y suelos húmedos; la mayoría son delgados y con una longitud que oscila de 400 a 1200 μm (Woodring y Kaya, 1988). No son dañinos para otros animales o plantas y solo unas pocas especies son reproducidas en masa y vendidas como control de plagas. Buscan insectos, los parasitan y entonces se reproducen, resultando más nemátodos parásitos que mataran más insectos. Aproximadamente 20 familias de nemátodos tienen especies infectivas para los insectos y pueden atacar en la mayoría de los órdenes de insectos, siendo los más comunes hospederos los órdenes Coleoptera (escarabajos), Diptera (moscas, mosquitos, etc), Orthoptera (saltamontes, grillos, etc), Hymenoptera (abejas, avispas, etc) y Lepidoptera (mariposas y polillas). Estos insectos con metamorfosis completa normalmente son parasitados en sus estadios larvales, aunque algunos pueden ser parasitados cuando pupan o cuando son adultos (Mahr et al., 2008).

Aunque los nemátodos son organismos que viven en hábitats húmedos, hay especies terrestres de NE que son capaces de parasitar plagas como gusanos blancos, gorgojos de raíz, gusano del alambre, gusanos cortadores, moscas de los

hongos y gusanos en general. Además hay especies de insectos que se alimentan de plantas que pupan o pasan periodos de dormancia en el suelo, y estos pueden ser parasitados también. Algunos de ellos pueden moverse a través del agua, cuando llueve o con la humedad de las mañanas para depositar huevos o buscar hospederos; sin embargo, generalmente tienen periodos tanto parasíticos como de vida libre, lo que los diferencia de los microorganismos patógenos, pues son capaces de realizar movimientos dirigidos. La mayoría son “viajeros” que activamente buscan a sus hospederos (Mahr et al., 2008).

Algunas familias como *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* cargan en su sistema digestivo bacterias mutualistas que son entomopatógenas y son esenciales para que los nemátodos puedan parasitar de manera exitosa. En su etapa infectiva o parasítica, un juvenil se colocará en el insecto adecuado y se introducirá al mismo por su boca, ano, aperturas respiratorias o por penetración directa de la cutícula; y una vez que el nemátodo se ha introducido libera a la bacteria en simbiosis que porta en su sistema digestivo, la cual es patogénica para el insecto, de manera que esta produce toxinas que matan las células del insecto; la bacteria se multiplica y el insecto muere, normalmente 1 ó 2 días de haber sido parasitado. Los nemátodos se desarrollan hasta su adultez alimentándose de las bacterias y/o del tejido del insecto muerto; posteriormente el adulto deposita huevos dentro del insecto, que posteriormente emergerán, repitiéndose este ciclo unas tres o cuatro generaciones dependiendo del tejido del insecto para alimentarse. Eventualmente nemátodos salen del insecto portando en su sistema a la bacteria en busca de nuevos hospederos. El beneficio de controlar plagas con NE es mayor en áreas de humedad constante y de manera contraria en áreas desérticas; sin embargo, aun en condiciones húmedas, pueden no ser suficientes para abastecer una supresión significativa de plagas (Mahr et al., 2008).

FORMULACIONES DE HONGOS Y NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS

Formulación de NE

Compañías en Europa, Asia y Norte América han producido nemátodos entomopatógenos a gran escala utilizando biorreactores, sin embargo la utilidad de los mismos ha sido limitado debido a la indisponibilidad de formulaciones optimas (Divya et al., 2011), las cuales buscan la finalidad de elaborar productos comerciales a base de estos organismos; dicha producción se elabora a gran escala en cultivos líquidos, práctica que ha reducido los costos de producción y ha aumentado su aplicación en la agricultura (Hussein y Abdel-Aty, 2012).

Una vez producidos estos tienen que colocarse en su forma activa en un agente portador como esponjas artificiales, aserrín, talco, turba, vermiculita, carbón activado, alginato de calcio, harina de trigo, fibra de coco, suspensiones acuosas, gel y recientemente cintas con cadáveres de insectos infectados como potencial aplicación de NE (Grewal et al., 2001; Divya et al., 2011; Hussein y Abdel-Aty, 2012; Rodríguez et al., 2012).

La formulaciones deben desarrollarse en materiales que garanticen la supervivencia de los nemátodos en sus etapas infectivas por un periodo necesario para comercializar el producto, lo cual se ha podido lograr por inmovilización o desecación parcial de juveniles infectivos (JI), formulaciones que han permitido introducir productos a base de NE con una vida de anaquel aceptable (Hussein y Abdel-Aty, 2012).

Sin embargo, hay ciertas consideraciones que se deben tomar en cuenta al momento de elaborar formulaciones a base de NE, entre ellas es que una misma especie puede variar su supervivencia o su infectividad dependiendo del material que lo porte (Miles et al., 2012).

Trabajos previos han demostrado que al evaluar las especies *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema carpocpsae* en Hydrogel, caolinita y alginato de calcio como medios transportadores, encontrando que en la formulación de Hydrogel *H.*

bacteriophora presentó mayor supervivencia por periodo de tiempo (50 días) que *S. carpocapsae* y con una patogenicidad similar, induciendo ambas especies a la mortalidad; en la formulación de caolinita la supervivencia fue deficiente en ambas especies con respecto al tiempo, sin embargo la mortalidad inducida fue la más elevada en ambas especies respecto a los otros dos métodos; por último, en alginato de calcio la especie con mayor supervivencia fue *S. carpocapsae*, siendo esta misma especie la que causó mayor mortalidad (Hussein y Abdel-Aty, 2012). Otros trabajos han mostrado resultados similares empleando nemátodos de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* (Divya et al., 2011; Grenwal et al., 2012).

Una formulación en gránulos o pellets se ha desarrollado con la finalidad de favorecer tanto la supervivencia como la patogenicidad de los NE y a la vez presentar un nivel de agregación y compactación tal que la disolución del pellet suceda al tener contacto con la humedad. Esto es, gránulos capaces de disolverse en agua (Mendoza, 2012)

Formulación de HE

Los hongos empleados para el biocontrol de plagas agrícolas, una vez producidos a gran o pequeña escala, deben también formularse en medios que los vuelvan una herramienta apropiada para el control biológico, siendo capaces de portarlos y proporcionarles un grado de viabilidad tal, que puedan emplearse en campo (Pavone, et al., 2009). Algunas formulaciones se han elaborado a base de aceites de origen vegetal y mineral, correspondiente a algunas de las formulaciones líquidas; así como formulaciones sólidas elaboradas con polvos, gránulos de micelio seco y de germen desgrasado de maíz (Pereira et al., 1990; Pavone et al., 2009; Agarwal et al., 2012; Seye et al., 2012).

Sin embargo, la falta de formulaciones capaces de proporcionar una viabilidad y eficiencia completa es un problema actual en lo que a HE se refiere, pues en este ámbito se han desarrollado fuertes avances en las formulaciones para bacterias como *Bacillus thuringiensis* (BT) y patógenos virales, por lo que la importancia del desarrollo de nuevas tecnologías y formulaciones capaces de proporcionar la

confiabilidad y eficiencia de empleo a los HE en campo es una realidad necesaria (Pereira et al., 1990).

MICROENCAPSULACIÓN POR SECADO POR ASPERSIÓN

La encapsulación o microencapsulación (para sustancias de bajo peso molecular) es el proceso de introducir sustancias bioactivas en una matriz con la finalidad de evitar su degradación y mejorar la actividad biológica de agentes de control biológicos. En el caso de microencapsulación de hongos, la sustancia bioactiva o el inóculo puede componerse de micelio, esporas y/o blastosporas, el cual es resguardado dentro de una matriz o sistema pared compuesta por una mezcla de adyuvantes, fagoestimulantes y adherentes con el fin de proporcionar selectividad, biodegradabilidad y capacidad de dirigirse a un rango estrecho de insectos blanco (Yañez et al., 2005; Jin y Custis, 2011).

La microencapsulación consiste generalmente en mezclar al inóculo con la matriz, donde esta es agregada posteriormente a un medio de dispersión, para esto se debe de realizar una agitación constante con el fin de emulsificar. Posteriormente, la emulsificación es depositada en una solución agua-sal, formando así una solución de líquidos inmiscibles. La mezcla se deja reposar durante unos minutos para permitir que los glóbulos conteniendo el inóculo sedimenten hacia el fluido inferior el cual lo rodeará formando una capa encapsulante.

El secado por aspersion (Fig. 4), es una técnica que permite tratar productos (algunos de ellos sensibles) a altas temperaturas con un mínimo de deterioro en las propiedades del producto secado, por lo que es ampliamente usado para obtener productos microencapsulados y para el secado de microorganismos (Fernández et al., 2001).

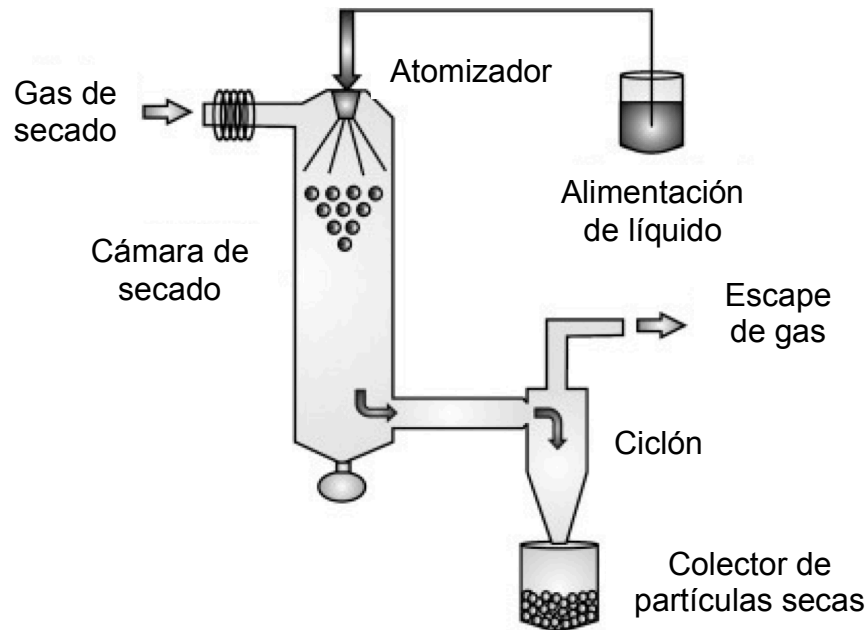


Figura 4. Esquema general del secado por aspersión.

PRODUCCION DE PELLETS

Los pellets, son sustancias acarreadoras que técnicamente construyen un ambiente artificial adecuado para la supervivencia de nemátodos hasta su aplicación (Mendoza, 2012). Actualmente, las investigaciones se enfocan en el prolongamiento de la vida de anaquel de agentes de control biológico, así como su tolerancia a la transportación, la aplicación en campo y la mejora de su efectividad contra los organismos objetivo. La encapsulación en pellets, es una técnica prometedora, dada la estructura del formulado se facilita el almacenamiento y la transportación, y se logran mejoras en términos de supervivencia y viabilidad de nemátodos, ya que proporciona condiciones de inmovilidad, reducción de metabolismo, protección de rayos UV y desecación gradual con el fin de reducir el consumo de energía, además de buscar un nivel de agregación y compactación adecuado y que facilite la disolución oportuna al humedecerse. Los materiales y el procedimiento de elaboración del pellet son factores importantes a considerar porque de ello dependerá que se cree un micro-reservorio óptimo para el encapsulamiento del organismo. Las condiciones adecuadas recaerán en inducir un estado de

quiescencia (reducción de actividad metabólica) sobre el organismo, lo que puede prolongar la vida y mantener la infectividad hasta la aplicación del agente de control. El encapsulante más comúnmente empleado ha sido el alginato de calcio, sin embargo, otros ingredientes como bentonita, trigo glutinado, barro, almidón, entre otros han sido empleados como agentes encapsulantes para la formulación de los pellets (García, 2006; Girón, 2008; Hussein y Abdel-Aty, 2012; Matadamas et al., 2014; Mendoza, 2012).

CAPITULO II:

**Artículo publicado en el Número 1, Volumen 43 de la revista Southwestern
Entomologist.**

Evaluación de la Virulencia de *Steinernema riobrave* y *Rhabditis blumi* contra Larvas del Tercer Instar de *Spodoptera frugiperda*¹

Evaluation of the Virulence of *Steinernema riobrave* and *Rhabditis blumi* against Third Instar Larvae of *Spodoptera frugiperda*¹

Héctor Alejandro Leyva-Hernández^{2*}, Cipriano García-Gutiérrez^{2*}, Jaime Ruíz-Vega³, Carlos L. Calderón-Vázquez², Antonio Luna-González², y Sergio García-Salas⁴

Resumen. Se evaluó la virulencia de los nematodos *Steinernema riobrave* (Poinar y Raulston, 1994) y la de un aislamiento nativo de *Rhabditis blumi* (Sudhaus, 1974) contra gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Ambos nematodos fueron usados para inocular larvas del tercer instar de desarrollo concentraciones de 100, 250, y 500 juveniles infectivos (JI) por larva y determinar la mortalidad de las larvas cada 24 h durante 7 días. El nematodo *S. riobrave* causó 90% de mortalidad a 500 JI, 96 h después de la inoculación, mientras que con la especie *R. blumi* no hubo mortalidad de larvas a las concentraciones y tiempo de evaluación. El nematodo *S. riobrave* tuvo alta virulencia, por lo que esta especie se consideran viable para usarse en una prueba de efectividad para el control de *S. frugiperda* en campo.

¹Lepidoptera: Noctuidae

²Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa, Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes 250, Col. San Joaquín Guasave, Sinaloa, México.

³Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca IPN, Hornos No. 1003, Col. Noche Buena, Municipio de Santa Cruz Xoxocotlán C.P. 71230. Oaxaca, México.

⁴Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología IPN, D.R. Instituto Politécnico Nacional (IPN), Av. Luis Enrique Erro S/N, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, C.P. 07738, Ciudad de México, México.

*Autor para correspondencia: g arciaciprian@hotmail.com

Abstract. The virulence of the nematode *Steinernema riobrave* (Poinar and Raulston, 1994) and the native nematode *Rhabditis blumi* (Sudhaus, 1974), was evaluated against the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith). Both nematodes were used to inoculate third instar larvae of fall armyworm at 100, 250, and 500 infective juveniles (IJ) concentrations per larvae, to determine mortality every 24 hours for 7 days. The nematode *S. riobrave* produced 90% mortality at 500 IJ after 96 to 168 h post inoculation ($p < 0.05$), whereas *R. blumi* caused no mortality to larvae when inoculated at the same concentrations and evaluation times. *Steinernema riobrave* showed high virulence to the fall armyworm; therefore, this species was considered as a suitable pathogen to be used in efficacy tests in the field to control *S. frugiperda*.

Introducción

En el Estado de Sinaloa, México, se producen más de 6 millones de toneladas de maíz *Zea mays* (Linneo, 1753) en una superficie que supera las 600,000 ha (SIAP 2016), las cuales cada año son afectadas por el ataque del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith), causando daños importantes al cultivo y bajando rendimientos en la cosecha. Los daños que causa esta plaga cuando se tiene un umbral económico de 5% de infestación de larvas en campo, han conducido al uso intensivo de pesticidas para su control, realizando de dos a tres aplicaciones de distintos ingredientes activos de amplio espectro por ciclo de cultivo (Blanco et al., 2014).

Dentro de los métodos de control biológico, los nematodos entomopatógenos (NE) han sido utilizados para controlar insectos plaga de los órdenes Coleoptera, Diptera, Orthoptera, Hymenoptera y Lepidoptera (Mahr et al., 2008, Shapiro y Mizell 2012). En particular, el nematodo *S. riobrave* (Poinar y Raulston, 1994) ha sido evaluado para el control de diversas especies de insectos plaga, incluyendo a *S. frugiperda* (Caccia et al., 2014). En el laboratorio este nematodo ha mostrado ser efectivo contra larvas del cuarto al quinto instar causando mortalidades del 45, 60, y 65% a dosis de 100, 250, y 500 JI, durante 4 días de exposición (Andaló et al., 2010). Molina et al., (1996) usaron larvas jóvenes del segundo instar a 100 JI/mL de *S.*

riobrave, obteniendo 63.9, 75.4, 77.3, y 77.4% de mortalidad a las 48, 72, 96, y 120 h, sugiriendo por esto su uso como bioinsecticida.

Rhabditis blumi (Sudhaus, 1974) ha demostrado ser efectivo contra lepidópteros, particularmente fue evaluado sobre *Artogeia rapae* (Linneo, 1758), *Mamestra brassicae* (Linneo, 1758), y *Plutella xylostella* (Linneo, 1758), observando mortalidad de larvas de 78 al 94%, encontrando además que *P. xylostella* resultó mas susceptible a este nematodo (Park et al., 2012). El uso de estos nematodos para el control de *S. frugiperda* en cultivo de maíz en Sinaloa no se conoce, por lo que es importante determinar qué instar es susceptible a la infección y su grado de virulencia contra el insecto.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar en el laboratorio la virulencia de *S. riobrave* y la de un aislamiento nativo de *R. blumi* proveniente de un suelo cultivado con maíz, sobre larvas del tercer instar de *S. frugiperda*.

Materiales y Métodos

Identificación Morfológica del Aislamiento Nativo. *Rhabditis blumi* fue aislado de suelos cultivados con maíz en Guasave, Sinaloa, empleando a *Galleria mellonella* (Linneo, 1758) como carnada (Woodring y Kaya 1988). También se analizaron las características morfométricas de esta especie usando las claves taxonómicas de Pereira (2008). Las fotografías de las estructuras morfológicas clave del nematodo fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia (Leica DM6000CS) en aumentos de 10 y 40X.

Identificación Molecular del Aislamiento Nativo. Se empleó la técnica de PCR para la identificación molecular del nematodo nativo. Para la extracción de ADN se usó el kit DNA_{ZOL}® (Reagent LIFE TECHNOLOGIES™ Carlsbad, CA; para realizar la amplificación del segmento D2-D3 de la subunidad grande (LSU) del gen 28S de ADN ribosomal se usaron los oligonucleotidos D2A y D3b (De Ley et al., 2005). Los productos de PCR se purificaron empleando el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Promega, Madison, WI. Los productos purificados

fueron secuenciados y comparados con la base de datos del GeneBank.

Se emplearon larvas de *S. frugiperda* del tercer instar debido a esta etapa de desarrollo se encuentran en el cogollo de la planta (Ortega, 1987) y son más susceptibles a patógenos que larvas de etapas más avanzadas (Yu, 1982). Además son más fáciles de manipular que larvas de primer o segundo instar. Por esta razón, suponíamos que en este instar la larva es más evidente y puede albergar a una mayor cantidad de nematodos, que a la vez pueden servir como nuevo inóculo infeccioso en la población del insecto. Las larvas se obtuvieron de una colonia que se mantuvo en el laboratorio a 80% de HR, 27-28°C, y 16 HL hasta la generación F₅. Las larvas fueron alimentadas con dieta artificial a base de maíz, trigo, levadura de cerveza, vitaminas, ácido ascórbico, ácido sórbico, y metil paraben como nutrientes, factores de crecimiento y conservadores (Murúa et al., 2003).

Nematodos Entomopatógenos. Se evaluaron los nematodos *Rhabditis blumi* (Rb) y *Steinernema riobrave* (Sr) (de la colección de nematodos del CIIDIR Oaxaca). Estas especies fueron reproducidas *in vivo* usando larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) del último instar, las cuales fueron mantenidas de forma axénica para este fin. Los nematodos fueron colectados empleando trampas White (White, 1927) la cual consistió en colocar larvas infectadas sobre papel filtro en el interior de una tapa de caja Petri de 60 x 15 mm, después a ésta se introdujo otra caja de 90 x 15 mm con papel filtro y agua destilada estéril en donde los nematodos migraron una vez que emergieron de los cadáveres de *G. mellonella*. Los nematodos se usaron al tercer día de haber emergido, utilizando de esta manera únicamente a los juveniles infectivos (JI).

Ensayo de Virulencia. Se individualizaron larvas de *S. frugiperda* en cajas Petri (60 x 15 mm). Se realizaron 7 tratamientos: *Steinernema riobrave* y *Rhabditis blumi* a 100, 250, y 500 JI, y como control 1 mL de agua destilada estéril. Los JI de cada especie fueron suspendidos en 1 mL de agua destilada estéril y después se pasaron a un círculo de papel filtro de 5.5 cm de diámetro (Whatman No.1) puesto en el fondo de la caja Petri, previo a la colocación de las larvas (Molina et al., 1996, Andaló et al., 2010, Caccia et al., 2014). Una vez inoculadas las larvas, se colocó

una larva/caja con papel filtro y después las cajas fueron selladas con film plástico para evitar su salida. Cada caja fue una unidad experimental, 10 cajas por tratamiento y tres repeticiones, las que se incubaron a $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 7 días. La mortalidad de las larvas fue registrada cada 24 h.

Los insectos muertos se conservaron en sus respectivas unidades experimentales para favorecer el desarrollo de los nematodos y después se usó un estereoscopio a 40X para observar el grado de la infección. Los datos de insectos muertos por tratamiento fueron analizados mediante el programa estadístico SAS System v 9.0 (Ruelas et al., 2013). También se realizó una transformación de datos Arcoseno, con la finalidad de que los datos tuvieran una distribución normal. Después se hizo una comparación de medias de la mortalidad de larvas (Tukey $\alpha = 0.05$).

Resultados y Discusión

Identificación Morfológica de *R. blumi*. El nematodo aislado fue identificado con base en su morfología: los nematodos machos presentaron una longitud media de 1.09 mm y el esófago de 189 μm de largo (Fig. 5A) con una espícula en la parte posterior (Fig. 5B). Las hembras son de longitud media de 1.17 mm y el esófago mide 243 μm , con una vulva en el centro del cuerpo (Fig. 5C). Además se observó que son ovíparas y con endotoquia matricida, es decir que los huevos eclosionan dentro de la hembra y se alimentan de las bacterias que se encuentran en el intestino (Fig. 6). Estas características morfológicas y la endotoquia indicaron que se trata del género *Rhabditis* (Carta y Osbrink 2005).

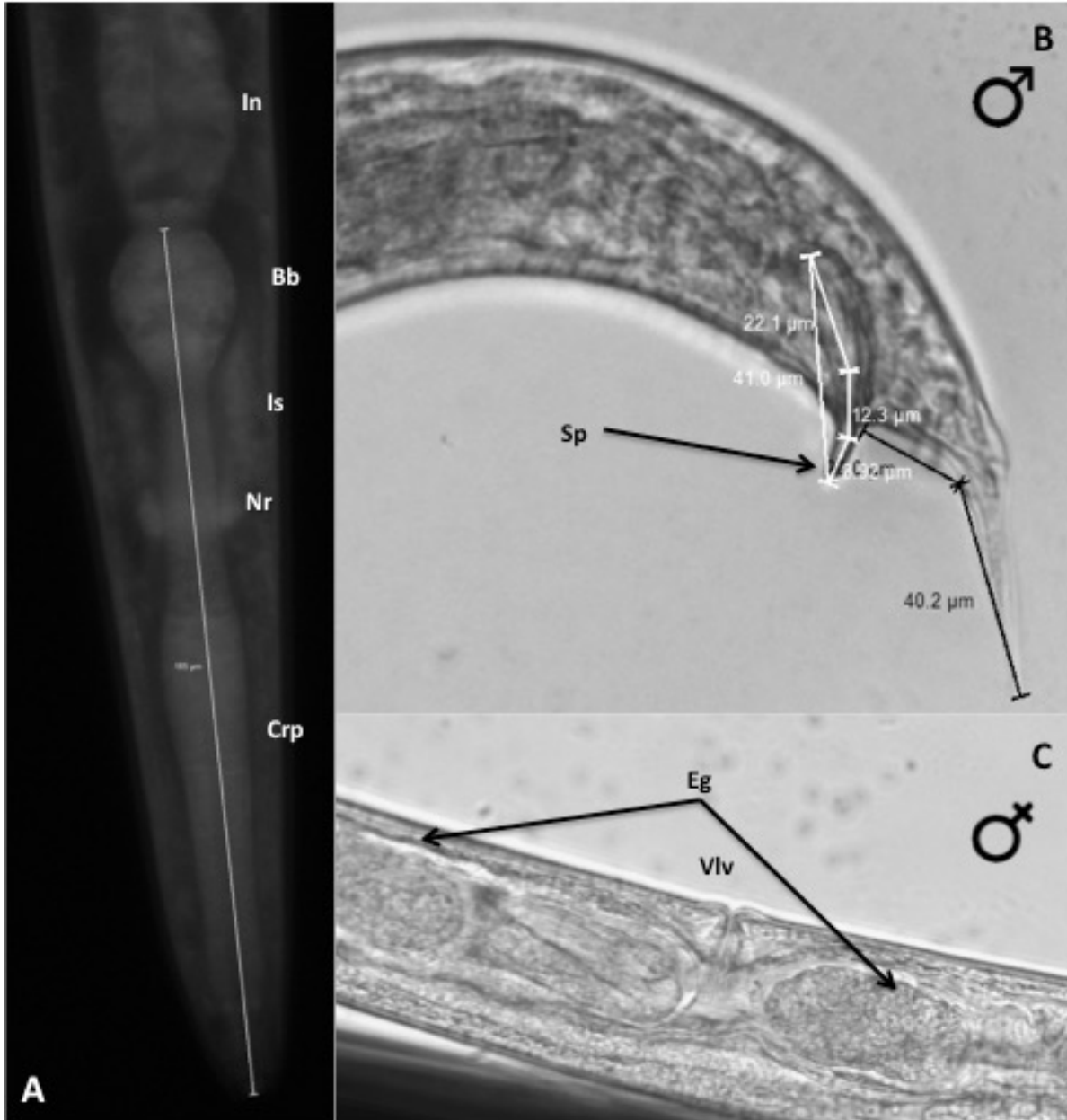


Fig. 5. Morfología de *Rhabditis blumi*: A, parte anterior; B, parte posterior de macho y C, parte media de hembra. In, intestino; Bb, bulbo; Is, Istmo; Nr, anillo nervioso; Crp, corpus; Sp, espícula; Eg, huevo; Vlv, vulva.

Fig. 5. Morphology of *Rhabditis blumi*: A, anterior part; B, posterior part of male and C, middle part of female. In, intestine; Bb, bulb; Is, isthmus; Nr, nerve ring; Crp, corpus; Sp, spicula; Eg, egg; Vlv, vulva.

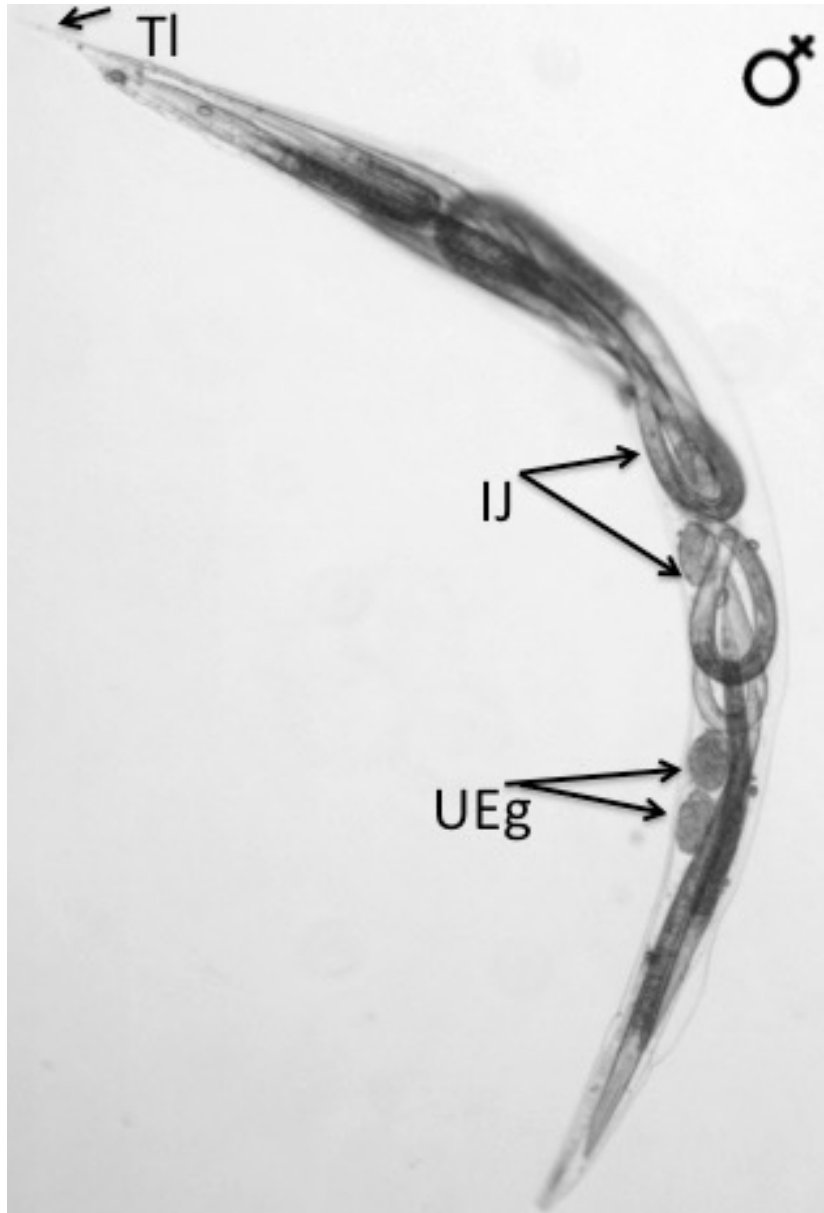


Fig. 6. Hembra de *Rhabditis blumi*. Fenómeno de endotoquia matricida. TI, cola; IJ, juveniles infectivos; UEg, huevos no eclosionados.

Fig. 6. *Rhabditis blumi* female. Phenomenon of endotokia matricida. TI, tail; IJ, infective juvenile; UEg, unhatched eggs.

Identificación Molecular de *R. blumi*. En la caracterización molecular se obtuvieron productos de PCR de aproximadamente 600 pb (Fig. 7), los que se purificaron y secuenciaron. La secuencia obtenida se comparó con la base de datos del GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), teniendo como resultado

83% de identidad con el nematodo *Rhabditis blumi* (número de accesión EU195965.1). Una muestra de estos nematodos se encuentran fijados en formol al 10% en la colección del laboratorio de bioinsecticidas del CIIDIR Sinaloa.

Ensayo de Virulencia. En la Fig. 8 se puede observar el cadáver de una larva de tercer ínstar de *S. frugiperda* infectada totalmente por juveniles de *S. riobrave* después de 168 h de la infección.

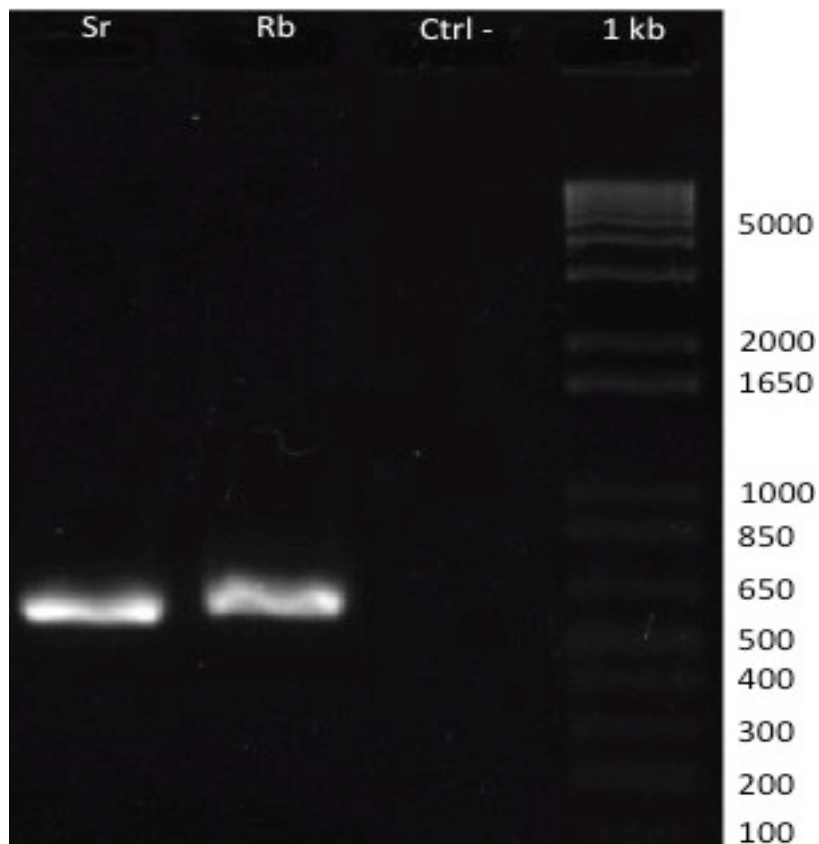


Fig. 7. Gel de agarosa al 1%. Electroforesis de productos de PCR de aprox. 600 pb de nematodos entomopatógenos. Carriles: Sr, *Steinernema riobrave* como control positivo; Rb: Aislado del nematodo *Rhabditis blumi*; Ctrl-: control negativo; 1kb: marcador de peso molecular.

Fig. 7. Agarose gel at 1 %. PCR products electrophoresis of approximately 600 bp of entomopathogenic nematodes. Lanes: Sr, *Steinernema riobrave* as positive control; Rb: Isolated of *Rhabditis blumi* nematode; Ctrl-: negative control; 1kb: molecular weight marker.

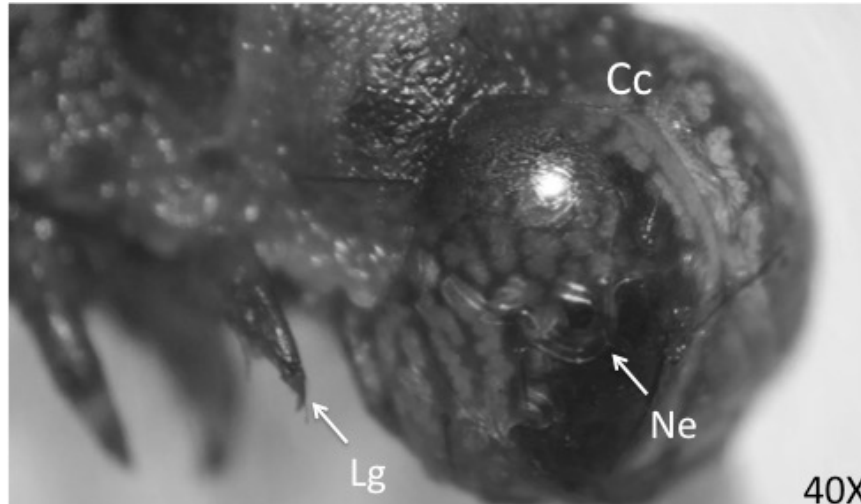


Fig. 8. Cabeza (Cc) de una larva de *Spodoptera frugiperda* infectada con JI de *Steinernema riobrave*. Ne, Nematodo entomopatógeno; Lg, Pata.

Fig. 8. Head (Cc) of *Spodoptera frugiperda* larvae infected with the nematode *Steinernema riobrave*. Ne, Entomopathogenic nematode; Lg, Leg.

La Fig. 9 muestra el porcentaje de la mortalidad de larvas del tercer instar de *S. frugiperda* causada por *S. riobrave*, *R. blumi*, y el control, a las 48, 96, y 168 h después de la inoculación. En la Fig. 9 se observa que la mayor virulencia fue en Sr500, con mortalidad de larvas de 90% a las 96 h después de la inoculación. A partir de este tiempo hubo diferencias de mortalidad entre Sr100, Sr250, y Sr500. La concentración 100 JI/mL causó una mortalidad inferior (37%) a las 48 h. Sr250 tuvo mortalidad de larvas de 61% a las 96 h, mientras que en *R. blumi*, al igual que en el tratamiento control, no se observó mortalidad de larvas a ninguna dosis en el tiempo de evaluación.

La virulencia de *S. riobrave* sobre larvas de *S. frugiperda* en condiciones de laboratorio ya había sido demostrada por Molina et al., (1996), mortalidad máxima de 79% a las 120 h a 100 JI/mL, la cual fue menor a la causada por el tratamiento Sr500 a las 96 h en este estudio. Esta diferencia se puede deber a la etapa de desarrollo de los insectos de prueba, ya que ellos emplearon larvas de segundo instar, las cuales se consideran más susceptibles (Fuxa et al., 1998).

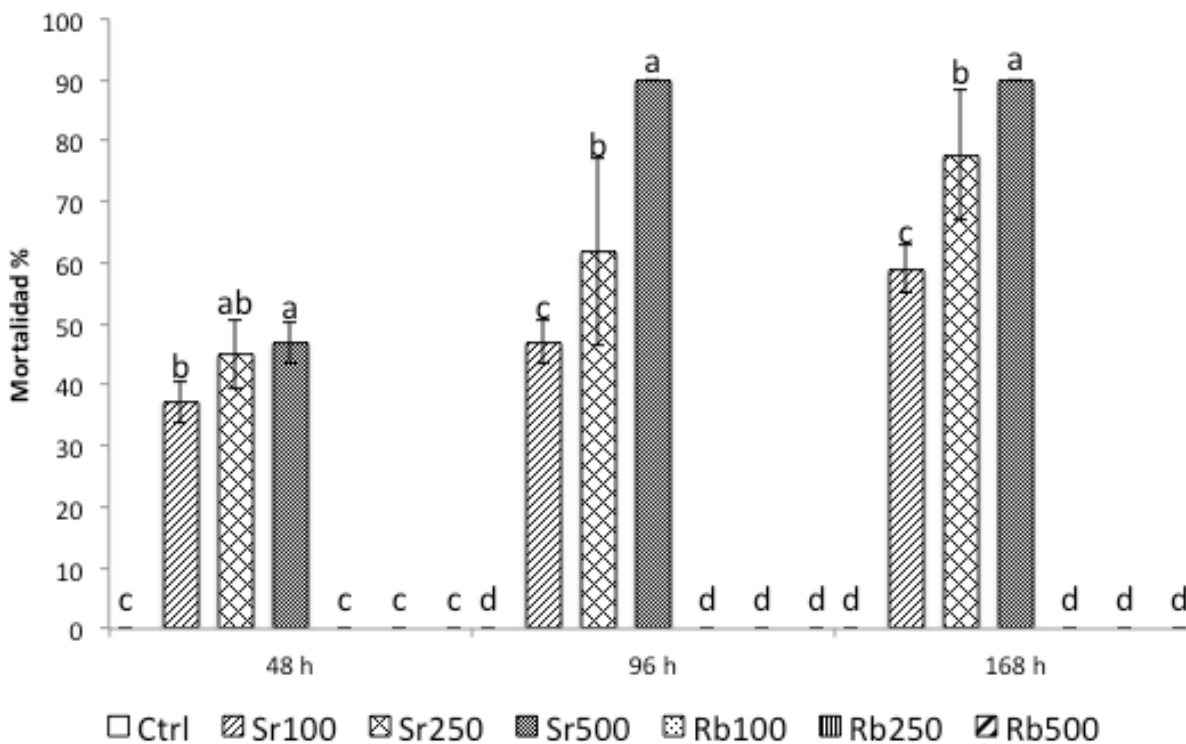


Fig. 9. Porcentaje de mortalidad de *Spodoptera frugiperda* a las 48, 96, y 168 h después de la inoculación con NE y agua como control. Barras con diferente letra indican diferencia estadística ($P = 0.05$).

Fig. 9. Percentage of *Spodoptera frugiperda* mortality at 48, 96, and 168 hours post inoculation to treatments with NE and water as control. Bars with a different letter are significantly different ($P = 0.05$).

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar estudios de Doctorado. Al Dr. Carlos Ligne Calderón Vázquez por proporcionar su apoyo y el equipo del laboratorio de Genómica Funcional para la realización de la parte molecular de este proyecto. A la M.C. Elva Lorena Vázquez Montoya por su ayuda y apoyo en la caracterización morfológica de los nematodos.

Este estudio fue financiado económicamente con los proyectos SIP-IPN claves: 20160476 y 20170101. Estudio del modo de acción de formulaciones de hongos y nematodos entomopatógenos en insectos plaga de importancia agrícola en

Sinaloa y Evaluación de la efectividad, persistencia, residualidad, y seguridad de formulaciones de hongos y nematodos para el control de plagas agrícolas.

Referencias Citadas

- Andaló, V., V. Santos, M. G. Furtado, M. C. Costa, and J. A. Moino. 2010. Evaluation of entomopathogenic nematodes under laboratory and greenhouses conditions for the control of *Spodoptera frugiperda*. *Cienc. Rural*. 40: 1860-1866.
- Blanco, C. A., G. Pellegaud, U. Nava-Camberos, D. Lugo-Barrera, P. Vega-Aquino, J. Coello, A. P. Teran-Vargas, and J. Vargas-Camplis. 2014. Maize pest in Mexico and challenges for the adoption of integrated pest management programs. *J. Integ. Pest Mngmt.* 5: 1-9.
- Caccia, M. G., E. Del Valle, M. E. Doucet, and P. Lax. 2014. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* and *Helicoverpa gelotopoeon* (Lepidoptera: Noctuidae) to the entomopathogenic nematode *Steinernema diaprepesi* (Rhabditida: Steinernematidae) under laboratory conditions. *Chilean J. Agric. Res.* 74: 123-126.
- Carta, K. L., and W. Osbrink. 2005. *Rhabditis rainai* n. sp. (Nematoda: Rhabditida) associated with the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Nematology* 7: 861-879.
- De Ley, P., D. L. Tandingan, K. Morris, E. Abebe, O. M. Mundo, M. Yoder, J. Heras, D. Waumann, O. A. Rocha, A. H. Jay Burr, J. G. Baldwin, and T. Kelley. 2005. An integrated approach to and informative morphological vouchering of nematodes for applications in molecular barcoding. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360: 1945-1958.
- Fuxa, J. R., A. R. Richter, and F. A. Silva. 1998. Effect of host age and nematode strain on susceptibility of *Spodoptera frugiperda* to *Steinernema feltiae*. *J. Nematol.* 20: 91-95.
- Mahr, D. L., P. Whitaker, and N. M. Ridgway. 2008. Biological control of insects and mites: an introduction to beneficial natural enemies and their use in pest management. Cooperative Extension Publishing. University of Wisconsin Extension. Madison, WI.

- Molina, O. J., J. J. Hamm, G. R. Lezama, J. L. F. Bojalil, V. M. Arenas, and R. M. Gonzalez. 1996. Virulence of six entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) on immature stages of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Vedalia* 3: 25-29.
- Murúa, M., E. G. Virla, y V. Defago. 2003. Evaluación de cuatro dietas artificiales para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides. *Bol. San. Veg. Plagas* 29: 43-51.
- Ortega, C. A. 1987. *Insect Pests of Maize: A Guide for Field Identification*. CIMMYT, Mexico, D. F.
- Park, H. W., H. H. Kim, S. H. Youn, T. S. Shin, A. L. Bilgrami, M. R. Cho, and C. S. Shin. 2012. Biological control potentials of insect-parasitic nematode *Rhabditis blumi* (Nematoda: Rhabditida) for major cruciferous vegetable insect pests. *Appl. Entomol. Zool.* 47: 389-397.
- Pereira, T. J. 2008. Evaluación morfológica y molecular de la diversidad de nematodos marinos de vida libre (Enoplida) en las costas de Baja California. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/1520>.
- Ruelas-Ayala, R. D., C. García-Cipriano, y A. Arshuleta-Torres. 2013. Selección de aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* tolerantes a altas temperaturas para el control de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Southwest. Entomol.* 38: 313-323.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2016. Anuario estadístico de la producción agrícola. http://nube.siap.gob.mx/cierre_agricola/ (Consulta 17 Noviembre 2017).
- Shapiro, D. I., and R. F. Mizell III. 2012. Laboratory virulence of entomopathogenic nematodes to two ornamental plant pests, *Corythucha ciliata* (Hemiptera:Tingidae)

and *Stethobaris nemesis* (Coleoptera: Curculionidae). Fla. Entomol. 95: 922-927.

White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. Science 66: 302-303.

Woodring, J. L., and H. K. Kaya. 1988. Steinernemaid and Heterorhabditid Nematodes: A Handbook of Techniques. Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, AK.

Yu, S. J. 1983. Age variation insecticide susceptibility and detoxification capacity of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. J. Econ. Entomol. 76: 219-222.



25 Ene 18

Estimado Dr. García-Gutiérrez : Me es grato comunicarle que su manuscrito # SWE#2836, Evaluación de la Virulencia de *Steinernema riobrave* y *Rhabditis blumi* contra Larvas del Tercer Instar de *Spodoptera frugiperda*, de los autores Héctor Alejandro Leyva-Hernández, Cipriano García-Gutiérrez, Jaime Ruíz-Vega, Carlos L Calderón-Vázquez, Antonio Luna-González y Sergio García-Salas. Ha sido aceptado para publicarse en la revista *Southwestern Entomologist*.

Sin más por el momento reciba un afectuoso saludo y le agradecemos su interés en publicar su interesante trabajo en nuestra revista.

Atentamente,

Carlos A. Blanco

Carlos A. Blanco, Editor Asociado

Carlos.a.blanco@aphis.usda.gov

Cc Dr. Bonnie Pendleton, Editor- in-Chief.

CAPITULO III:

Artículo sometido a la Revista Chilena de Entomología

Evaluación de la virulencia y efecto de antagonismo o sinergismo de *Steinernema riobrave* (POINAR Y RAULSTON) y *Metarhizium anisopliae* (METSCHN.) SOROKIN sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH)

Evaluation of the virulence and antagonism or synergism effect of *Steinernema riobrave* (POINAR Y RAULSTON) and *Metarhizium anisopliae* (METSCHN.) SOROKIN on larvae of *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH)

Héctor Alejandro Leyva-Hernández¹, Cipriano García-Gutiérrez¹, Jaime Ruiz-Vega², Antonio Luna-González¹, Carlos Ligne Calderón-Vázquez¹, Sergio García-Salas³.

ABSTRACT

The virulence of the entomopathogenic nematode *Steinernema riobrave* (Poinar and Raulston, 1994) was evaluated in conjunction with the pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin, 1883 on third instar larvae of fall armyworm FAW *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797). Also, individual and combined trials were carried out to determine possible antagonism or synergism effect between these entomopathogenic organisms on this pest insect. Bioassays were realized using nematodes or fungi only at dose of 250 IJ/mL and *M. anisopliae* at a dose 1×10^8 spores mL⁻¹, and in another trial both entomopathogenics agents at the same dosages were used. Nematodes and fungus were simultaneously applied spraying a volume of 1 of each one control agents on larvae contained in a petri dish. The virulence and pathogenic parameters evaluated were percentage of larvae mortality (LM) and correspondent lethal time (LT) every 24 h during 7 days. We found that the fungus did not cause significant larvae mortality at 72 h, but it caused 13% of LM at 96 h after treatment application, while the nematode alone produced 80% of LM at 48 h post-application. In the combination fungus and nematode, 100% of LM was observed at 72 h post-application. These values were similar to the obtained with *S. riobrave* when it was applied alone. These results showed that the main mortality cause to third-instar *S. frugiperda* larvae was the nematode virulence, so that the antagonism effect between nematode and fungi was observed only for the nematode. However, was not possible determine any other synergism effect.

Key words: *Metarhizium anisopliae*, pathogenicity, *Steinernema riobrave*, virulence.

RESUMEN

Se evaluó la virulencia del nemátodo entomopatógeno *Steinernema riobrave* (Poinar y Raulston, 1994) en conjunto con el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin, 1883 para el control de larvas del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797). Se realizaron pruebas individuales y combinadas para determinar el posible sinergismo o antagonismo entre organismos entomopatógenos sobre larvas de tercer ínstar. El primer bioensayo se realizó con el nematodo a dosis de 250 JI/mL, y el segundo con el hongo a dosis de 1×10^8 esporas mL^{-1} , y el tercero con la combinación de ambos entomopatógenos a las mismas dosis. Nemátodos y hongos fueron aplicados simultáneamente asperjando 1 mL de cada uno de estos agentes de control sobre larvas contenidas dentro de cajas de Petri. La virulencia y patogenicidad fueron evaluadas mediante los parámetros de mortalidad de larvas (ML) y tiempo letal (TL) correspondiente cada 24 h, durante 7 días después de la aplicación. El hongo solo, causó una ML no significativa del 13% a las 96 h después de aplicación, mientras que el nemátodo solo, causó una ML del 80% y un TL de 48 h. El tratamiento con los dos entomopatógenos alcanzó una ML de 100% un TL de 72 h. Estos resultados mostraron que la principal causa de mortalidad de larvas de tercer ínstar fue la virulencia del nemátodo, es por esto que el efecto de antagonismo entre nemátodo y hongo fue observado solo en el nemátodo. Sin embargo, no fue posible determinar algún otro efecto de sinergismo.

Palabras clave: *Metarhizium anisopliae*, patogenicidad, *Steinernema riobrave*, virulencia.

¹Instituto Politécnico Nacional-COFAA. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa, Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes 250, Col. San Joaquín Guasave, Sinaloa, México. Autor para correspondencia: garciaciprian@hotmail.com

²Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca IPN, Hornos No. 1003, Col. Noche Buena, Municipio de Santa Cruz Xoxocotlán C.P. 71230. Oaxaca, México.

³Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología IPN, D.R. Instituto Politécnico Nacional (IPN), Av. Luis Enrique Erro S/N, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, C.P. 07738, Ciudad de México, México.

Introducción

Los insectos plaga han sido un problema fitosanitario constante en la producción de alimentos, y se han tratado de controlar mediante la aplicación de agentes químicos sintéticos (Mahr et al., 2008). Sin embargo, la utilización de estos agentes xenobióticos, ha generado un fenómeno de resistencia en algunos insectos (León-García et al., 2012), lo que ha ocasionado que la presencia y sobrepoblación de insectos plaga sea cada vez más común en los campos de cultivo. En consecuencia, se han tenido que desarrollar moléculas más agresivas, aumentando las dosis y la frecuencia de aplicación de estos insecticidas químicos. Una alternativa a este problema es la utilización de agentes de control biológico como los hongos y nemátodos entomopatógenos, los cuales han demostrado tener un alto potencial para utilizarse como bioinsecticidas debido a su modo de acción (Nava-Perez et al., 2012). Además, estos organismos son selectivos y en algunas ocasiones específicos contra insectos plaga sobre diferentes hospederos y etapa de desarrollo.

El hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin, conocido por causar la enfermedad llamada muscardina verde ha destacado como un eficaz agente de control debido a su amplio rango de hospederos y su distribución (Tanada y Kaya, 1993). La aplicación individual de *M. anisopliae* en larvas del primer instar de *S. frugiperda* (J.E. Smith) causó 93% de mortalidad, en 72 h (García et al., 2011). En el caso de los nemátodos entomopatógenos, la especie *Steinernema riobrave* (Poinar y Raulston) ha confirmado su capacidad infectiva, destacando como un agente de control de alta virulencia contra larvas del tercer instar de desarrollo de *S. frugiperda* (Leyva-Hernández et al., 2018).

El uso combinado de hongos y nemátodos entomopatógenos para el control de plagas puede ser una alternativa prometedora, ya que estos podrían tener algún efecto sinérgico. Considerando que los entomopatógenos son selectivos y en algunas ocasiones específicos, es de interés buscar sinergia entre hongos y nemátodos, tal como Ruiz-Vega et al. (2017), quienes reportaron que la aplicación individual del nemátodo *Steinernema glaseri* (Steiner) tuvo un porcentaje de control de larvas de *Tenebrio molitor* (Linneo) estadísticamente igual al obtenido en la combinación hongo-nemátodo con los hongos *M. anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, lo que sugiere que el nemátodo no requiere de la participación de otro agente de control para causar un alto porcentaje de mortalidad. Por otro lado, Lezama et al. (1996) encontraron que la mortalidad causada por el nemátodo *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) fue igual al tratamiento donde se combinaron *H. bacteriophora* y *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, sugiriendo que puede haber un efecto antagonista del nemátodo sobre el hongo, lo que indica que *H. bacteriophora* puede interferir con la infección por el hongo *N. rileyi* en larvas neonatas de *S. frugiperda*. Así mismo, Molina et al. (2007) y Tarasco et al. (2011) también sugieren que ocurre un efecto antagonista de parte del nemátodo sobre el hongo cuando se lleva a cabo una aplicación simultánea de ambos entomopatógenos, ya que el nemátodo se introduce al insecto durante las primeras 24 h, liberando a la bacteria simbiote en este tiempo, mientras que el hongo logra penetrar al insecto aproximadamente a las 72 h, encontrándose con una bacteria en etapa exponencial de crecimiento, que durante este tiempo ha producido metabolitos que inhiben el crecimiento de otros organismos en el hemocele del insecto infectado previamente por el nemátodo.

Ansari et al. (2008) realizaron aplicaciones combinadas de los nemátodos entomopatógenos *H. bacteriophora* (1 y 2 JI/cm² de compost) y *Steinernema feltiae* (Filipjev) (3 y 6 JI/cm² de compost) con el hongo *M. anisopliae* a una concentración de 1.1×10^9 esporas/L de turba, encontrando que la combinación del hongo con *H. bacteriophora* y *S. feltiae* causaron una mortalidad de 100% para ambas dosis de *H. bacteriophora* y de 77.5 y 85% (para las dosis de 3 y 6 JI/cm² respectivamente) en la aplicación combinada con *S. feltiae* dos semanas después de haber inoculado el

hongo, el cual causó una mortalidad de 50% en la aplicación individual, resaltando que estos organismos pueden lograr sinergismo cuando los insectos son tratados con el hongo entomopatógeno entre una y dos semanas previo a la aplicación de los nemátodos.

Los trabajos previos indican que se busca lograr un sinergismo entre estos entomopatógenos para emplear ambos agentes en una estrategia de control más efectiva de diversos insectos plaga. Estos resultados hacen que el objetivo sea investigar si hay sinergia o antagonismo biológico entre ambos agentes al aplicarlos simultáneamente, por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar la virulencia del nemátodo *S. riobrave* en conjunto con el hongo *M. anisopliae* sobre larvas del tercer ínstar de *S. frugiperda*, así como buscar algún efecto de sinergismo o antagonismo entre estos dos agentes de control de esta plaga.

Materiales y métodos

Obtención y propagación de hongos y nemátodos. Los hongos y nemátodos entomopatógenos utilizados fueron identificados y caracterizados molecularmente de manera previa. El hongo *M. anisopliae* cepa M1 con número de acceso KR998522 en el GenBank fue proporcionada por el laboratorio de Bioinsecticidas del CIIDIR-Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional. El nemátodo *S. riobrave* proviene del laboratorio de Control biológico del CIIDIR-Oaxaca del Instituto Politécnico Nacional.

Para la propagación del hongo se realizaron siembras en medio PDA por estriado y se incubaron a 28 °C durante 2 semanas, posteriormente se cosechó el hongo esporulado y se realizó una suspensión de esporas en tween al 0.01%, se realizaron 3 diluciones seriadas y se cuantificó la concentración de esporas en una cámara de Neubauer. Además se realizó una prueba de viabilidad de esporas haciendo una siembra por extensión incubando a 28 °C durante 18 h para ver germinación de esporas, para posteriormente ajustar a una concentración de 1×10^8 esporas mL⁻¹ viables (Cañedo y Ames, 2004). Los nemátodos se reprodujeron *in vivo* usando larvas de *Galleria mellonella* (Linneo) según el método de (Kaya y Stock, 1997). Los

cadáveres de *G. mellonella* se colocaron en trampas White (White, 1927) para obtener y cuantificar juveniles infectivos (JI).

Prueba de tratamiento con el nemátodo. Se confrontaron larvas de *S. frugiperda* del tercer ínstar de desarrollo contra JI de *S. riobrave*, las larvas se colocaron de manera individual en cajas de Petri de 60 x 15 mm en un círculo de papel filtro estéril de 5.5 cm de diámetro en el fondo de la caja con una porción de dieta artificial de 1 cm³ (Murúa et al., 2003). Sobre la larva se suministró 1 mL de JI a una dosis de 250 JI/mL, siguiendo el procedimiento de Leyva-Hernández et al. (2018).

Prueba del tratamiento con el hongo. Para la evaluación del hongo entomopatógeno, las unidades experimentales se prepararon siguiendo el mismo procedimiento que en el bioensayo de nemátodos, aplicando por aspersión 1 mL de solución de conidios de *M. anisoplae* a una concentración de 1×10^8 esporas mL⁻¹.

Prueba del tratamiento con el uso combinado de nemátodo y hongo. El tratamiento combinado de nemátodo y hongo se aplicó suministrando ambos agentes de control de la forma anteriormente descrita, a la misma dosis, con un volumen final de 2 mL. En cada prueba se emplearon 10 larvas con 3 réplicas. Para cada tratamiento se determinó la mortalidad de larvas cada 24 h durante 7 d, tomando el criterio de larva inmóvil al contacto con un pincel.

Los datos de mortalidad en porcentaje se transformaron con arcoseno para que tuvieran una distribución normal y realizar un ANDEVA de una vía ($p < 0.05$) para determinar las diferencias entre tratamientos. Para identificar la naturaleza de las diferencias encontradas, se compararon las medias de los tratamientos con la prueba de Tukey HSD ($p < 0.05$). Los análisis se realizaron mediante el paquete estadístico SAS System v 9.0.

Resultados y discusión

En el tratamiento con el hongo, durante las primeras 72 h no se observó mortalidad de larvas de tercer ínstar; sin embargo, se tuvo una mortalidad de larvas de 13% a las 96 h post aplicación (Fig. 10). Este resultado pudo deberse a que en el ensayo se

usaron larvas del tercer ínstar, las cuales podrían ser más resistentes al hongo entomopatógeno y a que el tiempo de infección y signos de mortalidad en los insectos es más largo (Fig. 11a). Además, el hecho de que la cepa de *M. anisopliae* no fue reactivada con el insecto *S. frugiperda* pudo haber sido otra causa de la baja mortalidad. Al respecto, otros autores sugieren que el hongo se debe aplicar en laboratorio y campo contra larvas de primer ínstar para lograr minimizar los daños que estos insectos ocasionan (Lezama et al., 1996). En el tratamiento con el nemátodo *S. riobrave* en aplicación individual, los insectos se notaron inmóviles y después muertos, confirmando la infección por nemátodos bajo observación en el estereoscopio al ver nemátodos móviles en el interior del cadáver del insecto (Fig. 11b). Se observó una mortalidad del 36%, 80%, 97% y 97% a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h, respectivamente. (Fig. 10). En la aplicación combinada hongo-nemátodo, se tuvo una mortalidad similar a la del nemátodo solo, con 33%, 83% y 100% de mortalidad a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente (Fig. 10). Esta mortalidad de larvas se atribuye al efecto del nemátodo *S. riobrave*, ya que no se observó algún signo claro de infección, como fue la falta de movimiento o el micelio cubriendo el cuerpo del insecto por parte del hongo. Así mismo, el hongo no se observó en el cadáver del insecto en ninguno de los tiempos evaluados (Fig. 11c).

En trabajos similares a este, se ha reportado que en la combinación hongo-nemátodo, es éste último el principal agente causal de mortalidad de insectos Lezama et al. (1996), Molina et al. (2007), Ansari et al. (2008), Tarasco et al. (2011) y Ruiz-Vega et al. (2017). En este trabajo se observó que el hongo no fue capaz de desarrollar micosis y causar la momificación de larvas de *S. frugiperda* del tercer ínstar (Fig. 11a). Por otro lado, el nemátodo fue efectivo por sí mismo (Fig. 11b) y difícilmente puede mejorarse su efectividad al ser combinado con el otro organismo entomopatógeno, tal y como lo señalaron Koppenhofer y Grewal (2005) y Ruiz-Vega et al. (2017). Sin embargo, en otro estudio se ha logrado sinergismo sobre larvas del gorgojo de la vid *Otiorhynchus sulcatus* (Fabricius) cuando los nemátodos se suministraron 2 semanas después a la aplicación del hongo entomopatógeno, logrando causar una mortalidad del 100% (Ansari et al., 2008).

Lo anterior sugiere que uno de los principales factores para que suceda una interacción sinérgica entre entomopatógenos, es que ocurra un estrés de la larva por una infección fúngica inicial, lo que inhibe la alimentación normal de la larva (Ansari et al., 2004; 2008). En esta condición, se incrementa la emisión de CO₂ por parte de la larva en respuesta a la colonización del hongo, lo que aumenta la eficiencia del nemátodo para la ubicación del hospedero (Ansari et al., 2004). Esto indica que si utilizamos larvas del primer ínstar como lo hizo García et al. (2011), así como la aplicación diferida del nemátodo, se podría tener algún efecto sinérgico entre ambos agentes.

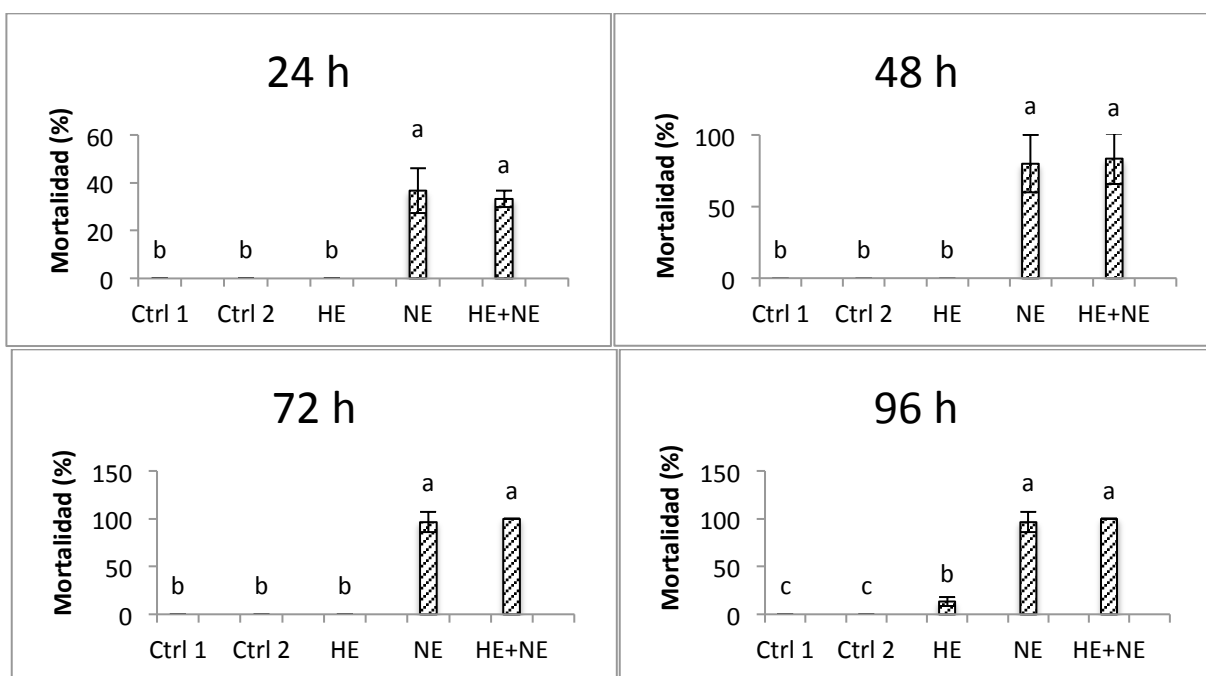


Figura 10. Porcentaje de mortalidad de larvas de tercer ínstar de *S. frugiperda* a las 24, 48, 72 y 96 h post-aplicación. Tratamientos: *M. anisopliae* (HE), *S. riobrave* (NE) y la combinación de ambos entomopatógenos (HE+NE), agua destilada estéril (Ctrl 1) y Tween 0.01% (Ctrl 2). Las barras indican el promedio \pm DE. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey HSD, $p < 0.05$).

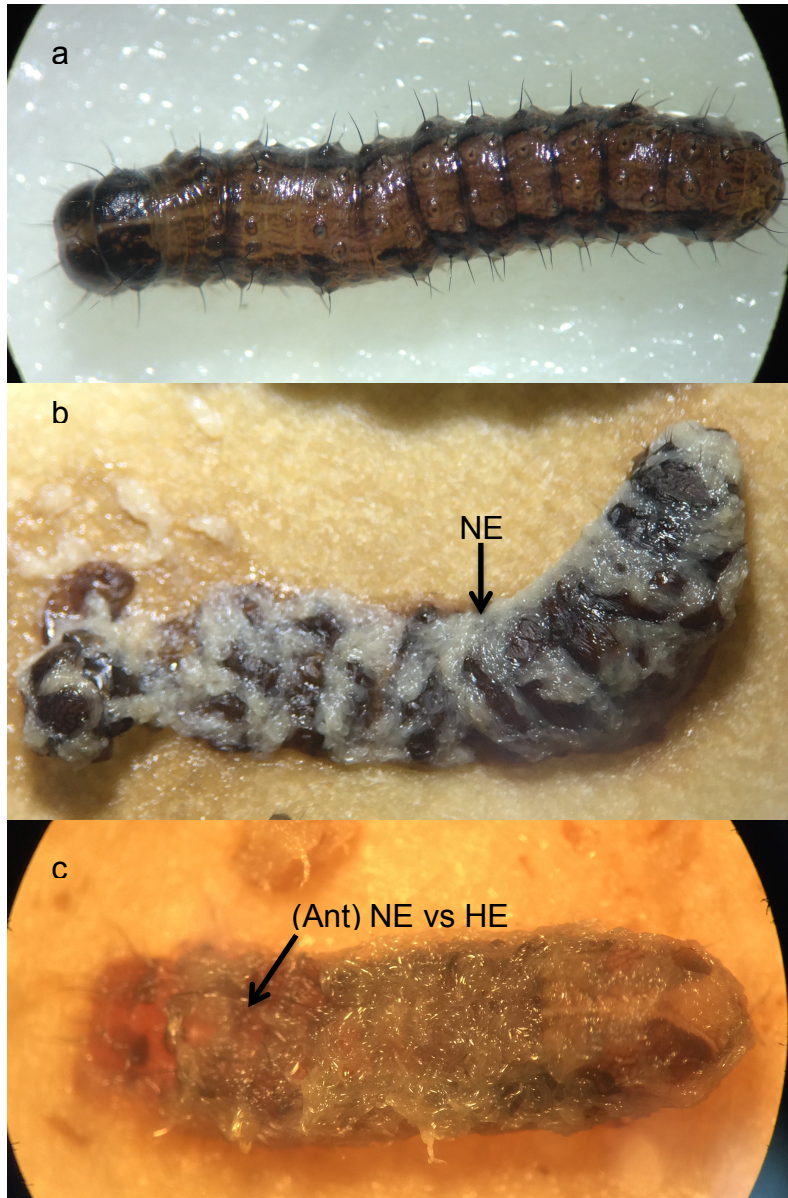


Figura 11. a) Larva de *S. frugiperda* del tercer ínstar infectada con *M. anisopliae* a los 9 días post-inoculación. b) Larva de *S. frugiperda* del tercer ínstar infectadas con JI de *S. riobrave* a los 9 días post-inoculación. c) Larva de *S. frugiperda* del tercer ínstar infectadas con JI de *S. riobrave* y *M. anisopliae* a los 9 días post-inoculación. (Ant: antagonismo NE vs HE).

Conclusiones

El nemátodo *S. riobrave* a una dosis de 250 JI/mL causó mortalidad de 36% de larvas de *S. frugiperda* del tercer ínstar de desarrollo, 24 h después de inoculación; mientras que el hongo *M. anisopliae* a una concentración de 1×10^8 esporas mL⁻¹ tuvo efecto a las 96 h causando una mortalidad del 13%. En el tratamiento combinado empleando ambos entomopatógenos, los porcentajes de mortalidad de larvas fueron similares al tratamiento donde solo se suministró *S. riobrave*, por lo que se le atribuye al nemátodo la causa principal de la muerte de larvas de tercer ínstar de *S. frugiperda*. Se pudo observar claramente un efecto de antagonismo del nematodo sobre el hongo en las condiciones de este estudio. Sin embargo, No obstante, debido a que ambos agentes de manera individual mostraron un efecto bioinsecticida sobre *S. frugiperda*, puede haber sinergia entre ellos, al aplicar primero el hongo y posteriormente el nematodo.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar estudios de Doctorado. Este estudio fue financiado económicamente con los proyectos SIP-IPN claves: 20180316 y 20170101. Evaluación de la efectividad, persistencia, residualidad y seguridad de formulaciones de hongos y nemátodos para el control de plagas agrícolas.

A la M.C. Elva Lorena Vázquez Montoya por su apoyo en el manejo de los nemátodos.

Literatura citada

Ansari, M. A., Tirry, L. y Moens, M. (2004). Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for control of *Hoplia philanthus*. *Biological Control*, 31: 172–180.

Ansari, M.A., Shah, F.A., Tirry, L. y Moens, M. (2006). Field trials against *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae) with a combination of an entomopathogenic nematode and the fungus *Metarhizium anisopliae* CLO 53. *Biological Control*, 39: 453–459.

Ansari, M. A., Shah, F.A. y Butt, T.M. (2008). Combined use of entomopathogenic nematodes and *Metarhizium anisopliae* as a new approach for black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*, control. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 129: 340–34.

Bustillo, P. A. E. y Marin, P. M. (2002). ¿Cómo reactivar la virulencia de *Beauveria bassiana* para el control de la broca de café?. *Manejo Integrado de Plagas*. 62: 1-4.

Cañedo, V., Ames, T. 2004. Manual de laboratorio para manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (Ed). Lima, Perú, 62 p.

García, G. C., González, M. M. B. y Bautista, M. Nestor. (2011). Patogenicidad de aislamientos de hongos entomopatógenos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Revista Colombiana de Entomología* 37 (2): 217-222.

Kaya, H. K. y Stock, S. P. (1997) Techniques in insect nematology. Manual of Techniques in Insect Pathology (ed. by LA Lacey), pp. 281–324. Academic Press, London, UK.

Koppenhöfer, A. y Grewal, P. (2005). Nematodes as biocontrol agents. Entomology and nematology. In: Grewal PS, Ehlers R, Shapiro-Ilan DI (eds) Compatibility and interactions with agochemicals and other biocontrol agents, Chapter 20. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK, pp 363–381.

León-García, I., Rodríguez-Leyva, E., Ortega-Arenas, L.D. y Solís-Aguilar, J.F. (2012). Susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae) a insecticidas asociada a césped en Quintana Roo, México. *Agrociencia*, 46: 279-287.

Lezama-Gutierrez, R., Alatorre-Rosas, R., Arenas-Vargas, M., Bojalil-Jaber, L.F., Molina-Ochoa, J., Gonzalez, Ramirez, M. y Rebolledo-Dominguez, O. (1996). Dual infection of *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA:NOCTUIDAE) by the fungus *Nomuraea rileyi* (DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES) and the nematode

Heterorhabditis bacteriophora (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE). *Vedalia*, 3: 41.44.

Leyva-Hernández, H. A., García-Gutiérrez, C., Ruíz-Vega, J., Calderón-Vázquez, C. L., Luna-González, A. y García-Salas, S. (2018). Evaluación de la Virulencia de *Steinernema riobrave* y *Rhabditis blumi* contra Larvas del Tercer Ínstar de *Spodoptera frugiperda*. *Southwestern Entomologist*, 43(1):189-197.

Mahr, D. L., Whitaker, P. y Ridgway, N.M. (2008). *Biological Control of Insects and Mites: An Introduction to Beneficial Natural Enemies and Their Use in Pest Management*. Cooperative Extension Publishing, University of Wisconsin-Extension. Madison, WI.

Molina, J., Samuels, R., Ribeiro, M. y Dolinski, C. (2007). Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 96:187-192.

Murúa, M., Virla, E. G. y Defago, V. (2003). Evaluación de cuatro dietas artificiales para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides. *Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas*, 29: 43-51.

Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J.R. y Vázquez-Montoya, E.L. (2012). Bioplaguicidas: Una opción para el control biológico de plagas. *Ximhai*, 8(3):17-29.

Ruiz-Vega, J., Cortés-Martínez, C.I., y Silva-Rivera M.E. (2017). Efectos de la aplicación de hongos y nemátodos entomopatógenos sobre la mortalidad de larvas de *Tenebrio molitor* L. (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE). *Entomología mexicana*, 4: 156-160.

Tanada, Y., Kaya, K.H. 1993. Insect pathology. Academic Press Inc. California, USA, pp. 318-387.

Tarasco, E., Alvarez, C., Triggian, O. y Quesada, E. (2011). Laboratory studies on the competition for insect haemocoel between *Beauveria bassiana* and *Steinernema ichnusae* recovered in the same ecological niche. *Biocontrol Science and Technology*, 21(6):693–704.

White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66: 302-303.



REVISTA CHILENA DE ENTOMOLOGÍA

¡CONSPICE NATURAM, INSPICE STRUCTURAM!

INICIO ACERCA DE ÁREA PERSONAL BUSCAR ACTUAL ARCHIVOS

Inicio > Usuario/a > Autor/a > Envíos > #43029 > Resumen

#43029 Resumen

RESUMEN REVISIÓN EDICIÓN

Envío

Autores/as Héctor Leyva Hernández, Cipriano García Gutiérrez, Jaime Ruiz Vega, Antonio Luna-González, Carlos Ligne Calderón-Vázquez, Sergio García Salas

Título **Evaluación de la virulencia y efecto de antagonismo o sinergismo de *Steinernema riobrave* (POINAR Y RAULSTON) y *Metarhizium anisopliae* (METSCHN.) SOROKIN sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH)**

Archivo original 43029-147657-7-SM.DOCX 2018-12-01

Archivos comp. 43029-147739-1-SP.PDF 2018-12-01 [AÑADIR UN ARCHIVO COMPLEMENTARIO](#)

Emisor/a Cipriano García Gutierrez

Fecha de envío diciembre 1, 2018 - 03:48

Sección Área Entomología Aplicada (agrícola, forestal, médica y forense)

Editor/a Luis Devotto Moreno

Estado

Estado En revisión

Iniciado 2018-12-01

Modificado por última vez 2018-12-05

Metadatos del envío

[EDITAR METADATOS](#)

Autores/as

Nombre Héctor Leyva Hernández

Institución INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL CIIDIR UNIDAD SINALOA

País México

Resumen biográfico Dpto.de biotecnología agrícola. Estudiante de posgrado

Nombre Cipriano García Gutiérrez

URL <http://orcid.org/0000-0002-8967-3679>

Institución INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL COFAA-CIIDIR UNIDAD SINALOA

País México

Resumen biográfico Dpto. de Biotecnología agrícola. Profesor Investigador

Contacto principal para la correspondencia editorial.

Nombre Jaime Ruiz Vega

Institución INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL CIIDIR UNIDAD OAXACA

País México

Resumen biográfico Dpto.Agroecología y control biológico Profesor investigador

Nombre Antonio Luna-González

Institución —

País México

Resumen biográfico Dpto. Acuacultura. Profesor investigador

Nombre Carlos Ligne Calderón-Vázquez

Institución INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL CIIDIR UNIDAD SINALOA

País México

Resumen biográfico Dpto. Genética de plantas y genómica. Profesor investigador

Nombre Sergio García Salas

Institución INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

País México

Resumen biográfico Planta piloto UPIBI. Profesor investigador

Título y resumen

Título **Evaluación de la virulencia y efecto de antagonismo o sinergismo de *Steinernema riobrave* (POINAR Y RAULSTON) y *Metarhizium anisopliae* (METSCHN.) SOROKIN sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH)**

[OPEN JOURNAL SYSTEMS](#)

[Servicio de ayuda de la revista](#)

USUARIO/A

Ha iniciado sesión como...

cipriano61

- [Mis revistas](#)
- [Mi perfil](#)
- [Cerrar sesión](#)

AUTOR/A

Envíos

- [Activo/a](#) (1)
- [Archivar](#) (0)
- [Nuevo envío](#)

NOTIFICACIONES

- [Vista](#)
- [Gestionar](#)

IDIOMA

Escoge idioma

[Español \(España\)](#) [Entregar](#)

CONTENIDO DE LA REVISTA

Buscar

Ámbito de la búsqueda

[Todo](#)

[Buscar](#)

Examinar

- [Por número](#)
- [Por autor/a](#)
- [Por título](#)
- [Otras revistas](#)

TAMAÑO DE FUENTE

[A](#) [A](#) [A](#)

CAPITULO IV:

Nota científica sometida a la revista Southwestern Entomologist.

Potencial de la formulación en Pellets de *Steinernema riobrave* y *Acrobelloides camberenensis* para el control de *Spodoptera frugiperda*¹

Héctor Alejandro Leyva-Hernández², Cipriano García-Gutiérrez^{2*}, Jaime Ruíz-Vega³.

El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) es la principal plaga económica de este cultivo (Blanco et al. 2014) Hongos (HE) y nemátodos entomopatógenos (NE) han demostrado potencial para combatir a este insecto plaga (Ruelas et al., 2013; Leyva et al., 2018), por lo que formular bioinsecticidas efectivos a base de estos organismos de control es todavía una meta por lograr (Pavone et al., 2009). Al respecto, Matadamas et al. (2014) determinaron que formular NE en pellets mejora significativamente la supervivencia de estos, por lo que esta formulación puede emplearse para la producción en masa de NE para el control de plagas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar al nemátodo nativo *Acrobelloides camberenensis* (De Ley, Geraert & Coomans, 1990) como agente de control de *S. frugiperda*, además de determinar el potencial de la formulación de *Steinernema riobrave* (Poinar y Raulston, 1994) en pellets hechos con materiales granulares. El material biológico se obtuvo por la técnica de Beeding y Akhurst (1975) utilizando larvas de *S. frugiperda* como insecto trampa. Se colectaron muestras de suelo en campos cultivados con maíz y estas se llevaron al laboratorio, donde se colocaron en una charola de 6 L. Posteriormente se colocaron diez larvas de *S. frugiperda* del tercer estadio en cada muestra de suelo. Los recipientes se taparon y voltearon para almacenarse a 25 ± 2 ° durante 7 días. Los cadáveres de insectos se colocaron en

¹Lepidoptera: Noctuidae

²Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa, Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes 250, Col. San Joaquín Guasave, Sinaloa, México. *autor de correspondencia: garciaciprian@hotmail.com

³Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca IPN, Hornos No. 1003, Col. Noche Buena, Municipio de Santa Cruz Xoxocotlán C.P. 71230. Oaxaca, México.

una trampa White (Woodring y Kaya, 1988), para ser observados diariamente hasta mostrar cambios en la coloración y observar una consistencia flácida, características de infección por nemátodos reportada por Poinar (1979). La presencia de los NE se confirmó mediante la observación de los cadáveres bajo el estereoscopio.

Para confirmar la patogenicidad, los nemátodos obtenidos se enfrentaron contra larvas de gusano cogollero vivos y muertos. El enfrentamiento contra larvas muertas se llevó a cabo después de la muerte inducida por congelación de las larvas. Se colocaron 5 larvas vivas y 5 muertas por caja de Petri y se suministró 1 mL con 600 nemátodos. La identificación de los NE se basó en la metodología reportada por De Ley et al. (2005). Para evaluar al NE se realizó un ensayo donde se distribuyeron aleatoriamente larvas de gusano cogollero: Los nemátodos *S. riobrave* y *A. camberenensis* a dosis de 100, 250 y 500 Juveniles Infecciosos/mL) y agua destilada estéril como control. Cada tratamiento fue suministrado agregando 1 mL de la suspensión de NE, usando el mismo volumen de agua en el control (Molina et al., 1996; Andaló et al., 2010; Caccia et al., 2014).

Se realizaron 3 replicas y 10 repeticiones por replica, donde cada repetición constó de una larva de tercer ínstar dentro de una caja de Petri de 5cm de diámetro con papel filtro donde se colocó 1 cm³ de la dieta artificial.

Se conto el numero de larvas muertas cada 24 h durante 7 días, observando cambios en movimiento, turgencia y coloración. Para evaluar la mortalidad de larvas se realizó una análisis de varianza (ANDEVA) de una vía con un 95% de confianza ($\alpha=0.05$) con el programa SAS. Las diferencias de tratamientos se estimaron mediante una prueba de comparación de medias de Tukey HSD. Para la formulación de NE, se utilizó al nematodo *S. riobrave* ya que el nemátodo nativo *A. camberenensis* no demostró ser efectivo en el ensayo de confrontación (Fig. 1A) para el control de *S. frugiperda* bajo las condiciones de este experimento. *S. riobrave* fue propagado en laboratorio empleando la técnica de Woodring y Kaya (1988) y después se ajustó la concentración de estos para llegar a 500 juveniles infecciosos (JI) por cada 200 μ L (Cortés et al., 2016). Para elaborar los pellets (formulado granular) se definieron los materiales y las proporciones a utilizar para el material encapsulante

de la pelletización: Barro rojo (B), Tierra de diatomeas (TD) y Ceniza (C). Esto con el propósito de dar más estabilidad a la mezcla, pues la TD tiende a la descompactación, de modo que los materiales B y C son una alternativa económica y de fácil adquisición para resolver este problema. El barro y la ceniza se tamizaron empleando tamices número 100 y 200, de una luz de malla de 149 y 75 μm , respectivamente (Bustamante, 2016). Una vez que los NE fueron aclimatados a temperatura ambiente se llevó a cabo la pelletización de manera mecánica. El tratamiento 1, se elaboró mezclando 20 g de cada uno de los ingrediente, teniendo un total de 60 g. El tratamiento 2, se elaboró mezclando 20 g de B, 20 g de C y 10 g de TD, obteniendo un total de 50 g. Por último, el tratamiento 3 estuvo compuesto de 42.5g de B, 5 g de C y 2.5 g de TD que al final sumaron 50 g de la mezcla. Estas mezclas se emplearon para la elaboración de pellets por la técnica de pelletización en un Vortex (marca Labnet). Se obtuvieron pellets un peso medio de T1= 0.65g; T2= 0.67g; T3=0.69g, y un diámetro promedio de 1 cm, los cuales se almacenaron en cajas multipozos a temperatura ambiente. Para determinar la efectividad del NE se hicieron ensayos con tres repeticiones con tres larvas de *S. frugiperda* del tercer instar por repetición. Se adicionó un pellet por larva, las cuales estuvieron confinadas individualmente en una caja de 24 multipozos con tapadera, al cual se le colocó papel filtro en el fondo. Se instaló además un testigo con agua destilada estéril. Se evaluó semanalmente la supervivencia y virulencia de los NE pelletizados, la primer semana de evaluación se pesaron los pellets y posteriormente se diluyeron en 10 mL de agua (Cortés et al., 2016) tres pellets de cada tratamiento, para aplicar a larvas de *S. frugiperda* del tercer instar.

Los tratamientos 1 y 2 no mostraron consistencia en la formación del pellet, al descompactarse o fragmentarse aun cuando se tuvo cuidado en su manipulación. El tratamiento 3 permitió obtener un pellet más estable (Fig. 1B). En la evaluación de la supervivencia, se encontró que en la primer semana solo en el tratamiento 3 se pudieron observar NE vivos en los pellets (Fig. 1C) en la primer semana después de haber sido sometidos a este proceso, además de ser el tratamiento en el que los pellets no se fragmentaron al manipularse, esto pudo deberse a una tasa de deshidratación más lenta debido a las proporciones de los ingredientes. El contenido

de arcilla (barro) fue mayor en este tratamiento (85%), por lo que el nemátodo pudo permanecer en un ambiente hidratado durante más tiempo debido a una deshidratación más lenta (Kuwatra y Ripke, 2003) No obstante, tanto en la segunda como en la tercera semana no se observaron nematodos vivos en ninguno de los pellet, lo que sugiere continuar con experimentos para determinar los materiales y proporciones óptimas para la formulación hasta tener las combinaciones más consistentes para una mayor sobrevivencia e infectividad de los nemátodos.

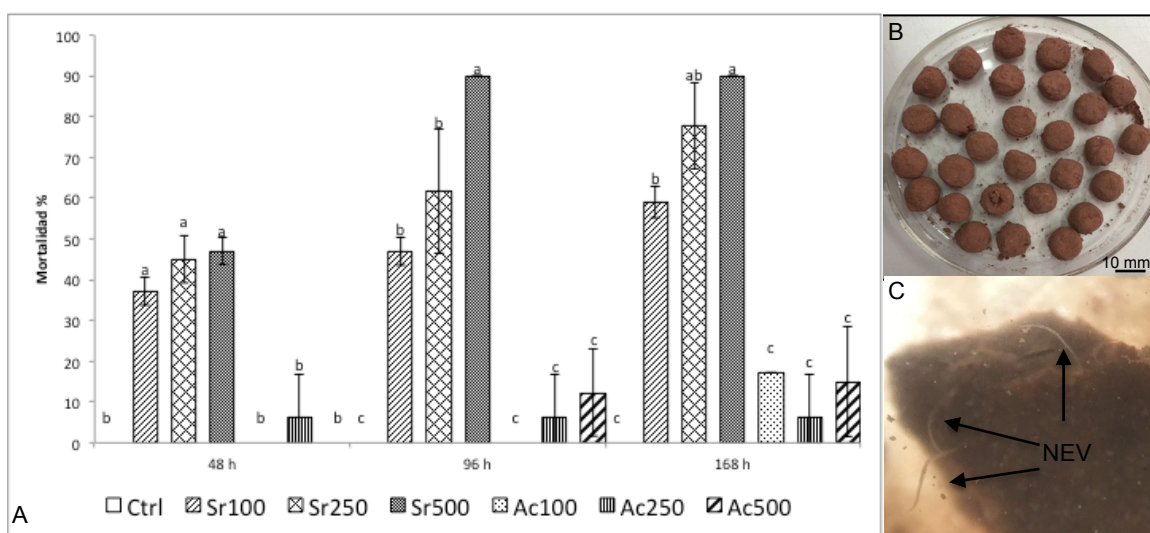


Fig. 1. (A), Porcentaje de mortalidad de *Spodoptera frugiperda* 48 horas después de la inoculación con los NE *S. riobrave* (Sr) y *Acrobelloides camberenensis* (Ac) y Agua destilada estéril como control. Barras con diferente letra indican diferencia estadística ($P = 0.05$). (B) Pellet consistente de tratamiento 3. (C) Nemátodo vivo (NEV) 1 semana post formulación.

Fig. 1. (A) Percentage of *Spodoptera frugiperda* mortality at 48 hours post inoculation to treatments with EN *S. riobrave* (Sr) and *Acrobelloides camberenensis* (Ac) and sterile distilled water as control. Bars with a different letter are significantly different ($P = 0.05$). (C) (B) Consistent pellet of treatment 3. (C) Alive nematode (NEV) 1 week post formulation.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar estudios de Doctorado. Este estudio fue financiado económicamente con los proyectos SIP-IPN claves: 20160476 y 20170101 (Estudio del modo de acción de formulaciones de hongos y nematodos entomopatógenos en insectos plaga de importancia agrícola en Sinaloa y Evaluación de la efectividad, persistencia, residualidad, y seguridad de formulaciones de hongos y nematodos para el control de plagas agrícolas).

Referencias Citadas

Andaló, V., V. Santos, M. G. Furtado, M. C. Costa, and J. A. Moino. 2010. Evaluation of entomopathogenic nematodes under laboratory and greenhouses conditions for the control of *Spodoptera frugiperda*. *Cienc. Rural*. 40: 1860-1866.

Beedding, R.A. y Akhurst, R.J. (1975). A simple technique for the detection of insect parasitic nematodes in soil. *Nematologica*, 21(1),109-110.

Blanco, C. A., G. Pellegaud, U. Nava-Camberos, D. Lugo-Barrera, P. Vega-Aquino, J. Coello, A. P. Teran-Vargas, and J. Vargas-Camplis. 2014. Maize pest in Mexico and challenges for the adoption of integrated pest management programs. *J. Integ. Pest Mngmt*. 5: 1-9.

Bustamante, E. L. V. (2016). *Estabilización de la matriz granular para alojar nemátodos entomopatógenos (Steinernema glaseri)* (tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, Oaxaca, México.

Caccia, M. G., E. Del Valle, M. E. Doucet, and P. Lax. 2014. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* and *Helicoverpa gelatopoeon* (Lepidoptera: Noctuidae) to the entomopathogenic nematode *Steinernema diaprepesi* (Rhabditida: Steinernematidae) under laboratory conditions. *Chilean J. Agric. Res*. 74: 123-126.

Cortés, M. C. I., Ruiz, V. J., Matadamas, O. P. T., Lewis, E.E., Aquino, B. T. y Navarro, A. J. (2016). Effect of moisture evaporation from diatomaceous earth pellets

on storage stability of *Steinernema glaseri*. *Biocontrol science and technology*, 26(3), 305-319.

De Ley, P., D. L. Tandingan, K. Morris, E. Abebe, O. M. Mundo, M. Yoder, J. Heras, D. Waumann, O. A. Rocha, A. H. Jay Burr, J. G. Baldwin, and T. Kelley. 2005. An integrated approach to and informative morphological vouchering of nematodes for applications in molecular barcoding. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360: 1945-1958.

Kuwatra, S. K. y Ripke, S. J. (2003). Laboratory studies for improving green ball strength in bentonite-bonded magnetite concentrate pellets. *International journal of mineral processing*, 72, 429-441.

Leyva, H. H. A., García, G. C., Ruíz, V. J., Calderón, V. C. L., Luna, G. A and García, S. S. 2018. Evaluación de la virulencia de *Steinernema riobrave* y *Rhabditis blumi* contra larvas del tercer instar de *Spodoptera frugiperda*. *Southwestern Entomologist*. 43(1): 189-197.

Matadamas, O. P. T., Ruiz, V. J., Vazquez, F. J. A., Cruz, M. H. y Cortés, M. C. I. 2014. Mechanical production of pellets for the application of entomopathogenic nematodes: factors that determine survival time of *Steinernema glaseri*. *Biocontrol Science and Technology*. 24(2): 145–157.

Molina, O. J., J. J. Hamm, G. R. Lezama, J. L. F. Bojalil, V. M. Arenas, and R. M. Gonzalez. 1996. Virulence of six entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) on immature stages of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Vedalia* 3: 25-29.

Pavone, D., Díaz, M. y Trujillo, L., Dorta, B. (2009). A granular formulation of *Nomuraea rileyi* Farlow (Samson) for the control of *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). *Interciencia*, 34(2): 130-134.

Ruelas-Ayala, R. D., C. García-Gutiérrez, y A. Arshuleta-Torres. 2013. Selección de aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* tolerantes a altas

temperaturas para el control de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Southwest. Entomol. 38: 313-323.

Poinar, G. O. (1979). *Nematodes for biological control of insects*. CRC Press, Boca Raton,

Woodring, J. L., and H. K. Kaya. 1988. *Steinernemaid and Heterorhabditid Nematodes: A Handbook of Techniques*. Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, AK.



11Dic18

Estimado Dr. García, hemos recibido su manuscrito titulado “**Potencial de la formulación en Pellets de *Steinernema riobrave* y *Acrobeloïdes camberenensis* para el control de *Spodoptera frugiperda*”**, de los autores Héctor Alejandro Leyva-Hernández, Cipriano García-Gutiérrez, y Jaime Ruíz-Vega, el cual se pondrá a revisión de pares pronto.

Sin más por el momento reciba un afectuoso saludo y le agradecemos su interés de publicar su interesante trabajo en *nuestra* revista.

Atentamente,

Carlos A. Blanco

Carlos A. Blanco, Ph.D.

Editor Asociado

Southwestern Entomologist

<https://sswe.tamu.edu/>

CAPITULO V:

Formulación de hongos entomopatógenos para el control del gusano cogollero

Introducción

En el presente capítulo se presenta el trabajo realizado y correspondiente a la evaluación de la virulencia de cepas nativas de hongos entomopatógenos y la formulación por microencapsulación del hongo sobresaliente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento de una cría axénica de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith en laboratorio

Para el establecimiento de la cría de *S. frugiperda* J.E. Smith se colectaron larvas en cultivos de maíz establecidos en el valle de Guasave, para esto se colocaron de manera individual (dado el hábito de canibalismo), las cuales fueron alimentadas con una dieta artificial y después fueron confinadas en una cámara de cría previamente desinfectada con hipoclorito de sodio al 0.5% para evitar la contaminación de las larvas por algún contaminante biológico.

Elaboración de dieta artificial

La dieta artificial se elaboró según la metodología de Hernández *et al.*, (1989) y por Murúa *et al.*, (2003) suministrando los requerimientos nutricionales de los insectos a base de ingredientes disponibles en el mercado (Tabla 1).

INGREDIENTES	g/L	INGREDIENTES	g/L
Harina de maíz	120	Metil-paraben	2.2
Germen de trigo	55	Agar bacteriológico	15
Levadura de cerveza	35	Vitaminas	15 mL
Ácido ascórbico	3.5	Agua destilada	700 mL
Ácido sórbico	1.1		

Tabla 1. Componentes de dieta artificial para alimentar larvas de *S. frugiperda*.

Una vez que las larvas alcanzaron el estadio de pupa, se colocaron en una jaula para evitar la pérdida de adultos. Posterior a la emergencia estos se colocaron en parejas para la copula. Las hembras ovipositaron las masas de huevecillos y se trasladaron a cajas de Petri para favorecer la eclosión. Las larvas que eclosionaron se colocaron en contenedores de plástico y se repitió la misma técnica, con el fin de obtener distintas generaciones.

Bioensayos de los aislados de HE más virulento para gusano cogollero

Se emplearon cepas nativas de hongos entomopatógenos pertenecientes a la colección de cepas de HE del Laboratorio de Bioinsecticidas del CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa.

Se estableció un pie de cría de *G. mellonella* que sirvió para emplearse como hospedero para HE. Para la alimentación de este insecto se elaboró una dieta artificial, la cual fue suministrada a las larvas de *G. mellonella* con el fin de que se alimentaran hasta llegar al estado adulto, donde una vez que ovipositaron los huevecillos se colocaron en una dieta nueva para que eclosionaran las larvas y continuaran su desarrollo. Dicho proceso se repitió “n” veces hasta alcanzar una población elevada del insecto (Vázquez, 2012).

Multiplicación de HE

Para la reproducción de HE se tomó como fuente de inóculo los aislados de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* del laboratorio de Bioinsecticidas. Con ayuda de un asa de transferencia o aguja entomológica se tomaron cuerpos infectivos de ambas especies para sembrarse en caja Petri con medio de cultivo PDA acidificado con ácido láctico para evitar contaminación bacteriana. Una vez realizada la siembra, las cajas Petri fueron incubadas a 28 °C por un periodo de 7 a 18 días hasta observar crecimiento del hongo.

Evaluación de cepas de HE

Se evaluaron cuatro aislados de *Beauveria bassiana* y dos de *Metarhizium anisopliae* provenientes del Laboratorio de Bioinsecticidas del CIIDIR-Sinaloa. Los aislados fueron seleccionados por sus antecedentes infectivos en otras especies de lepidópteros (*Heliothis virescens*) y por haber demostrado el mejor crecimiento radial cuando se sometieron a un gradiente de incremento de temperatura en condiciones de laboratorio (Acuña, 2015; Ruelas et al., 2013). Todos los aislados han sido previamente caracterizados morfológica y molecularmente por Archuleta (2012).

Los bioensayos fueron realizados según la metodología empleada por Ruelas et al. (2013), los aislados de *B. bassiana* (B1, B3, B4 y B9) y los de *M. Anisopliae* (M1 y M2) fueron crecidos en cajas de Petri con medio PDA y se incubaron durante 14 días a 28 °C hasta su esporulación. Posteriormente estos se utilizaron para inocular larvas de *G. mellonella* con la finalidad de reactivar su virulencia. Posteriormente se suspendieron 1×10^8 conidios mL^{-1} en 1 mL de solución estéril de Tween 80 al 0.01% y se inocularon 3 larvas (individualizadas en cajas de Petri de 35 mm de diámetro con dieta artificial) por aislado añadiendo 100 μL de la suspensión de esporas a cada larva y después se incubaron en una cámara de cría a 28 ± 2 °C a una humedad relativa del 75% hasta que se produjo infección por el hongo. Una vez que las larvas de *G. mellonella* mueran por efecto del hongo, se espera su esporulación de donde se colectaron nuevamente esporas para realizar su transferencia a cajas de Petri con medio PDA acidificado con ácido láctico para evitar contaminación bacteriana, estas se incubaron a 28 ± 2 °C a una humedad relativa del 75% durante 14 días hasta su esporulación. Estos aislados fueron nuevamente resuspendidos en solución de 1×10^8 conidios mL^{-1} en 1 mL de solución estéril de Tween 80 al 0.01%.

Una vez resuspendidas las esporas de los hongos reactivados, se aplicaron los tratamientos a larvas de gusano cogollero. Para determinar la virulencia de los aislados se realizó un diseño completamente al azar, se emplearon 3 replicas por tratamiento, 10 larvas de gusano cogollero del tercer ínstar individualizadas con dieta artificial por réplica y se inocularon por inmersión en suspensión de esporas (4 concentraciones de esporas por aislado de hongo: 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 esporas mL^{-1}). Como control se empleó la misma metodología de inoculación por

inmersión en una solución de Tween 0.01% sin hongo. Los insectos inoculados se colocaron en dentro de una caja de Petri con un papel filtro humedecido con 300 µL de agua destilada estéril y se incubaron a 28 ± 2 °C. Las larvas se observaron diariamente para realizar en conteo de larvas vivas y muertas. Las larvas muertas se retiraron y desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 0.5% durante 5 minutos y posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril para remover los agentes desinfectantes de la superficie; Las larvas desinfectadas se colocaron en cajas de Petri con papel filtro humedecido con agua destilada estéril, por último, se incubaron a 28 ± 2 °C por una semana hasta la esporulación del hongo.

Para determinar la mortalidad de los tratamientos se empleó la fórmula de Abbott:

$$MC = \frac{\% \text{ mortalidad de tratamiento} - \% \text{ mortalidad testigo}}{100 - \% \text{ mortalidad testigo}}$$

Se realizaron evaluaciones diariamente hasta que muriera el 100% de la población, determinando así el tiempo letal 50 TL_{50} de los tratamientos (Cañedo y Ames, 2004).

Formulación del HE más sobresaliente

Previo a la microencapsulación de HE, se realizó una propagación de estos por fermentación difásica. Se empleó arroz quebrado comercial como sustrato, el cual fue lavado tres veces con agua potable para posteriormente aplicarle 130 ppm de antibiótico (tetraciclina y furazolidona, 2 pastillas de cloranfenicol L^{-1} de agua) y se dejó reposando durante 30 min. Posterior al tiempo de reposo se eliminó el exceso de agua. Una vez que el sustrato estuvo preparado, se colocaron 300 g de este en bolsas autoclavables y se esterilizaron por un periodo de 15 min a una temperatura de 120 °C, posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente por un periodo de 24 h.

Para la inoculación de los HE, empleando un asa bacteriológica, se realizó un raspado en la superficie de los cultivos en cajas de Petri y se colocó en un tubo de ensaye con 20 mL de agua destilada estéril y 0.5% de dispersante. Posteriormente,

la suspensión se mezcló en 1L de agua destilada y esterilizada con antibiótico y posteriormente se agitó constantemente durante 24 h para enfriar y homogenizar la suspensión con los cuerpos infectivos. Una vez homogenizada la suspensión, se agregarán 10 mL de esta en cada bolsa con sustrato previamente preparado, a una concentración de 1×10^6 esporas mL⁻¹, y una vez realizada la inoculación las bolsas se homogenizaron e incubaron a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ por un periodo de 16 ± 2 días removiendo las bolsas cada cuatro días hasta la germinación y desarrollo del hongo.

Tras la producción de HE, se elaboró la matriz encapsulante basándose en el método propuesto por Rosas et al. (2004). Para esto, inicialmente se elaboró una mezcla homogénea en seco de 4 g/L de colorante rojo, 26 g/L de gelatina bovina y 20 mL/L de aceite de maíz; posteriormente se adicionaron 25 mL de agua destilada y se agitó para elaborar una mezcla integra. La mezcla se deshidrató a 40°C durante 24 h y una vez completado el proceso, esta fue desmoronada manualmente y después fue tamizada a través de un tamiz número 6 con el fin de obtener gránulos uniformes. Los gránulos fueron almacenados herméticamente a temperatura ambiente hasta su utilización.

Para el secado por aspersión, los hongos deben de estar en una suspensión líquida para posteriormente introducirlos en un secador por aspersión con el fin de obtener un producto en polvo. La velocidad de flujo fue de 10 mL/min y la temperatura de entrada en el secador fue de 130°C y de 85°C en la salida (Fernández et al., 2001).

Evaluación de la efectividad de la formulación de HE en laboratorio

Una vez formulado el hongo, se procedió a determinar porcentaje de viabilidad de esporas para determinar viabilidad post formulación.

Para la realización del bioensayo en laboratorio se emplearon los insectos de *S. frugiperda* (L) de tercer instar criados en laboratorio, garantizando sus condiciones sanitarias y un desarrollo homogéneo. La inoculación del hongo formulado se llevó a cabo por aspersión (Chernaki et al., 2007), diluyendo en agua destilada esteril previamente el formulado hasta ajustar una concentración de 1×10^8 esporas mL⁻¹.

Posteriormente se pasaron a incubación a temperatura constante de acuerdo a los requerimientos del hongo (1 o 2) por emplear y se observaron diariamente. Se llevó el control de la mortalidad de un tratamiento testigo aplicando agua destilada estéril (Padilla, 2017).

Se realizaron tres repeticiones, empleando 10 larvas del tercer ínstar por tratamiento. El número de larvas se determinó cada 24 h y se calculó el porcentaje de mortalidad a los 3, 5, 7 y 9 días post-inoculación (Céspedes et al., 2008).

Para determinar la mortalidad de los tratamientos se empleó la fórmula de Abbott:

$$MC = \frac{\% \text{ mortalidad de tratamiento} - \% \text{ mortalidad testigo}}{100 - \% \text{ mortalidad testigo}}$$

$$100 - \% \text{ mortalidad testigo}$$

Análisis estadístico

Para evaluar la mortalidad de larvas se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía con un 95% de confianza ($\alpha=0.05$) con el programa SAS. Las diferencias de tratamientos se estimaron mediante una prueba de comparación de medias de Tukey HSD.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Establecimiento de una cría axénica de *S. frugiperda* J.E. Smith en laboratorio

Se inició la cría del insecto colectando en campo masas de huevos y larvas de diferentes estadios. Las larvas fueron individualizadas debido a su hábito de canibalismo y se alimentaron con dieta merídica (Fig. 13 A) para completar su ciclo. Sin embargo, las diferencias de estadios entre las larvas propició a que las mas avanzadas pasaran a pupar (Fig. 13 B), quedando el resto todavía en estado de larva. Se obtuvieron adultos del insecto donde todos fueron colocados juntos para favorecer la copula y la ovipostura (Fig. 13 C). La dieta fue suministrada de nuevo una vez que las larvas la consumían por completo o si la dieta anterior se mostraba oscura, seca o endurecida.

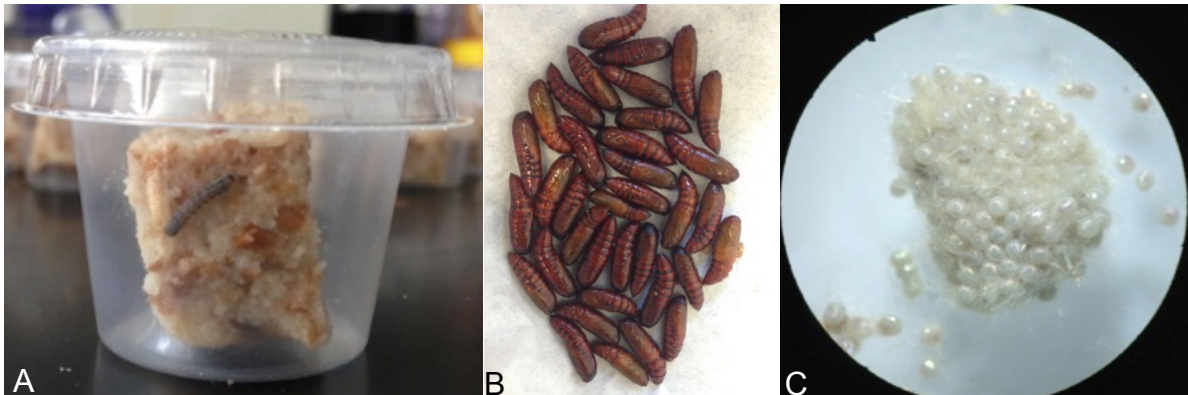


Figura 13. Larva con dieta merídica (A), pupas (B) y huevecillos (C) de *S. frugiperda*.

Posterior a las oviposturas, la eclosión de larvas fue variable. Algunas masas de huevecillos no eclosionaron y mostraban huevecillos necrosados.

Se logró obtener una primer generación de 126 larvas, las cuales se individualizaron al llegar al tercer ínstar, y de manera paralela fueron depositadas más masas de huevecillos. Las larvas fueron colocadas en una cámara de cría en donde se estableció una temperatura constante de 28 °C. La cría de *S. frugiperda* se mantuvo de manera satisfactoria.

Bioensayos del aislado de HE más virulento para gusano cogollero

Para llevar a cabo la selección del mejor aislado de HE, fue necesario primero establecer la cría del insecto *G. mellonella*, el cual también se utiliza en los experimentos con NE.

Las cepas seleccionadas B1, B3, B4, B9, M1 y M2 fueron resembradas previo a los bioensayos en medio PDA (Papa Dextrosa Agar) con el fin de trabajar con material propio, y una vez que las cepas habían esporulado se procedió con los ensayos de reactivación en larvas de *G. mellonella*. Para la reactivación se emplearon dos larvas de la palomilla de la cera *G. mellonella* por cada cepa. El ensayo fue llevado a cabo según la metodología antes mencionada, obteniendo como resultado la siguiente información:

Hongo \ Hongo	B1	B3	B4	B9	M1	M2
<i>G. mellonella</i>						
Larva 1	✓	×	×	✓	×	×
Larva 2	✓	×	×	✓	×	×

Tabla 2. Primer ensayo de reactivación de HE en *G. mellonella*: ✓ Insecto micosado; × Insecto no-micosado.

Una vez realizado este experimento, se procedió a hacer un nuevo ensayo de reactivación conservando las cepas que mostraron micosis en el insecto y cambiando el origen de las cepas B3, B4, M1 y M2 ya que no mostraron crecimiento alguno sobre el insecto, lo cual podría deberse a una pérdida de viabilidad al haber sido resembradas en medio PDA durante un tiempo prolongado.

La repetición del ensayo mostró lo siguiente:

Hongo \ Hongo	B1	B3	B4	B9	M1	M2
<i>G. mellonella</i>						
Larva 1	✓	×	×	✓	×	✓
Larva 2	✓	×	×	✓	×	✓

Tabla 3. Segundo ensayo de reactivación de HE en *G. mellonella*: ✓ Insecto micosado; × Insecto no-micosado.

Al haber obtenido la reactivación de B1, B9 y M2, se procedió a la reactivación de hongos en larvas de *S. frugiperda*, sustituyendo una vez más el origen de las cepas que no mostraron micosis en los insectos. Los resultados de la reactivación de HE en larvas de *S. frugiperda* se muestran en la siguiente tabla:

Hongo <i>G. mellonella</i>	B1	B3	B4	B9	M1	M2
Larva 1	✓	×	×	✓	✓	✓
Larva 2	✓	×	×	✓	✓	✓

Tabla 4. Primer ensayo de reactivación de HE en *S. frugiperda*: ✓ Insecto micosado; × Insecto no-micosado.

Con el fin de reactivar las cepas aun faltantes de B3 y B4, se realizó un ensayo más de reactivación en larvas de *S. frugiperda*, cambiando una vez mas el origen de las cepas antes mencionadas. Sin embargo, el resultado obtenido fue el siguiente:

Hongo <i>G. mellonella</i>	B1	B3	B4	B9	M1	M2
Larva 1	✓	×	×	✓	✓	×
Larva 2	✓	×	×	✓	✓	×

Tabla 5. Segundo ensayo de reactivación de HE en *S. frugiperda*: ✓ Insecto micosado; × Insecto no-micosado.

Los resultados obtenidos en este ultimo ensayo, al ser repetitivo el comportamiento de las cepas (B1, B9 y M1) se procedió a hacer un bioensayo de virulencia en larvas del tercer y cuarto ínstar de *S. frugiperda* con el fin de seleccionar la cepa que fue empleada para la microencapsulación.

El ensayo de virulencia se llevó a cabo utilizando los hongos desarrollados en los cadáveres de los insectos micosados en el segundo ensayo de reactivación de HE en *S. frugiperda*. Se llevó a cabo el procedimiento indicado en la parte de materiales y métodos, con una diferencia, en lugar de utilizar una concentración de 1×10^9 esporas mL⁻¹ como lo indica el procedimiento, se utilizó una concentración de 1×10^7 esporas mL⁻¹. Lo anterior se realizó debido a que al cosechar el hongo del insecto, las concentraciones obtenidas en cada cepa fueron las siguientes:

B1: 6×10^7 esporas mL⁻¹; B9: 9.675×10^7 esporas mL⁻¹ y M1: 6.79×10^8 esporas mL⁻¹

Por lo tanto, las concentraciones no pudieron alcanzar la esperada, y la forma de homogenizar la concentración en todos los casos fue dejarlo a un valor de 1×10^7 esporas mL⁻¹.

Una vez uniformizada la concentración de esporas, se llevó a cabo la inoculación de larvas. Se realizó un diseño completamente al azar, empleando 5 réplicas por tratamiento, 1 larva de gusano cogollero del tercer o cuarto ínstar por replica y se le suministró 100 µL de la suspensión de esporas reactivadas en el pronoto a cada larva. Como control se empleó el mismo volumen de solución de Tween 0.01% sin hongo. A ninguna larva se le suministró dieta artificial con el fin de potenciar el efecto de los tratamientos. Se observó el estado de las larvas a las 24, 48, 72 y 96 h post-inoculación, obteniendo los siguientes resultados

Tratamiento Replica	Control				B1				B9				M1			
	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
Larva 1	✓	✓	±	×	✓	✓	±	×	✓	±	×	×	✓	±	×	×
Larva 2	✓	✓	±	×	✓	✓	±	×	✓	±	×	×	✓	±	×	×
Larva 3	✓	✓	±	×	✓	✓	±	×	✓	±	×	×	✓	±	×	×
Larva 4	✓	✓	±	±	✓	✓	±	×	✓	±	×	×	✓	±	×	×
Larva 5	✓	✓	±	×	✓	✓	±	×	✓	±	×	×	✓	±	×	×

Tabla 6. Bioensayo de virulencia de HE en larvas de *S. frugiperda*: ✓ Insecto con movilidad; ± Insecto con poca movilidad; × Insecto muerto.

Las larvas que se vieron afectadas a las 48 h fueron las inoculadas con B9 y M1, mostrándose inactivas, es decir, mostraban disminución en la movilidad pero seguían con vida. A este tiempo, las larvas tratadas con el control y B1 mostraban un comportamiento normal. Sin embargo a las 72 h se observó que las larvas de B9 y M1 habían muerto, mientras que las larvas en el control y en B1 seguían con vida pero con poca movilidad. A las 96 h, todas las larvas habían muerto, excepto una larva perteneciente al tratamiento control. A la par, se realizó una prueba de viabilidad de esporas, para lo que se realizó una primer dilución 10^{-1} de la

suspensión de esporas cada cepa. Se tomaron 100 μ L de las diluciones y se colocaron por triplicado en cajas con PDA. Se observó la germinación de esporas a las 18 h obteniendo como resultado un 96% de viabilidad de esporas para B1, 98% para B9 y 99% para M1.

Una vez determinada la mortalidad de larvas con respecto al tiempo y encontrar resultados similares, se procedió a observar las larvas bajo el estereoscopio con el fin de determinar si había indicios de crecimiento del hongo a las 96 h post-inoculación. Los resultados fueron los siguientes:

Tratamiento \ Replica	Control	B1	B9	M1
Larva 1	×	<input type="checkbox"/>	✓	<input type="checkbox"/>
Larva 2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Larva 3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Larva 4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Larva 5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Tabla 7. Crecimiento de HE en larvas de *S. frugiperda*: ✓ Insecto con micelio; × Insecto sin micelio.

A las 96 h se observó crecimiento del hongo B9 en todas las larvas, siendo en la larva 2 y 4 en donde se observó un mayor crecimiento de hongo (Fig. 14). En el resto de larvas de B9 (Fig. 15) y en las larvas 1 y 2 de M1 (Fig. 16) el desarrollo del hongo fue moderado.

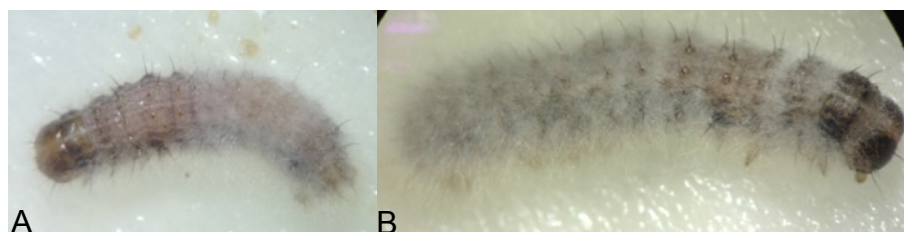


Figura 14. Larva 2 (A) y Larva 4 (B) de *S. frugiperda* inoculadas con el hongo B9. Se observa desarrollo de micelio.

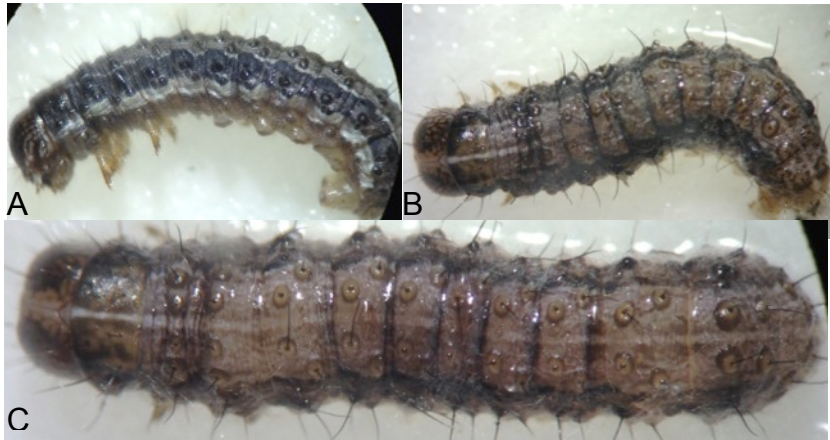


Figura 15. Larva 1 (A), Larva 3 (B) y Larva 5 (C) de *S. frugiperda* inoculadas con el hongo B9. Se observa desarrollo moderado de micelio.



Figura 16. Larva 1 (A) y Larva 2 (B) de *S. frugiperda* inoculadas con el hongo M1. Se observa desarrollo moderado de micelio.

Después del análisis de los resultados obtenidos, se decidió repetir los ensayos de virulencia con algunas diferencias en los ensayos con el fin de determinar DL_{50} y TL_{50} . Los ensayos realizados posteriormente consistieron en suministrar una concentración de 1×10^5 , 1×10^6 y 1×10^7 esporas mL^{-1} de la cepa B9, se emplearon 10 larvas de tercer ínstar por tratamiento incluido el tratamiento control, el cual consistió de suministrar Tween al 0.01%. A todas las larvas se les suministró dieta artificial. La razón de suministrar dieta fue considerando que las larvas en campo siempre se están alimentando, además de reducir la probabilidad de muerte por inanición, pues como se observó en el ensayo anterior, las larvas en los tratamientos control y con

hongos murieron todas al mismo tiempo y a ninguna se le había suministrado alimento.

Se realizó un primer ensayo con la cepa B9 bajo las características antes mencionadas y se observó que en ninguno de los casos las larvas murieron. Todas completaron el resto de estadios larvales pasando al estadio de pupa y posteriormente emergieron los adultos, por lo que se decidió repetir el ensayo de reactivación de cepas en insectos, para posteriormente resembrar las cepas nuevamente y después realizar la prueba de virulencia de la cepa aquí probada –B9– y las otras cepas faltantes.

Se realizó un ensayo de reactivación de las cepas B1 y B9, la cepa M1 no se pudo reactivar debido a la pérdida de la cepa en cajas Petri, por lo que se procedió a resembrar cajas con medio PDA a partir de hongo M1 procedente de insectos micosados de experimentos anteriores para que una vez desarrollado el hongo en caja, almacenar ejemplares de la cepa y con el resto reactivar la cepa en larvas.

El ensayo de reactivación de B1 y B9 consistió en cosechar todas las esporas posibles de una caja Petri por cepa y este hongo cosechado suspenderlo en una solución de Tween 0.01%, para posteriormente sumergir larvas de *S. frugiperda* en la suspensión de hongos y de esta forma inocular al hongo en el insecto. Se inocularon 10 larvas por cepa, de las cuales a la mitad se le suministró dieta artificial y al resto no se le suministró dieta con el fin de observar si ocurrían diferencias en la mortalidad y en la aparición de micosis, los resultados fueron los siguientes:

A los 5 días post inoculación se pudo observar que la cepa B1 ocasionó muerte y micosis a más insectos (Fig. 17) y en menos tiempo que B9 (Tabla 8).

Cepa \ Alimento	B1	B9
Sin dieta	Muerte y micosis 5 de 5	Muerte y micosis 5 de 5
Con dieta	Muerte 5 de 5; Micosis 2 de 5	Muerte 2 de 5; Micosis 1 de 5

Tabla 8. Mortalidad y micosis de larvas en ensayo de reactivación de cepas.



Figura 17. Larva micosada en ensayo de reactivación de cepas.

El resultado obtenido indica que la cepa B1 fue más eficiente en términos de mortalidad, cabe mencionar que en el campo las larvas están en constante alimentación, por lo tanto la condición de HE + alimento es importante, siendo la cepa B1 la que mostró mejores resultados. Sin embargo, B1 fue un hongo que desde el inóculo fue mejor en ciertos aspectos, pues había muchas esporas al momento de usarlo; B1 y B9 fueron sembradas al mismo tiempo. Sin embargo, B1 creció mejor y más rápido, además de haber matado y micosado al insecto mejor que B9. Por otro lado, la cepa B9 que a pesar de que en cantidad de esporas se encontraba en desventaja con B1 presentó un crecimiento no muy bueno, mostró resultados muy similares a B1, por lo tanto y con el fin de seleccionar a la mejor cepa, fue necesario realizar un ensayo de virulencia.

Se realizó una prueba de virulencia con la cepa B1 y B9, ambas cepas se llevaron a la concentración de 1×10^5 , 1×10^6 y 1×10^7 esporas mL^{-1} consistiendo estas tres concentraciones en tres tratamientos para determinar DL_{50} y TL_{50} y se aplicó un tratamiento control, el cual solo consistió en una solución Tween 0.01%, la cual fue la base para las suspensiones de hongos de los tratamientos antes mencionados. El ensayo consistió en suministrar dieta artificial a 10 larvas de tercer ínstar de *S. frugiperda* para posteriormente ser suministrados los tratamientos por inmersión. Las larvas se desinfectaron previamente con hipoclorito de sodio al 0.1% y un lavado a chorro de agua destilada estéril. Después de la aplicación de cada tratamiento las

larvas se individualizaron con dieta para su evaluación. El ensayo se mantuvo en observación y se registraron datos de mortalidad de larvas cada 24 h.

Durante 9 días el ensayo de virulencia no mostró efecto alguno de los hongos sobre las larvas. Hasta esta etapa del ensayo todas las larvas lograron sobrevivir, algunas alcanzaron a pupar y otras se encontraron en pre-pupa. Este resultado es similar al antes obtenido en el ensayo de virulencia de la cepa B9, donde se pensaba que la falta de mortalidad se debió a una falla en la conservación de los aislados de HE; sin embargo, este ensayo partió de una nueva reactivación de cepas y aun así no se pudo determinar mortalidad en ninguno de los casos, por lo que se decidió continuar con los ensayos de virulencia a partir de las siguientes consideraciones: 1. Los ensayos fueron realizados con larvas del tercer ínstar, a estas se les aplicaron los tratamientos con HE y se les suministró dieta artificial, sin embargo, la dieta contiene metil paraben como agente conservador por su acción antifúngica y el tratamiento de HE sobre la larva es de aplicación tópica, estos factores pueden ser determinantes para la posible inefectividad de los HE, pues el hábito del insecto es colocarse por encima y dentro de la dieta para alimentarse; por otro lado, 2. Al ir avanzando los estadios larvales de los insectos, la resistencia de estos a los agente de control incrementan, por lo tanto, se pueden realizar pruebas de virulencia en estadios larvales 1 y 2, con el fin de determinar cual es la cepa más virulenta, su DL_{50} y el TL_{50} .

Es importante resaltar que a pesar de que las cepas de hongos son entomopatógenas, como se demostró en los ensayos de reactivación de cepas, se deben realizar nuevos ensayos de virulencia con HE considerando las potenciales causas antes mencionadas. Se estima que el realizar las pruebas en estadios más tempranos puede ser favorable.

Por lo tanto, se realizó un ensayo con larvas de primer instar de GC siguiendo la metodología especificada para el objetivo 2. Se utilizaron las cepas de HE (B1, B9 y M1) con base a los resultados previamente obtenidos.

El ensayo de virulencia arrojó resultados favorables, mostrando una mortalidad de 100% en 3 de los tratamientos a las 48 h (Fig. 18) y que además mostraron ser estadísticamente iguales a otros 7 tratamientos. Los tratamientos de B1 1×10^6 , B9 1×10^8 y M1 1×10^8 esporas mL^{-1} causaron una mortalidad de 100% a las 48 h post inoculación; sin embargo, no mostraron diferencia estadística significativa con otros tratamientos, los cuales, a pesar de no alcanzar el 100% de mortalidad, lograron causar la muerte de larvas desde un 55.56% hasta 88.89%.

El hongo *M. anisopliae* es un hongo previamente reportado como agente de control para otros lepidópteros (Asi et al., 2013) y para *S. frugiperda* (Lezama et al., 2005; García et al., 2011), además de que el aislado M1 en experimentos previos ha demostrado tener un crecimiento radial eficiente aun cuando se han elevado las temperaturas de crecimiento (Ruelas et al., 2013), lo cual es de valiosa consideración, pues el método de formulación del hongo fue por secado por aspersión y fue expuesto a altas temperaturas por un corto periodo de tiempo. Además, es un hongo que por su naturaleza es fácil de manipular y se puede producir una gran cantidad de esporas en un periodo de 15 días (García et al., 2011). Por otro lado, el hongo *B. bassiana* en este experimento no alcanzó la esporulación completa a los 15 días, contrario a lo reportado por García et al. (2011) y se dificulta su manipulación por la adherencia que tienen al material empleado para cosechar las esporas. Por lo anterior, se empleó el tratamiento M1 1×10^8 esporas mL^{-1} , el cual causó una mortalidad de 100% a las 48 h.

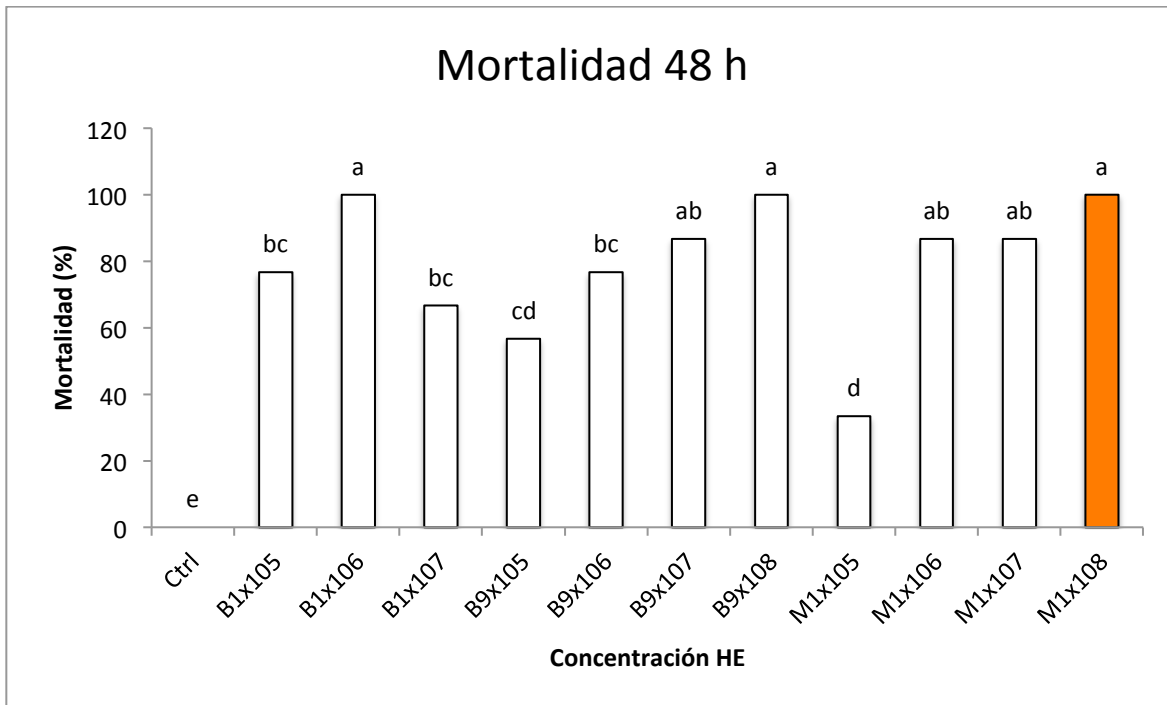


Figura 18. Mortalidad de larvas de *S. frugiperda* 48 h después de tratamiento con hongos entomopatógenos.

Formulación del HE sobresaliente

Una vez que el hongo fue evaluado pre-formulación, se llevó a cabo una microencapsulación por secado por aspersión del tratamiento 1×10^8 esporas mL^{-1} , seleccionando del bioensayo de virulencia de hongos entomopatógenos.

Del proceso de secado, el resultado fue un producto húmedo y pegajoso (Fig. 19), es decir, un secado ineficiente. Esto se ha reportado por Largo et al. (2015), quienes han reportado que el proceso de secado por aspersión puede producir productos pegajosos, lo cual puede generar adherencia de partículas en la pared interna de la cámara de secado, creando aglomeraciones y un bajo rendimiento del producto final.

Lo anterior, pudo deberse al uso de gelatina bovina, pues como sugieren (Madene et al., 2006), las proteínas proporcionan viscosidad a la mezcla. Por otro lado, una alternativa a esto podría ser la utilización de carbohidratos, como la maltodextrina, la

cual reduce la viscosidad y aumenta la solubulidad de la mezcla (Guevara y Jimenez, 2008).



Figura 19. Producto de secado por aspersion del hongo *M. anisopliae*.

En el caso de la viabilidad de esporas, se pudo observar que se redujo drasticamente la germinación de esporas despues del tratamiento por el secado por aspersion (Fig. 20). Lo anterior pudo deberse a que se llevó a cabo un secado a una temperatura de entrada muy alta (130 °C), lo que puede causar una baja viabilidad en conidios (Jin y Custis, 2011)

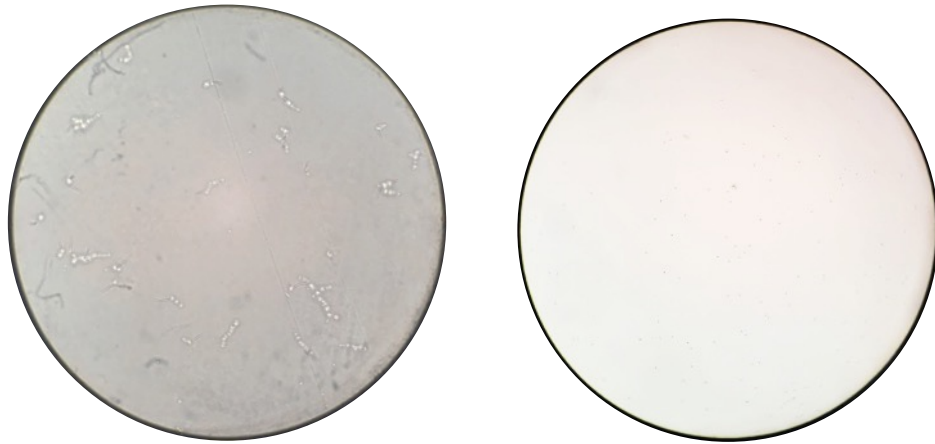


Figura 20. Esporas de *M. anisopliae* antes y después de formulación por secado por aspersión. (Izquierda) esporas pre-formulación germinadas 18 h después de incubación a 28°C en medio PDA. (Derecha) esporas post-formulación sin germinar 18 h después de incubación a 28 °C en medio PDA.

Evaluación de la efectividad de la formulación de HE en laboratorio

La evaluación del hongo formulado no se pudo llevar a cabo debido a la pérdida de viabilidad de esporas en el proceso de secado por aspersión

DISCUSIONES INTEGRADORAS

En el presente trabajo se aislaron dos poblaciones de nemátodos entomopatógenos en el valle agrícola de Guasave. De acuerdo a los resultados de caracterización molecular, uno de los NE corresponde a la especie *Rhabditis blumi* con un 83% de identidad, confirmando la presencia de esta especie en la región (Vázquez, 2012). Según sus características morfológicas, como la ubicación de una espícula en la parte posterior, longitud media (1.09 mm) y la longitud del esófago (189 μ m) de los machos; y hembras con una longitud media de 1.17 mm, un esófago de 243 μ m, con una vulva en el centro del cuerpo, además de presentar el fenómeno de endotoquia matricida son indicadores de que este aislado pertenece al género *Rhabditis* (Carta and Osbrink, 2005).

Por otro lado, se encontró que el segundo aislado correspondió a la especie *Acrobelloides camberenensis* con un 91% de identidad según la caracterización molecular. Los promedios de longitud (1.19 mm), esófago (226 μ m) y espícula en machos, más la longitud (1.17 mm), esófago (238 μ m) y una vulva ubicada en el 70% de la longitud total de la hembra confirma que el aislado corresponde al género *Acrobelloides* (Holovachov *et al.*, 2009).

R. blumi había sido antes reportado como agente entomopatógeno de otros lepidópteros por Park *et al.* (2012), mostrando mayor efectividad al causar mortalidades de 78 al 94% en *Plutella xylostella*. Este insecto mostró ser muy susceptible en dicha evaluación, lo cual no corresponde a lo encontrado en este estudio, ya que *R. blumi* no fue capaz de controlar efectivamente a larvas de tercer instar de *S. frugiperda* a los tiempos y dosis evaluadas (10, 250 y 500 JI/mL durante 7 días). Lo que también contrasta con lo reportado por Vázquez (2012), quién encontró que *R. blumi* causó un 93 % de mortalidad de larvas de tercer instar de *S. frugiperda* a las 48 h. Estas diferencias se atribuyen a lo reportado por Cimen *et al.* (2016), quienes mencionan que los nemátodos tienen una variación en el rango de hospederos y en infectividad. Así mismo, Shapiro y McCoy (2000) señalan que un factor crítico es la selección del aislado o la especie apropiada de NE para que ocurra un control exitoso sobre insecto blanco.

Acrobelloides camberenensis no ha sido reportado como un organismo entomopatógeno, sino como un nemátodo de vida libre (De Ley *et al.*, 1999), sin embargo en este estudio logró causar un 13.3, 3.3 y 10 % de mortalidad de larvas a los 7 días post inoculación (a dosis de 100, 250 y 500 JI/mL respectivamente) en larvas de tercer ínstar de *S. frugiperda*, la cual no fue significativa para considerar a este nemátodo como un agente de control con potencial bioisnecticida para el control del gusano cogollero. Anteriormente se ha reportado un fenómeno similar, sugiriendo que ocurre una competencia entre nemátodos entomopatógenos y nemátodos de vida libre. Campos *et al.* (2012) evaluó al nemátodo entomopatógeno *Rhabditis rainai* y el nemátodo de vida libre *Acrobelloides máximum*, donde este último logró causar mortalidad en larvas del coleóptero *Diaprepes abbreviatus*, siendo *A. máximum* el causante de la mortalidad mas elevada en este insecto plaga. Lo anterior sustenta que el nemátodo *A. camberenensis* encontrado en nuestro trabajo, ya que pertenece al mismo género que la especie reportada por Campos *et al.* (2012) haya tenido la capacidad de causar mortalidad en larvas de *S. frugiperda* aun tratándose de un nemátodo de vida libre.

Por otro lado, el NE *S. riobrave* causó mortalidades sobresalientes en todos los tiempos y dosis evaluadas, por lo que se seleccionó como el NE más virulento. Lo anterior confirma la efectividad de *S. riobrave*, que había sido demostrada con anterioridad en otros trabajos (Molina *et al.*, 1996; Shapiro and McCoy, 2000; Shapiro and Mizell, 2012).

El hongo *M. anisopliae* (M1) fue determinado como el HE más virulento debido a que causó mortalidad de 100% a las 48h post inoculación en larvas neonatas de *S. frugiperda*, lo que contrasta con lo reportado por Padilla (2017), quien encontró que la cepa M1 logró causar mortalidad de 90% hasta las 96 h en larvas de tercer instar de *Heliothis virescens*. Sin embargo, esta diferencia se puede atribuir a que en el presente estudio se utilizaron larvas de primer ínstar, ya que conforme la larva va desarrollándose, pasando de un instar a otro, va adquiriendo resistencia, siendo cada vez, menos susceptible a agentes patógenos (Fuxa *et al.* (1998).

Respecto a la evaluación combinada de hongo y nemátodo entomopatógeno, se encontró que el hongo logró causar 13 % de mortalidad de larvas a las 96 h post aplicación. Este resultado contrasta con lo encontrado en el bioensayo de virulencia de HE, sin embargo, en el ensayo de aplicación combinada se usaron larvas del tercer ínstar, las cuales, según Fuxa et al (1998) podrían ser más resistentes al hongo entomopatógeno que las larvas de primer instar empleadas en el ensayo de virulencia en este mismo estudio. A su vez, el nemátodo *S. riobrave* causó una mortalidad del 36%, 80%, 97% y 97% a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h, respectivamente. La mortalidad causada en el presente estudio resultó ser superior a la reportada por Molina et al. (1996), quienes lograron obtener mortalidades de 6.7, 68.2, 72.9, 77.7 y 79.3 % a las 24, 48, 72, 96 y 120 h respectivamente sobre larvas de tercer ínstar de *S. frugiperda*.

En la aplicación combinada se tuvo una mortalidad similar a la del nemátodo en aplicación simple, causando 33%, 83% y 100% de mortalidad a las 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente. Los anterior se atribuye al nemátodo *S. riobrave*, ya que se observó que el hongo no fue capaz de desarrollar micosis y causar la momificación de larvas de *S. frugiperda* del tercer ínstar.

Lo anterior ha sido previamente reportado por Lezama et al. (1996), Molina et al. (2007), Ansari et al. (2008), Tarasco et al. (2011) y Ruiz-Vega et al. (2017), donde el nemátodo entomopatógeno fue el principal agente causal de mortalidad de insectos. Koppenhofer y Grewal (2005) y Ruiz-Vega et al. (2017) sugieren que este fenómeno se debe a que la efectividad del nemátodo difícilmente puede mejorarse aun siendo combinado con otro agente de control. Molina et al. (2007) y Tarasco et al. (2011) mencionan que esto se debe a que el nemátodo coloniza al insecto dentro de las primeras 24 h, liberando a la bacteria simbiote, la cual limita el desarrollo del hongo mediante la síntesis de metabolitos secundarios de actividad microbiana. Así mismo, Lezama et al., (1996) sugiere que ocurre un efecto antagonista de parte del nemátodo, donde éste interfiere en la capacidad de infección del hongo.

Sin embargo, otros autores reportan sinergismo entre hongos y nemátodos entomopatógenos cuando los nemátodos fueron suministrados posteriormente a los

hongos. Sugiriendo que la infección de parte del hongo causa un estrés sobre la larva, inhibiendo sus hábitos alimenticios, y de este modo, incrementando la emisión de CO₂ facilitando al nemátodo ubicar al hospedero (Ansari et al., 2004; 2008).

Por otro lado, la formulación del hongo resultó en un producto de secado ineficiente y una baja viabilidad de esporas post formulación. Largo *et al.* (2015) reportaron resultados similares, al obtener un producto húmedo debido a aglomeraciones de material causada por el contenido de materiales que generaron adherencia en la cámara de secado. También, la baja viabilidad de esporas post formulación obtenida concuerda con lo mencionado por Jin y Custis (2011), quienes atribuyen este resultado a las altas temperaturas de entrada en el secador por aspersion, lo que corresponde a un parámetro empleado en este estudio, donde se trabajó con una temperatura de entrada de 130 °C.

En relación a la formulación del nemátodo, los pellets elaborados con el mayor contenido de barro (85 %) mostraron ser más consistentes al no fragmentarse con la manipulación. Además, se logró observar supervivencia de nemátodos una semana post formulación, en el pellet con las proporciones 85 % barro, 10 % ceniza y 5 % tierra de diatomeas. Los resultados de supervivencia de nemátodos y de estabilidad del pellet formulado se atribuye a la proporción de barro usada, ya que éste funciona como una puzolana natural y además, reduce la tasa de deshidratación del pellet (Kuwatra and Ripke, 2003), lo cuál se traduce en una condición no estresante para el nemátodo. Cortés et al. (2016) reportaron resultados similares a los de este trabajo, observando supervivencia del nemátodo *Steinernema glaseri* 8 días post formulación, lo cuál fue atribuido a la capacidad de retención de la humedad en el pellet, lo que a su vez, fue considerado como un factor determinante para mejorar la estabilidad de almacenamiento.

CONCLUSIONES GENERALES

Dos poblaciones de nemátodos entomopatógenos, pertenecientes a la misma comunidad del valle agrícola del municipio de Guasave fueron aisladas e identificadas como *Rhabditis blumi* y *Acrobeloides camberenensis* con un 83 y 91 % de certeza respectivamente.

Los nemátodos *Rhabditis blumi* y *Acrobeloides camberenensis* demostraron ser patogénicos sobre larvas de *S. frugiperda*. Cabe resaltar que *A. camberenensis* no había sido previamente reportado como agente causal de muerte de insectos, menos específicamente de *S. frugiperda*. Sin embargo, los NE nativos no mostraron efectos significativos en la mortalidad de larvas de tercer ínstar de *S. frugiperda* a dosis de 100, 250 y 500 JI/mL en los 7 días de la evaluación de este estudio. Sin embargo, no se descartan como posibles agentes de control de otros insectos.

Por otro lado, el nematodo *S. riobrave*, en todas las dosis evaluadas (100, 250 y 500 JI/mL) tuvo virulencia superior a el resto de los tratamientos con los nemátodos nativos, los cuales no mostraron diferencia significativa respecto al control en ninguna etapa del experimento. De este modo, se confirmó la efectividad de *S. riobrave* como agente de control de *S. frugiperda*, y la concentración de nematodos que se sugiere para futuras formulaciones y ensayos es la de 250 JI/mL, esto debido a la efectividad mostrada en todos los tiempos de evaluación.

El hongo más virulento fue *Metarhizium anisopliae* (cepa M1) causando el 100 % de mortalidad de larvas de primer instar de *S. frugiperda* en 48 h.

El hongo *M. anisopliae* y el nemátodo *S. riobrave* se usaron de manera combinada para infectar larvas de *S. frugiperda*, teniendo como resultado que en la aplicación simultánea de ambos organismos entomopatógenos, es el nemátodo el principal agente de control. Aunque no se pudo observar un efecto de sinergismo entre organismos de control, se propone seguir trabajando con la combinación de estos organismos y se sugiere que el hongo entomopatógeno puede infectar los primeros instares de desarrollo del insecto, el cual ha sido demostrado es más susceptible,

para que posteriormente el nemátodo pueda atacar a las larvas que sobrevivan al ataque del hongo.

El hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (M1) a una concentración de 1×10^8 esporas mL^{-1} fue encapsulado por el método de secado por aspersión. Sin embargo, se observó que los conidios perdieron viabilidad después del proceso del secado por aspersión al no haber germinado a las 18 h post inoculación en PDA a 28 °C, por lo que no se llevaron a cabo los ensayos de patogenicidad post formulación.

En relación a la pelletización, el tratamiento con proporciones de 85, 10 y 5 % de barro, ceniza y tierra de diatomeas respectivamente fue el que logró la mejor estabilidad de pellet. Además en estas proporciones se logró obtener una supervivencia de *S. riobrave* de una semana post formulación. Sin embargo, la evaluación de patogenicidad de los nemátodos pelletizados no resultó favorable, al no haber causado muerte en larvas de *S. frugiperda*, lo que sugiere que la infectividad de los nemátodos se vio afectada, por lo que es necesario evaluar diferentes proporciones de materiales y/o diferentes ingredientes para mejorar la supervivencia y la viabilidad de los nemátodos.

LITERATURA CONSULTADA

- Acosta, V.J. A. (2006). *Evaluación de hongos entomopatógenos como controladores biológicos de *Scutigerella immaculata** (tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Acuña, J. M., Rosas, G. N. M., López, M. M., Mundo, O. M. y García, G. C. (2015). Formulación de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin con polímeros biodegradables y su virulencia contra *Heliothis virescens* (Fabricius). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 31(3) 219-226.
- Agarwal, R., Choudhary, A., Tripathi, N., Patil, S., Agnihotri, S. y Bharti, D. (2012). Biopesticidal formulation of *Metarhizium anisopliae* effective against larvae of *Helicoverpa armigera*. *International Journal of Agricultural and Food Science*, 2(2), 32.36.
- Andaló, V., Santos, V., Furtado, M.G., Costa, M.C. y Moino, J.A. (2010). Evaluation of entomopathogenic nematodes under laboratory and greenhouses conditions for the control of *Spodoptera frugiperda*. *Ciencia Rural*, 49(9), 1860-1866.
- Ansari, M. A., Tirry, L. y Moens, M. (2004). Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for control of *Hoplia philanthis*. *Biological Control*, 31: 172–180.
- Ansari, M.A., Shah, F.A., Tirry, L. y Moens, M. (2006). Field trials against *Hoplia philanthis* (Coleoptera: Scarabaeidae) with a combination of an entomopathogenic nematode and the fungus *Metarhizium anisopliae* CLO 53. *Biological Control*, 39: 453–459
- Ansari, M. A., Shah, F.A. y Butt, T.M. (2008). Combined use of entomopathogenic nematodes and *Metarhizium anisopliae* as a new approach for black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*, control. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 129: 340–34.
- Archuleta, T. A. (2012). *Caracterización morfológica y molecular de *Beauveria* (Balsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metsh) Sorokin de suelos cultivados y no*

impactados en el norte de Sinaloa (tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional. Guasave, Sinaloa, México.

Asi, M.R., Bashir, M.H., Afzal, M., Zia, K. y Akram, M. (2013). Potential of entomopathogenic fungi for biocontrol of *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera:Noctuidae). *Journal of Animal and plant sciences*, 23(3), 913-918.

Bazán, T. M. (2002). *Efecto de Metarhizium anisopliae (Deuteromycotina: Hyphomycetes) en el control biológico de Boophilus microplus Canestrini (Acari: Ixodidae) en ganado bovino estabulado* (tesis de maestría). Universidad de Colima. Tecomán, Colima, México.

Bedding, R.A. y Akhurst, R.J. (1975). A simple technique for the detection of insect parasitic nematodes in soil. *Nematologica*, 21(1),109-110.

Benítez, C. (2006). El maíz: origen, composición química y morfología, *Materiales avanzados*, 7, 15-20.

Blanco, C. A., G. Pellegaud, U. Nava-Camberos, D. Lugo-Barrera, P. Vega-Aquino, J. Coello, A. P. Teran-Vargas, and J. Vargas-Camplis. 2014. Maize pest in Mexico and challenges for the adoption of integrated pest management programs. *J. Integ. Pest Mngmt.* 5: 1-9.

Blond, C. (2012). *Aspects of the ecology and population dynamics of the fungus Beauveria bassiana strain F418 in soil* (tesis de doctorado). Universidad de Lincoln, Canterbury, Nueva Zelanda.

Bustamante, E. L. V. (2016). *Estabilización de la matriz granular para alojar nemátodos entomopatógenos (Steinernema glaseri)* (tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, Oaxaca, México.

Butt, T.M., Jackson, C.W., Magan, N. (2002). Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential. *Plant Pathology*, 51, 518–521.

- Caccia, M.G., Del Valle, E., Doucet, M.E. y Lax, P. 2014. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* and *Helicoverpa gelotopoeon* (Lepidoptera: Noctuidae) to the entomopathogenic nematode *Steinernema diaprepesi* (Rhabditida: Steinernematidae) under laboratory conditions. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 74(1), 123-126.
- Campos, H.R., El, B.F.E., Dunca,, L.W. 2012. Wide interguild relationships among entomopathogenic and free-living nematodes in soil as measured by real time qPCR . *Journal of Invertebrate Pathology* 111 (2012) 126–135.
- Capinera, J. L. (1999). *Fall armyworm*. University of Florida. Recuperado de http://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/fall_armyworm.htm
- Capinera, J. L. (2008). *Encyclopedia of entomology*. Gainesville, USA: Springer Science Business Media B.V.,.
- Carta, K. L., y Osbrink, W., (2005). *Rhabditis rainai* n. sp. (Nematoda: Rhabditida) associated with the formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Nematology*, 7(6), 861-879.
- Cañedo, V. y Ames, T. (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa.
- CESAVEG. (2012). *Manual de plagas y enfermedades del Maíz. Campaña Manejo Fitosanitario de Maíz*. Recuperado de http://www.cesaveg.org.mx/2012/folleto/folleto_12/manual_maiz.pdf.
- Céspedes, Y., del Pozo, E., García, I. y Méndez, A. (2008). Efecto de la temperatura sobre el hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson y su efectividad sobre *Spodoptera frugiperda* J. E. SMITH. *Revista de Protección Vegetal*, 23(3), 176-182.
- Cimen, H., Puza, V., Nermet, J., Hatting, J., Ramakuwela, T., Hazir, S. 2016. *Steinernema biddulphi* n. sp., a New Entomopathogenic Nematode (Nematoda: Steinernematidae) from South Africa. *Journal of Nematology* 48(3):148–158. 2016.
- Chernaki-Leffer, A.F., Sosa-Gómez, D.R. y Almeida, L.M. (2007). Selection for Entomopathogenic Fungi and LD₅₀ of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. for the

Lesser Mealworm *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Brazilian Journal of Poultry Science*, 9(3), 187-191.

Cortés, M. C. I., Ruiz, V. J., Matadamas, O. P. T., Lewis, E.E., Aquino, B. T. y Navarro, A. J. (2016). Effect of moisture evaporation from diatomaceous earth pellets on storage stability of *Steinernema glaseri*. *Biocontrol science and technology*, 26(3), 305-319.

Cortez, M. E., Valenzuela, E. F. A., González, C. V. M. Leal, L. , V. M. y Grivel, C. M. M. (2011). Efectividad de insecticidas novedosos al 100% y 50% de la dosis sobre gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) en maíz. *Entomología Mexicana*, 10(1), 488-492.

CIMMYT. (2004). *Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo* (Cuarta edición). Recuperado de <https://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/715/25905.pdf>.

De Ley, P., Tandingan, D. L., Morris, K., Abebe, E., Mundo, O. M., Yoder, M., Heras, J., Waumann, D., Rocha, O. A., Jay Burr, A. H., Baldwin, J. G. y Kelley, T. (2005). An integrated approach to and informative morphological vouchering of nematodes for applications in molecular barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 360 1945-1958.

Divya, K., Sankar, M., Marulasiddesha, K.N., Sambashiv, R. y Krupanidhi, K. (2011). Formulation technology of entomopathogenic nematode for the control of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Bioscience Discovery*, 2(2),174-180.

Espinoza, L. (2003). *Patogenicidad de Beauveria bassiana (Bálsamo) Vuillemin., sobre la termita subterránea Reticulitermes destructor Myles (Isoptera: Rhinotermitidae)* (tesis de pregrado). Universidad Autonoma Chapingo. Estado de México, México.

FAO. (1993). *El maíz en la nutrición humana*. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/t0395s/T0395S00.htm#Contents>

FAO. (2002). *Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030*. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/004/y3557s/y3557s00.htm>

- FAO. (2014). *Máximo histórico en la importación de maíz en México*. Disponible en: <http://www.fao.org/agronoticias/agro-noticias/detalle/es/c/212224/>
- FAOSTAT. (2014). Producción por cultivos. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/S>
- Fernández, C., Medrano, H. y Solís, A. (2001). Efecto de las condiciones de operación del secado por aspersión sobre la viabilidad de las blastosporas de *Beauveria bassiana*. *IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería XIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica II Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica*. Veracruz, México.
- Fuxa, J. R., A. R. Richter, and F. A. Silva. 1998. Effect of host age and nematode strain on susceptibility of *Spodoptera frugiperda* to *Steinernema feltiae*. *J. Nematol.* 20: 91-95.
- García, A. (2006). *Formulación de bioinsecticidas a base de nemátodos entomopatógenos* (tesis de pregrado). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo, México.
- García, G.C., González, M.M.B y Bautista, M.N. (2011). Pathogenicity of isolates of entomopathogenic fungi against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 37(2), 217-222.
- Girón, S. (2008). *Evaluación de dos formulaciones de nemátodos entomopatógenos para el control de gallina ciega (Phylophaga vetula) en maíz* (tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, Oaxaca, México.
- Guevara, B. N. A. y Jimenez, M. T. (2008). Encapsulación: técnicas y aplicaciones en la industria alimentaria. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 2, 36-49.
- Grewal, P.S., De Nardo, E. y Aguilera, M. (2001). Entomopathogenic Nematodes: Potential For Exploration and Use in South America. *Neotropical Entomology*, 30(2), 191-205.

- Hernández, D., Ferrer, F. y Linares, B. (1989). Introducción de *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae) para controlar *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en Yaritagua, Venezuela. *Agronomía tropical*, 39(1-3), 45-61.
- Holovachov, O., De Ley, I.T., Mundo-Ocampo, M., & De Ley, P. 2009. Identification of Cephaloboidea (Nematoda). EUMAINE, Gent and Nematology, UC Riverside. 86 pp.
- Jin, X. y Custis, D. (2011). Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures. *Biological Control*, 56, 202–208.
- Kaya, H. K. y Stock, S. P. (1997) Techniques in insect nematology. Manual of Techniques in Insect Pathology (ed. by LA Lacey), pp. 281–324. Academic Press, London, UK.
- Koppenhöfer, A. y Grewal, P. (2005). Nematodes as biocontrol agents. Entomology and nematology. In: Grewal PS, Ehlers R, Shapiro-Ilan DI (eds) Compatibility and interactions with agochemicals and other biocontrol agents, Chapter 20. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK, pp 363–381.
- Kuwatra, S. K. y Ripke, S. J. (2003). Laboratory studies for improving green ball strength in bentonite-bonded magnetite concentrate pellets. *International journal of mineral processing*, 72, 429-441.
- Largo, A. E., Cortés, R. M. y Ciro, V., H. J. (2015). Influence of Maltodextrin and Spray Drying Process Conditions on Sugarcane Juice Powder Quality. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 68(1), 7509-7520.
- León, G. I., Rodríguez, L. E., Ortega, A. L. D. y Solís, A. J. F. (2012). Susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae) a insecticidas asociada a césped en Quintana Roo, México. *Agrociencia*, 46, 279-287.
- Lezama-Gutierrez, R., Alatorre-Rosas, R., Arenas-Vargas, M., Bojalil-Jaber, L.F., Molina-Ochoa, J., Gonzalez, Ramirez, M. y Rebolledo-Dominguez, O. (1996). Dual infection of *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA:NOCTUIDAE) by the fungus *Nomuraea rileyi* (DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES) and the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE). *Vedalia*, 3: 41.44.

- Leyva-Hernández, H. A., García-Gutiérrez, C., Ruíz-Vega, J., Calderón-Vázquez, C. L., Luna-González, A. y García-Salas, S. (2018). Evaluación de la Virulencia de *Steinernema riobrave* y *Rhabditis blumi* contra Larvas del Tercer Instar de *Spodoptera frugiperda*. *Southwestern Entomologist*, 43(1):189-197.
- Lezama, R., Molina, J., López, M., Pescador, A., Galindo, E., Ángel, C.A. y Michel, A.C. (2005). Efecto del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* sobre el control del gusano cogollero del maíz en campo. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 9(1), 27-32.
- López, M.A. (2012). *Patogenicidad y Virulencia de los Virus de la Poliedrosis Nuclear (SfMVPN y HzSVPN) en el control del gusano cogollero Spodoptera frugiperda (Smith) y gusano elotero del maíz Helicoverpa zea (Boddie) en Guasave, Sinaloa* (tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, Guasave, Sinaloa, México.
- Mahr, D. L., Whitaker, P., Ridgway, N.M. (2008). *Biological Control of Insects and Mites: An Introduction to Beneficial Natural Enemies and Their Use in Pest Management*. Recuperado de <https://learningstore.uwex.edu/Assets/pdfs/A3842.pdf>.
- Madene, A., Jacquot, M., Shcer, J. y Desobry, S. 2006. Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1–21.
- Matadamas, O. P. T., Ruiz, V. J., Vazquez, F. J. A., Cruz, M. H. y Cortés, M. C. I. (2014). Mechanical production of pellets for the application of entomopathogenic nematodes: factors that determine survival time of *Steinernema glaseri*. *Biocontrol Science and Technology*. Vol. 24, No. 2, 145–157
- Mendoza, M. (2012). *Efecto de la dureza del pellet en la mortalidad del nemátodo entomopatógeno Steinernema glaseri encapsulado mecánicamente* (tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, Oaxaca, México.

- Miles, C., Blethen, C., Gaugler, R., Shapiro-Ilan, D., Murray, Todd. (2012). *Using Entomopathogenic Nematodes for Crop Insect Pest Control*. Recuperado de <http://cru.cahe.wsu.edu/CEPublications/PNW544/PNW544.pdf>.
- Mohammadbeigi, A. y Port, G. (2015). Effect of Infection by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the Feeding of *Uvarovistia zebra*. *Journal of insect science*, 15, 1-4.
- Molina, O.J., Hamm, J.J., Lezama, G.R., Bojalil, J.L.F., Arenas, V.M. y Gonzalez, R.M. (1996). Virulence of six entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) on immature stages of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Vedalia*, 3, 25-29.
- Murúa, M., Virla, E. G. y Defago, V. (2003). Evaluación de cuatro dietas artificiales para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides. *Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas*, 29, 43-51.
- Nava, P. E., García, G. C., Camacho, B. J. R. y Vázquez, M. E. L. (2012). Bioplaguicidas: Una opción para el control biológico de plagas. *Ximhai*, 8(3), 17-29.
- Ortega, C. A. 1987. *Insect Pests of Maize: A Guide for Field Identification*. CIMMYT, Mexico, D. F.
- Padilla, M. Y. 2017. *Evaluación de un bioinsecticida microencapsulado a base de Hongos Entomopatógenos aislados en Sinaloa para el control de Heliothis virescens (Fabricius)* (tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, Guasave, Sinaloa, México.
- Paliwal, R. L., Granados, G., Lafitte, H. R. y Violic, A.D. 2001. *El maíz en los trópicos, mejoramiento producción*. Recuperado de <https://curlacavunah.files.wordpress.com/2010/04/el-maiz-en-los-tropicos.pdf>.
- Park, H.W., Kim, H.H., Youn, S.H., Shin, T.S., Bilgrami, A.L., Cho, M.R. y Shin, C.S. (2012). Biological control potentials of insect-parasitic nematode *Rhabditis blumi* (Nematoda:

Rhabditida) for major cruciferous vegetable insect pests. *Applied Entomology and Zoology*, 47(4), 389-397.

Pavone, D., Díaz, M. y Trujillo, L., Dorta, B. (2009). A granular formulation of *Nomuraea rileyi* Farlow (Samson) for the control of *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). *Interciencia*, 34(2): 130-134.

Pereira, R. M. y Roberts, D. W. (1990). Dry Mycelium Preparations of Entomopathogenic Fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Journal of invertebrate pathology*, 56, 39-46.

PIONEER. (2015). *Maíz Crecimiento y desarrollo*. Recuperado de https://www.pioneer.com/CMRoot/International/Latin_America_Central/Chile/Servicios/Informacion_tecnica/Corn_Growth_and_Development_Spanish_Version.pdf

Plessis, J.D. (2003). *Maize production*. Recuperado de <http://www.arc.agric.za/arc-gci/Fact%20Sheets%20Library/Maize%20Production.pdf>.

Poinar, G. O. (1979). *Nematodes for biological control of insects*. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G., Luangsa-ard, J.J., Devotto, L. y Humber, R.A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103(5), 1055–1073.

Rodríguez, M., Hernández, O. D. y Gómez, L. (2012). Nemátodos entomopatógenos: elementos del desarrollo histórico y retos para su consolidación como biorreguladores en la agricultura en Cuba. *Revista Protección Vegetal*, 27(3), 137-146.

Rosas, G. N. M., Arévalo, N. J., Galán, W. L. J. y Morales, R. L. H. (2004). Evaluation of feeding stimulants combined with polymers to develop formulations against *Diatrea saccharalis* (F). *Southwestern Entomologist*, 29(2), 153-158.

- Ruelas, A. R. D., García, G. C. Y Archuleta, T. A. (2013). Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Isolates Tolerant to High Temperatures for the Control of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Southwestern Entomologist*, 38(2), 312-324.
- Ruiz, N. R. E., Ruiz, E. R. A., Sanches, Y. J. M., Molina, O. J., Skoda, S.R., Coutiño, R. R., Pinto, R. R., Guevara, H. F. y Foster, J.E. (2013). Occurrence of entomopathogenic fungi and parasitic nematodes on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae) larvae collected in central Chiapas, México. *Florida Entomologist*, 96(2), 498-503.
- SAGARPA. (2010). *Problemas fitosanitarios (10 OATs)*. Recuperado de http://2006-2012.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/potencialproductivo/especificos/problemas_fitosanitarios_3.pdf
- SAGARPA. (2014). *Maíz grano*. Recuperado de <http://www.siap.gob.mx/maiz-grano/>
- SENASICA. (2009). *Programa de trabajo de la campaña Manejo Fitosanitario de Maíz, a operar con recursos del componente Sanidad e Inocuidad del Programa de Soporte, 2009*. Recuperado de www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?idDocumento=11683&idurl=16564
- SENASICA. (2014). *Manejo de insectos infectados por hongos*. Recuperado de <http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=26729&IdUrl=67284&down=true>
- Seye, F., Ndiaye, M., Faye, O. y Afoutou, J. M. (2012). Evaluation of Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* Formulated with Suneem (Neem Oil) against *Anopheles gambiae* s.l. and *Culex quinquefasciatus* Adults. *Malaria Chemotherapy, Control & Elimination*, 1, 1-6.
- Shapiro, D.I. y McCoy, C.W. (2000). Effects of Culture Method and Formulation on the Virulence of *Steinernema riobrave* (Rhabditida: Steinernematidae) to *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Nematology*, 32(3), 281–288.
- Shapiro, D.I. y Mizell III, R.F. (2012). Laboratory virulence of entomopathogenic nematodes

to two ornamental plant pests, *Corythucha ciliata* (Hemiptera:Tingidae) and *Stethobaris nemesis* (Coleoptera:Curculionidae). *Florida entomologist*, 95(4), 922-927.

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2016. Anuario estadístico de la producción agrícola. http://nube.siap.gob.mx/cierre_agricola/ (Consulta 17 Noviembre 2017).

SIAP-SAGARPA. (2014). Cierre de la producción agrícola por cultivo. Recuperado de <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>

Tanada, Y., Kaya, K.H. 1993. Insect pathology. Academic Press Inc. California, USA, pp. 318-387.

Tarasco, E., Alvarez, C., Triggian, O. y Quesada, E. (2011). Laboratory studies on the competition for insect haemocoel between *Beauveria bassiana* and *Steinernema ichnusae* recovered in the same ecological niche. *Biocontrol Science and Technology*, 21(6):693–704.

Valdez, J.B., Soto, F. y Osuna, T. (2012). Modelos de predicción fenológica para maíz blanco (*Zea mays* L.) y gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* J. E. Smith). *Agrociencia*, 46(4), 399-410.

Vázquez, E. L. (2012). *Caracterización de nemátodos entomopatógenos aislados del Valle de Guasave, Sinaloa, México* (tesis de maestría), Instituto Politécnico Nacional. Guasave, Sinaloa, México.

Villa, C. M. M. y Catalán, V. E. A. (2004). Determinación de estadios larvales de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae) para la construcción de un modelo de predicción. *Folia Entomológica Mexicana*, 43(3), 307-312

Webster, J. y Weber, R. (2007). *Introduction to fungi*. Nueva York, Estados Unidos de Norte America: Cambridge University Press.

White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66: 302-303.

Woodring, J. L. y Kaya, H. K., 1988. *Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: a handbook of techniques. Southern Cooperative Series Bulletin 331*. Fayetteville, Arkansas: Agricultural Experiment Station.

Yañez, J., Salazar, J.A., Chaires, L., Jimenez, J., Marquez, M. y Ramos, E.G. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y perspectiva*, 21, 24-30.

Yu, S. J. 1983. Age variation insecticide susceptibility and detoxification capacity of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *J. Econ. Entomol.* 76: 219-222.