



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS  
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**INTERACCIÓN DE LOS HONGOS  
ENTOMOPATÓGENOS *Beauveria bassiana* Y  
*Metarhizium anisopliae* CON INSECTICIDAS EN  
LARVAS DE *Spodoptera frugiperda***

MARIBEL RIVERO BORJA

T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

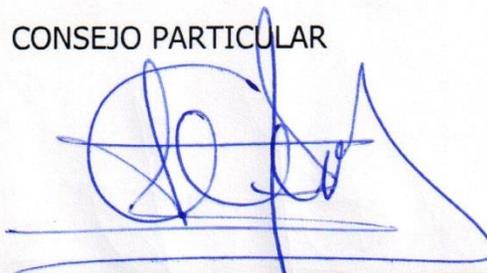
2015

La presente tesis titulada: **INTERACCIÓN DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS *Beauveria bassiana* Y *Metarhizium anisopliae* CON INSECTICIDAS EN LARVAS DE *Spodoptera frugiperda*** realizada por la alumna: **Maribel Rivero Borja**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



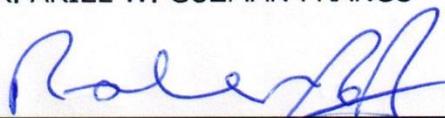
DR. ALEJANDRO PÉREZ PANDURO

ASESOR



DR. ARIEL W. GUZMÁN FRANCO

ASESOR



DR. ESTEBAN RODRÍGUEZ LEYVA

ASESOR



DR. CANDELARIO SANTILLÁN ORTEGA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Febrero de 2015

## ***Metarhizium anisopliae* CON INSECTICIDAS EN LARVAS DE *Spodoptera frugiperda***

Maribel Rivero Borja, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2015

Con intención de mejorar el control de *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero) se probaron combinaciones de insecticidas con hongos sobre larvas de tercer ínstar de esa plaga. Se usaron combinaciones de las CL<sub>50</sub> de clorpirifós etil y spinosad (0.24 y 0.025 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente) con suspensiones de esporas de aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bb88) y *Metarhizium anisopliae* (ETL) (1x10<sup>8</sup> esporas mL<sup>-1</sup>) en tres secuencias de aplicación: hongo seguido (a las 24 h) de insecticida; hongo simultáneo con insecticida e insecticida seguido de hongo. Como respuesta se observó la mortalidad de las larvas tratadas y la esporulación de los cadáveres. En la mortalidad influyeron los tres factores: insecticidas, los hongos y la secuencia. En general, bajo las combinaciones se obtuvieron mortalidades similar a las de los testigos de insecticida, pero se aumentó la esporulación, implicando que los hongos infectaron más huéspedes cuando se aplicaron en combinación con los insecticidas que cuando se aplicaron solos (P<0.0001). Spinosad fue mejor promotor de la infección (esporulación) que clorpirifós etil. La secuencia Bb88-spinosad (aplicación simultánea) produjo mayor mortalidad que su testigo de insecticida. El aislamiento Bb88 fue antagónico con clorpirifós etil respecto a la mortalidad cuando el hongo se aplicó antes o simultáneamente con el insecticida. Se discute el potencial de las combinaciones de hongos con insecticidas para mejorar el desempeño de los hongos entomopatógenos, el papel de las secuencias en ese desempeño y las posibles causas del antagonismo observado entre Bb88 y clorpirifós etil.

**Palabras clave:** secuencias de aplicación, esporulación, gusano cogollero, clorpirifós etil, spinosad, hongos entomopatógenos, antagonismo.

**INTERACTION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI *Beauveria bassiana* AND *Metarhizium anisopliae* WITH INSECTICIDES IN LARVAE OF *Spodoptera frugiperda***

Maribel Rivero Borja, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2015

Aiming to improve control of *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm), combinations of insecticides with fungi were tested against third instar larvae of this pest. Combinations of the LC<sub>50</sub> of ethyl chlorpyrifos and spinosad (0.24 and 0.025 µg mL<sup>-1</sup>, respectively) were used with suspensions of spores from isolates of *Beauveria bassiana* (Bb88) and *Metarhizium anisopliae* (ETL) (1x10<sup>8</sup> spores mL<sup>-1</sup>) in three application sequences: fungus followed (24 h later) by insecticide, fungus and insecticide simultaneously, and insecticide followed by fungus. The response observed was mortality of the treated larvae and sporulation on cadavers. The three factors, insecticides, fungi and the sequence, influenced mortality. In general, the combinations achieved mortalities similar to those of the insecticide controls, but sporulation increased, meaning that the fungi infected more hosts when they were applied in combination with the insecticides than when they were applied alone (P<0.0001). Spinosad was a better promotor of infection (sporulation) than ethyl chlorpyrifos. The sequence Bb88-spinosad (simultaneous application) produced higher mortality than its insecticide control. The Bb88 isolate was antagonistic with chlorpyrifos in terms of mortality when the fungus was applied before or simultaneously with the insecticide. We discuss the potential of fungus-insecticide combinations for better performance of entomopathogenic fungi, the role of the sequence in their performance and the possible causes of the antagonism observed between Bb88 and chlorpyrifos.

**Key words.** Application sequences, sporulation, fall armyworm, ethyl chlorpyrifos, spinosad, entomopathogenic fungi, antagonism.

## DEDICATORIA

*A mis padres: Mario Adalberto Rivero Garnica y Guadalupe Borja Castillo. Un simple “gracias” no basta para compensar todo lo que me han dado. El esfuerzo de toda su vida se refleja en la actitud recta y responsable de cada uno de nosotros, sus hijos. No tengo duda que los valores y la moral inculcados perduraran en sus nietos y quizás más allá. Son un ejemplo a seguir.*

*A mis hermanos: Jesús A., José Luis, David y Judith. La vida nos ha colocado en caminos y circunstancias diferentes, pero el amor que nos une sigue siendo el mismo de siempre y el que nos sostiene para enfrentar las adversidades de la vida.*

*A todos mis sobrinos. En especial a Hugo y Yahel, son lo que me motiva a ser mejor persona.*

## AGRADECIMIENTOS

A todos los contribuyentes, porque a través de sus impuestos el CONACyT otorgó la beca para realizar mis estudios de posgrado.

Al Fideicomiso No. 167304 por el apoyo al proyecto de Investigación de tesis de Maestría en Ciencias.

Al Colegio de Postgraduados por darme la oportunidad de formarme y realizar mis estudios de Maestría en sus instalaciones.

Al Dr. Alejandro Pérez Panduro por aceptar fungir como mi Consejero, por su apoyo y orientación a lo largo de toda la Maestría; por el tiempo dedicado al escrito y por su constante interés de mejorar el contenido y la redacción del mismo. Todo el proceso fue difícil, pero valió la pena.

A los Drs. Ariel W. Guzmán Franco y Esteban Rodríguez Leyva por todo el apoyo en la parte estadística, por sus valiosos comentarios y aportaciones para mejorar el escrito y porque siempre me dedicaron tiempo para escuchar y para aclarar mis dudas.

Al Dr. Candelario Santillán Ortega por sus comentarios para mejorar el contenido del escrito.

Al Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel por todas las facilidades, la confianza y el apoyo brindado durante la investigación; por permitirme hacer uso del equipo, material e instalaciones del Laboratorio de Toxicología, sin ese apoyo todos los experimentos hubieran sido complicados de realizar.

A la M.C. Diane Fumiko Miyoshi por su ayuda en la traducción del artículo científico.

Al personal del Laboratorio de Toxicología: al Sr. Rubén por compartir sus conocimientos sobre la cría del gusano cogollero; a don Memo y Adrián por todo el apoyo y facilidades brindadas durante mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Nuvia Orduño Cruz por el tiempo dedicado para enseñarme a trabajar con hongos entomopatógenos; por aclarar mis dudas y compartir tus conocimientos. Gracias por tu disponibilidad y sencillez que te caracterizan y por el tiempo que le dedicas a todo incauto que se acerque a ti para aclarar cualquier duda.

A los compañeros del Laboratorio de Patología de Insectos: Lupita, Nuvia, Carmela, Fabián y Alejandro con los que compartí el espacio, equipo y material en el laboratorio, gracias por su tolerancia y por ajustarse siempre a los tiempos para trabajar todos en armonía.

A los compañeros del Laboratorio de Control Biológico, especialmente al Dr. Alfonso Luna Cruz por el tiempo y disponibilidad para aclarar mis dudas; al M. C. Salvador Hernández Moreno porque tus charlas siempre me dejaron una enseñanza, por tu inigualable sentido del humor, era imposible no reír hasta la lágrima con tus ocurrencias y comentarios.

A todas las personas que me brindaron palabras de ánimo para llevar a buen término este trabajo, en especial a la familia Rosas de la Rosa por su hospitalidad y confianza que me brindaron. Desde el primer día me sentí como en casa.

A mis padres, hermanos y demás familiares por todo el cariño que me demostraron en esta etapa de mi vida, fue lo que me fortaleció para seguir siempre adelante; gracias por sus constante oraciones.

Este logro no es sólo mío, agradezco a DIOS por estar presente en cada momento de mi vida, porque en esta etapa te sentí más cerca que en ninguna otra. Por llenarme de paciencia y tolerancia; por fortalecer mi espíritu y darme calma para no rendirme en los días amargos, de desesperación, llanto, soledad, duda e incertidumbre. Confío en que estarás siempre conmigo y que me sostendrás en aquellos momentos que se tornen difíciles.

*“La agricultura parece algo sumamente fácil cuando nuestro arado es un lápiz y cuando nos encontramos a cientos de kilómetros de distancia de los campos de maíz”.*  
*Dwight D. Eisenhower, Discurso Presidencial,*  
*25 de septiembre de 1956.*

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Insecticidas cuya toxicidad fue evaluada en larvas de <i>S. frugiperda</i> así como con los aislamientos <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> .....	19
Cuadro 2.	CL <sub>50</sub> de insecticidas en larvas de tercer ínstar de <i>S. frugiperda</i> .....	25
Cuadro 3.	Germinación de conidios de Bb y Bb88 de <i>B. bassiana</i> y, ETL y MGC 07 de <i>M. anisopliae</i> bajo diferentes concentraciones de insecticidas.....	26
Cuadro 4.	CL <sub>50</sub> de los insecticidas en la germinación de conidios de Bb y Bb88 de <i>B. bassiana</i> y, ETL y MGC 07 de <i>M. anisopliae</i> .....	27
Cuadro 5.	CL <sub>50</sub> de clorpirifós etil y spinosad en <i>S. frugiperda</i> y, concentración de los mismos insecticidas que permitieron el 50 y 85% de germinación de los hongos Bb88 y ETL.....	28
Cuadro 6.	Mortalidad y esporulación de larvas de tercer ínstar de <i>S. frugiperda</i> tratadas con las combinaciones insecticidas y aislamientos fúngicos (Bb88 o ETL) en distintas secuencias.....	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Efecto de las combinaciones de los aislamientos Bb88, de <i>Beauveria bassiana</i> y ETL, de <i>Metarhizium anisopliae</i> con los insecticidas clorpirifós etil, spinosad en la mortalidad de larvas L3 de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	29
Figura 2.	Efecto general de los aislamientos Bb88 y ETL en la mortalidad de larvas L3 de <i>Spodoptera frugiperda</i> tratadas con las combinaciones de esos aislamientos con los insecticidas clorpirifós etil y spinosad.....	30
Figura 3.	Efecto de las secuencias de aplicación de las combinaciones de los aislamientos Bb88 y ETL con clorpirifós en la mortalidad de larvas L3 de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	31
Figura 4.	Efecto de las secuencias de aplicación de las combinaciones de los aislamientos Bb88 y ETL con spinosad en la mortalidad de larvas L3 de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	32
Figura 5.	Efecto de los insecticidas en la esporulación de larvas L3 de <i>Spodoptera frugiperda</i> tratadas con combinaciones de los aislamientos Bb88 y ETL con clorpirifós (cl) y spinosad (sp).....	33
Figura 6.	Efecto de los hongos en la esporulación de larvas L3 de <i>Spodoptera frugiperda</i> tratadas con las combinaciones de los aislamientos Bb88 y ETL con clorpirifós y spinosad.....	33
Figura 7.	Efecto de las secuencias de aplicación de en la esporulación de larvas L3 de <i>Spodoptera frugiperda</i> tratadas con combinaciones de los aislamientos Bb88 y ETL con clorpirifós.....	34
Figura 8.	Efecto de las secuencias de aplicación en la esporulación de larvas L3 de <i>Spodoptera frugiperda</i> tratadas con combinaciones de los aislamientos Bb88 y ETL con spinosad.....	35

## ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN-----	iii
ABSTRACT-----	iv
DEDICATORIA-----	v
AGRADECIMIENTOS-----	vi
ÍNDICE DE CUADROS-----	viii
ÍNDICE DE FIGURAS-----	ix
ÍNDICE DE CONTENIDO-----	x
INTRODUCCIÓN-----	1
OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS-----	4
REVISIÓN DE LITERATURA-----	5
<b>1. Maíz</b> -----	5
1.1 Biología del maíz-----	5
1.2 Ciclo del cultivo de maíz-----	5
1.3 Plagas del maíz-----	6
<b>2. Ciclo de vida de <i>Spodoptera frugiperda</i></b> -----	7
2.1 Daño al maíz por <i>Spodoptera frugiperda</i> -----	7
2.2 Otros cultivos hospederos de <i>Spodoptera frugiperda</i> -----	8
<b>3. Hongos entomopatógenos</b> -----	8
3.1 <i>Beauveria bassiana</i> -----	10
3.2 <i>Metarhizium anisopliae</i> -----	10
3.3 Ventajas y desventajas del uso de hongos como bioinsecticidas-----	11
<b>4. Insecticidas</b> -----	11
4.1 Azadiractina-----	12
4.2 Clorpirifós etil-----	13
4.3 Lambda cialotrina-----	13
4.4 Metomilo-----	14
4.5 Spinosad-----	14
<b>5. Interacción patógeno-insecticida</b> -----	15
MATERIALES Y MÉTODOS-----	18
Cría de los Insectos-----	18

Insectos de prueba -----	18
Insecticidas -----	18
Bioensayo de dosis-respuesta en <i>Spodoptera frugiperda</i> -----	19
Hongos entomopatógenos-----	20
Inóculo fúngico y sus diluciones-----	20
Viabilidad de conidios-----	21
Efecto de insecticidas en la germinación de conidios de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> ---	21
Interacción de hongos con insecticidas-----	22
Variables respuestas y su análisis-----	24
<b>RESULTADOS</b> -----	25
Bioensayo de dosis-respuesta en <i>Spodoptera frugiperda</i> -----	25
Efecto de insecticidas en la germinación de conidios de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> ---	25
Interacción de hongos con insecticidas-----	28
Efecto de los insecticidas en la mortalidad-----	28
Efecto de los hongos en la mortalidad-----	30
Efecto de las secuencias en la mortalidad-----	31
Efecto de los insecticidas en la esporulación-----	32
Efecto de los hongos en la esporulación-----	32
Efecto de las secuencias en la esporulación-----	34
<b>DISCUSIÓN</b> -----	36
<b>LITERATURA CITADA</b> -----	40

## INTRODUCCIÓN

El maíz es el grano más importante en México; su producción alcanzó 23 millones de toneladas durante 2010, lo que coloca al país como el cuarto productor mundial (SIAP, 2013). Su consumo per cápita es de 253.2 kg/año (SAGARPA, 2010) que se distribuyen en tres usos principales: alimento humano directo, componente de piensos para ganado y materia prima para la industria.

En México el cultivo de maíz es afectado por al menos 14 plagas (CESAVEG, 2012), entre las que destaca el gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Esta especie, endémica de América, es una plaga cosmopolita y se considera una de las más importantes en el cultivo de maíz (Wiseman *et al.*, 1966). Las larvas de *S. frugiperda* dañan al maíz en todas sus etapas de desarrollo, pero cuando ataca a las plantas jóvenes, disminuye su potencial productivo hasta en 70% (Blanco *et al.*, 2010; Bahena, 2013). Esta especie de lepidóptero también es un problema en cultivos de algodón, soya, tomate, arroz, cebolla, frijol, y sorgo entre otros, así como varias especies de pastos (Posada, 1989; Reinert *et al.*, 1997; Braman *et al.*, 2004; Pessaraki, 2007; León-García *et al.*, 2012).

El combate del cogollero con insecticidas suele ser una tarea difícil de lograr debido a su rápido desarrollo de resistencia a insecticidas (Blanco *et al.*, 2010) por lo que es común que los productores recurran a múltiples aplicaciones o a dosis elevadas para reducir las poblaciones de la plaga, lo cual afecta a la entomofauna benéfica, contamina el suelo, el agua, implica riesgos para la salud de los trabajadores agrícolas y los consumidores (Carson, 1962; FAO, 1997; OMS/PNUMA, 1992; Moses *et al.*, 1993).

Por otro lado, las larvas del cogollero también son difíciles de controlar con entomopatógenos, como lo evidencia la casi ausencia de publicaciones sobre esas experiencias y

la poca susceptibilidad de esa especie a los hongos documentada en laboratorio: en el trabajo de Thomazoni *et al.*, (2014) se documentó que sólo uno de 49 aislamientos de *B. bassiana* causó mortalidad relevante (44.5%) en *S. frugiperda* y, en el de Carneiro *et al.* (2008), sólo uno de once aislamientos provenientes de cadáveres de *S. frugiperda* produjo mortalidad significativa (11.7%) en sus larvas.

El uso de insecticidas combinados con hongos entomopatógenos fue sugerido por Telenga en 1964, con base en la observación de epizootias tras la aplicación de insecticidas (Ferron, 1985) y el incremento en mortalidad del picudo de la remolacha azucarera mediante la combinación de un hongo con el insecticida hexaclorociclohexano (Telenga, 1957). Dichos antecedentes sugirieron que, en algunos casos, la combinación de insecticidas con hongos puede mejorar el desempeño de los entomopatógenos fúngicos.

Ciertas combinaciones hongo-insecticida mejoran el desempeño de los hongos, mientras que otras producen efectos antagónicos. Entre los primeros se ha documentado que *B. bassiana*, en combinación con abamectina o carbaril, produjo efecto aditivo en la mortalidad de larvas de *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) (Anderson *et al.*, 1989); asimismo ocurrió en *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae) al combinarlo con spinosad (Gosselin *et al.*, 2009); en tanto que ciertos aislamientos de *M. anisopliae* han sido sinergistas con dosis bajas de spinosad en la mortalidad de *Agriotes lineatus* y *A. obscurus* (Coleoptera: Elateridae) (Ericsson *et al.*, 2007) y, otros demuestran compatibilidad con dosis de campo de metoxifenozone, triflumuron, abamectina y profenofos (Ramzan *et al.*, 2010).

Entre los casos de efecto antagonista se han documentado combinaciones de endosulfan, clorpirifós, fenitrotion, diazinon, malation, isazofos o pirimifosmetil con ciertos aislamientos de *B. bassiana*, donde los primeros redujeron la eficacia del hongo sobre la broca del café,

*Hypothenemus hampei* (Rivera *et al.*, 1994) o, profenofos, indoxicarb, imidacloprid, triazofos y metildemeton que, en dosis de campo, redujeron la germinación de sus esporas (Amutha *et al.*, 2010) mientras que, los piretroides cipermetrian y deltametrina, en dosis de campo fueron incompatibles con el hongo (Cazorla and Morales, 2010).

Estos antecedentes tienen resultados divergentes, mientras el trabajo de Amutha *et al.* (2010) señaló compatibilidad *in vitro* entre *B. bassiana* y clorpirifós, el de Rivera *et al.* (1994) reportó reducción del control de la plaga en campo, lo que implicó una diferente respuesta del hongo al insecticida. Parece no haber aún suficiente entendimiento de las interacciones entre hongos entomopatógenos y los insecticidas como para plantear una explicación para estos resultados controversiales, pero una posibilidad es que se deba a las diferencias genéticas entre los aislamientos en cuestión, lo cual sugiere que cada aislamiento debería ser evaluado con cada insecticida para conocer su respuesta.

Ambos tipos de efectos, positivos y negativos, de la combinación de hongos con insecticidas sobre la mortalidad de las plagas ilustran la importancia de evaluar la interacción de cada combinación particular. En un caso, para encontrar combinaciones útiles para el control de plagas y, en el otro, para evitar combinaciones que se contrarresten.

De acuerdo con nuestra revisión, los trabajos previos de este tipo se han enfocado a conocer la compatibilidad *in vitro* (germinación y/o desarrollo fúngico) en presencia del insecticida (Vásquez *et al.*, 2004; Amutha *et al.*, 2010 y Ramzan *et al.*, 2010) o la mortalidad de la plaga bajo la combinación de hongos e insecticidas (Quintela y McCoy, 1997, 1998; Rivera *et al.*, 1994). Debido a ello en este trabajo se establecieron los siguientes objetivos:

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el potencial de la combinación de dosis bajas de insecticidas (CL<sub>50</sub>) con aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para incrementar la infección y mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar la CL<sub>50</sub> de cinco insecticidas en larvas de *Spodoptera frugiperda*.

Evaluar la toxicidad de cuatro insecticidas sobre la germinación de conidios de dos aislamientos de *Beauveria bassiana* y dos de *Metarhizium anisopliae*.

Analizar la interacción de clorpirifós etil y spinosad con los aislamiento Bb88, de *Beauveria bassiana* y, de ETL, de *Metarhizium anisopliae* en larvas de *Spodoptera frugiperda*.

## **REVISIÓN DE LITERATURA**

### **1. Maíz**

El maíz está presente en todos los estados, climas y altitudes del país y, es el cultivo con mayor producción en el territorio mexicano comparado con otros cereales como el sorgo, el trigo, la cebada, el arroz y la avena; (SAGARPA, 2013).

En el periodo de 1998 a 2008 los estados que sobresalieron por su aporte productivo de este importante grano fueron Sinaloa, Jalisco, Estado de México, Chiapas, Michoacán, Guerrero, Guanajuato y Veracruz (SAGARPA, 2010) y a nivel mundial los principales productores son Estados Unidos, China y Brasil quienes contribuyen con el 40, 20 y 6 % de la producción, respectivamente (SIAP, 2013).

#### **1.1 Biología del maíz**

El maíz es una gramínea anual con crecimiento determinado, de hojas largas y angostas. Presenta separación de los sexos en distintas estructuras florales: las inflorescencias masculinas, denominadas espigas, se encuentran en el ápice del tallo y, las inflorescencias femeninas, nombradas mazorcas, se localizan en el ápice de ramas que emergen de las axilas foliares. La inflorescencia masculina, produce pares de espiguillas separadas, de las cuales una es flor fértil y la otra estéril. La inflorescencia femenina produce pares de espiguillas, cada una de ellas encierra dos flósculos fértiles y sólo uno de los ovarios madura originando al fruto, una vez fertilizado por el polen (Salvador, 2001).

#### **1.2 Ciclo del cultivo de maíz**

El ciclo del cultivo del maíz presenta dos etapas principales de desarrollo: una vegetativa y otra de reproducción. La primera, a su vez, tiene una serie de subdivisiones vegetativas (V), las

cuales son designadas como VE, emergencia y, V1 hasta V(n), siendo (n) la última hoja antes del panojamiento (VT). El número de hojas varía de acuerdo al cultivar y el efecto ambiental. La segunda etapa es la de reproducción y presenta 6 subdivisiones, mismas que se designan como R1 hasta R6. El tiempo entre V1 y R6 varía en función del cultivar y de las condiciones ambientales (Ritchie *et al*, 1986).

### **1.3 Plagas del maíz**

En México el cultivo de maíz es afectado por más de 14 insectos plaga (CESAVEG, 2012), mismos que se presentan, pero no de forma simultánea, a lo largo de todas las etapas de desarrollo del cultivo. Algunas de estas plagas son rizófagas (plagas del suelo), otras defoliadoras (plagas del follaje) y, otras se alimentan del elote (plagas de la mazorca).

Dentro de las plagas del suelo destacan la gallina ciega, *Phyllophaga* sp., *Cyclocephala* sp., *Anomala* sp.; *Diabrotica* sp.; *Melanotus* sp.; el gusano de alambre, *Agriotes* sp. y; la catarina del maíz *Colaspis* spp. El principal daño lo ocasionan los estados inmaduros (larvas) que se alimentan de la raíz, provocando la muerte de semillas y plántulas y, si éstas llegan a sobrevivir al daño, entonces presentan escaso desarrollo en su sistema radicular, lento desarrollo vegetativo y deformación de la plántula (CESAVEG, 2012).

Dentro de las plagas del follaje destaca el trip, *Frankliniella williamsi*; el gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda*; los gusanos soldado, *Spodoptera exigua* y *Mythimna unipuncta*; el gusano trozador, *Agrotis* spp.; el gusano barrenador, *Diatraea* spp.; el coleóptero *Geraeus senilis* y la araña roja, *Olygonychus mexicanus* y *Tetranychus* spp. (CESAVEG, 2012).

Como parte de las plagas de la mazorca se encuentra el gusano elotero, *Helicoverpa zea*; el frailecillo, *Macrodactylus mexicanus*; y el chapulín, *Melanoplus* spp. (CESAVEG, 2012).

## **2. Ciclo de vida de *Spodoptera frugiperda***

El gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), es una plaga polífaga que causa pérdidas económicas considerables en varios cultivos importantes, principalmente en maíz. Esta plaga se puede presentar bajo condiciones de sequías prolongadas y, cuando la planta presenta un mal desarrollo por la inadecuada fertilización, los daños son más drásticos. Las hembras ovipositan masas de 40 a 200 huevos, generalmente los colocan en el envés de las hojas y ocasionalmente en el haz y los cubren con escamas, el promedio de huevos por hembra durante toda su vida fértil es de 1500 con un máximo de 2000 (Capinera, 1995); la incubación de los huevos dura de 4 a 5 días. Las larvas pasan por 6 instares. La etapa larvaria dura de 14 a 22 días, las larvas de los instares segundo y tercero se alimentan de las hojas y tienen hábitos caníbales. La etapa de pupa ocurre en el suelo y dura 7 a 13 días y el estado adulto es de 10 a 12 días (Bayer CropScience México, 2007). La duración del ciclo biológico es variable, va desde los 20 a 48 días, dependiendo de la temperatura, a 26°C la duración es de 32 días aproximadamente (CESAVEG, 2012).

### **2.1 Daño al maíz por *S. frugiperda***

El gusano cogollero, *S. frugiperda* se considera una de las plagas más importantes del maíz en las regiones tropicales y subtropicales de América. Se encuentra distribuido en todas las zonas productoras de maíz. En México, esta plaga ocasiona pérdidas del 10 al 100 %, sobre todo si la planta es atacada cuando tiene entre 40 y 60 centímetros de altura (Banda *et al.*, 1981; Bahena, 2013).

Las larvas del gusano cogollero hacen perforaciones en las hojas y comen desde el borde de las hojas hacia el interior. Los primeros instares larvarios (segundo y tercer instar) inicialmente consumen el tejido de la hoja de un lado, ocasionando descarnaduras aisladas, lo

que les da la apariencia de zonas blanquecinas transparentes, dejando la capa epidérmica opuesta intacta; después se alimentan del cogollo, el daño en esta zona es lo que produce la fila característica de perforaciones en las hojas y, cuando dañan las plantas a nivel del cuello pueden cortar los tallos (Capinera, 1995).

## **2.2 Otros cultivos hospederos de *S. frugiperda***

*S. frugiperda* muestra una amplia gama de huéspedes, con más de 80 plantas registradas, pero claramente prefiere gramíneas. Los cultivos frecuentemente dañados son: alfalfa, cebada, hierba de Bermudas, algodón, trébol, maíz, avena, mijo, maní, arroz, sorgo, remolacha azucarera, pasto sudán, soya, caña de azúcar, tabaco y trigo. Otros cultivos que con menor frecuencia son dañados por el gusano cogollero son la manzana, uva, naranja, papaya, melocotón, fresa y varias flores. Con base en la preferencia de la planta hospedera, se han reconocido dos cepas de *S. frugiperda*, aquella que se alimenta principalmente de maíz, sorgo y algodón y otra cepa que se alimenta preferentemente de arroz, pasto bermuda y pasto Johnson (Capinera, 1995).

## **3. Hongos entomopatógenos**

Los hongos entomopatógenos son un amplio grupo de microorganismos que proveen múltiples servicios a los sistemas agroecológicos. Se conocen más de 750 especies que atacan a artrópodos, varios de ellos con gran potencial como agentes de control biológico natural (Pucheta Diaz *et al.*, 2006).

Los patógenos fúngicos se transmiten de un insecto a otro por tres vías: a) por ingestión; b) por penetración de un estado infectivo a través de los espiráculos o de la cutícula y; c) porque un vector los pase de un insecto enfermo a otro sano (Cardona, 1998).

Una característica de un buen entomopatógeno es su habilidad de resistir la acción de otros microorganismos y condiciones abióticas como la radiación UV, desecación y temperatura. Los rayos UV afectan la persistencia del patógeno en el campo, mientras que, altos índices de humedad (por lo menos del 90%) son requeridos para la germinación de las esporas (Cardona, 1998).

La supervivencia de los patógenos está influenciada por el microhábitat, por ejemplo, el suelo es mejor hábitat que el follaje porque protege de la luz, proporciona humedad y evita la desecación y, para que el patógeno fúngico persista en el ambiente, debe formar estructuras de resistencia a condiciones ambientales adversas (Vergara, 2004).

Los hongos son el único grupo de entomopatógenos que puede colonizar a sus huéspedes por contacto y adhesión de las esporas a partes de su cuerpo (partes bucales, membranas intersegmentales o espiráculos). El proceso infectivo implica tres etapas (1) adhesión y germinación de la espora a la cutícula del insecto; (2) penetración en el hemocele y; (3) desarrollo del hongo, lo cual generalmente resulta en la muerte del insecto (Alean, 2003).

El 80% de las enfermedades naturales de los insectos en los agroecosistemas son producidos por hongos. En la asociación patógeno-hospedero, el insecto hospedero ejerce una presión de selección que favorece a pocos genotipos del patógeno; es decir, hay una selección natural de estos microorganismos en términos de especialización con respecto al hospedero para ser utilizados como agentes de control de plagas agrícolas (Robbs y Bittencourt, 1998).

Las especies de hongos entomopatógenos más utilizados como agentes insecticidas son *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* y, han sido evaluados satisfactoriamente en el control de lepidópteros plaga como la polilla dorso de diamante, *Plutella xylostella* (Shelton *et al.*, 1998; Vandenberg *et al.*, 1998); el gusano de la col, *Pieris rapae* (García *et al.*, 2005; García-

Gutiérrez *et al.*, 2010); el gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (García *et al.*, 2011; Lezama *et al.*, 1996, 2000, 2005); *Trichoplusia ni* (Behle, 2006); así como en insectos del orden coleoptera como la broca del café, *Hypothenemus hampei*, (Zimmermann, 1993; De la Rosa *et al.*, 2000; 1997; Pava-Ripoll *et al.*, 2008); el picudo del nopal, *Metamasius spinolae* (Orduño-Cruz *et al.*, 2011); el picudo del chile, *Anthonomus eugenii* (Carballo *et al.*, 2001) y el escarabajo rojo de la papa, *Leptinotarsa decemlineata* (Campbell *et al.*, 1985; Anderson *et al.*, 1989).

### **3.1 *Beauveria bassiana***

El hongo *B. bassiana* se ha registrado afectando a más de 200 especies de insectos pertenecientes a nueve órdenes tanto en ambientes templados como tropicales en todo el mundo, muchas especies de lepidópteros noctuidos son susceptibles a este hongo y se considera una especie segura en relación a lo que se conoce sobre su biología, destino y comportamiento en el ambiente así como por sus efectos en organismos no blanco (Gosselin *et al.*, 2009).

En medio de cultivo, *B. bassiana* tiene las siguientes características: el aspecto de la colonia es lanosa y de superficie plana; de color blanco en un principio, tornándose amarillenta posteriormente en la parte del centro. Esta especie posee hifas cenocíticas, lisas, con células conidiógenas formando densos racimos irregularmente agrupados; las fialides se encuentran hinchadas en la base, asemejándose a un frasco subgloboso y se adelgazan hacia la parte distal que sostiene a las esporas (llamado raquis, presentando forma de zigzag). Los conidios de *B. bassiana* son hialinos, lisos, de forma globosa a elipsoidal con un tamaño de 2.2 a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro (Alean, 2003; Domsch *et al.*, 1993).

### **3.2 *Metarhizium anisopliae***

El hongo *M. anisopliae* es cosmopolita y es común aislarlo de muchos tipos de suelo y de varios ordenes de insectos (Ericsson *et al.*, 2007). Se ha aislado de más de 300 especies de artrópodos. Esta adaptado a vivir como hongo saprofita y como simbiote con la rizósfera de las plantas, lo que hace que el suelo sea su principal hábitat (Hu and St. Leger, 2002).

El medio de cultivo *M. anisopliae* presenta un crecimiento radial, la coloración de la colonia generalmente es verde oliva, con aspecto algodonoso, de textura variable y superficie plana (Guerrero *et al.*, 1999). Las hifas son cenocíticas, lisas. Los conidios poseen extremos redondeados, lisos y agrupados en cadenas regulares debido a la agregación por elongación de los conidios; su tamaño es de 5.2 a 7.7 x 1.4 a 3.1  $\mu\text{m}$  (Guerrero *et al.*, 1999; Domsch *et al.*, 1993).

### **3.3 Ventajas y desventajas del uso de hongos entomopatógenos como bioinsecticidas**

Algunas ventajas de usar a los hongos entomopatógenos como insecticidas son: la especificidad, la cual varía considerablemente. Algunos hongos infectan un amplio rango de hospederos, por ejemplo *B. bassiana* y *M. anisopliae* infectan cerca de 300 especies diferentes de insectos en varios ordenes (Coleoptera, Lepidoptera, Hemiptera), mientras que otros, dañan a unos pocos o, incluso, a una sola especie de insecto (Alean, 2003). Además, la mayoría de los hongos son efectivos contra las plagas, no contaminan al medio ambiente, no destruyen insectos benéficos, no son tóxicos para los humanos, no desarrollan resistencia y no dejan residuos en los alimentos.

Por otra parte, algunos aspectos considerados como desventajas esta: su sensibilidad a la radiación UV, su efecto depende del contacto con los insectos, no son sustitutos de los químicos, hay que conocer qué factores les son favorables y deben usarse en conjunto con otras acciones, es decir, incluirlos en programas de manejo integrado de plagas (Lozano *et al.*, 2000).

## 4. Insecticidas

Los insecticidas son productos destinados para el control de insectos que perjudican al ser humano o que afectan la elaboración, almacenamiento y producción de alimentos, así como los productos agrícolas y maderables.

En base a su toxicidad aguda, la OMS (Organización Mundial de la Salud) clasifica a los insecticidas (y en general a los plaguicidas) en cinco diferentes categorías: extremadamente peligrosos (Ia), altamente peligrosos (Ib), moderadamente peligrosos (II), poco peligrosos (III) y, normalmente no ofrecen peligro (IV, a veces no clasificados).

### 4.1 Azadiractina

La azadiractina se obtiene de la semilla de neem. Este insecticida es un tetraterpenoide que actúa como regulador del crecimiento de larvas de insectos, instares ninfales y pupas; también opera como disruptor de la ecdisona, una hormona que controla la muda de los insectos (Immaraju, 1998).

La azadiractina también se encuentra en la corteza del árbol de neem, *Azadirachta indica* (A. Juss), así como en las hojas y frutos, pero la mayor concentración se ubica en la semilla (Mordue *et al.*, 2005). El árbol de neem es originario de Asia, se encuentra en forma natural en bosques tropicales caducifolios y subcaducifolios (National Research Council, 1992), en bosques subtropicales e incluso se le puede encontrar en zonas áridas (Kaushik *et al.*, 2007).

La azadiractina es un insecticida alifático, sólo de uso agrícola. Se clasifica dentro de la categoría IV (normalmente no ofrecen peligro). Su fórmula química es  $C_{33}H_{42}O_{13}$ .

De acuerdo con el Comité de Acción contra la Resistencia a Insecticidas (IRAC por sus siglas en inglés), el modo de acción de la azadiractina se desconoce o es incierto. Sin embargo, se observa que tiene acción antialimentaria y reguladora del crecimiento (Mordue *et al.*, 2005).

## **4.2 Clorpirifós etil**

Es un insecticida organofosforado para uso agrícola, doméstico, pecuario, urbano e industrial. Su categoría toxicológica es III (poco peligroso). Su nombre y fórmula química son O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil) fosforotioato y  $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ , respectivamente.

Clorpirifós etil actúa a nivel de sistema nervioso central bloqueando la acción de la enzima acetilcolinesterasa, permitiendo la transmisión constante de impulsos entre las células nerviosas, ocasionando estados de excitación (IRAC, 2014). El principal mecanismo de resistencia de los insectos hacia este insecticida es metabólica, mediante la acción enzimática de esterasas y glutatión S-transferasas (Bisset, *et al.*, 2001; Cossio-Bayugar *et al.*, 2002).

## **4.3 Lambda cialotrina**

Es un insecticida piretroide de uso agrícola, pecuario y urbano. Su categoría toxicológica es III (poco peligroso). Su nombre y fórmula química son Alfa-Ciano-3-fenoxibencil 3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetil ciclopropano carboxilato y  $C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$ , respectivamente.

Lambda cialotrina actúa a nivel de sistema nervioso central como modulador de los canales de sodio, los cuales participan en la propagación de potencialidad de acción a lo largo de

nervios (IRAC, 2014). Los piretroides rápidamente interfieren con esta acción, ocasionando hiperactividad y el bloqueo del nervio, además, ocasiona excitación y parálisis.

En el aire, los piretroides son degradados rápidamente por la luz solar o por otros compuestos que se encuentran en la atmósfera. A menudo duran solamente de 1 a 2 días en el aire antes de ser degradados. La lluvia y la nieve ayudan a remover del aire a los piretroides que no son degradados rápidamente. Debido a que estos compuestos se adhieren firmemente al suelo, generalmente no se filtran al agua subterránea, no contaminan los suministros de agua potable y se volatilizan lentamente de la superficie del suelo. Los piretroides eventualmente son degradados por microorganismos presentes en el suelo y el agua. También pueden ser degradados por la luz solar en la superficie del agua, el suelo o las plantas. Sin embargo, algunos de los piretroides desarrollados recientemente pueden persistir en el ambiente durante meses (ATSDR, 2003).

#### **4.4 Metomilo**

Es un insecticida carmabato de uso agrícola, doméstico, industrial, pecuario y urbano. Su categoría toxicológica es II (moderadamente peligroso). Su nombre y fórmula química son S-Metil-N-[(metil carbamoil)oxi]tioacetamidato y  $C_5H_{10}N_2O_2S$ , respectivamente.

Metomilo actúa a nivel de sistema nervioso central inhibiendo la acetilcolinesterasa (IRAC, 2014) y su principal mecanismo de resistencia de los insectos hacia este insecticida es metabólica, mediante la acción enzimática de esterasas (Bisset, *et al.*, 2001; Baffi *et al.*, 2008).

#### **4.5 Spinosad**

Spinosad forma parte de las nuevas moléculas químicas de insecticidas denominadas espinosinas. Es un metabolito secundario del actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa*. Es sólo

de uso agrícola. Su categoría toxicológica es III (poco peligroso). Su nombre y fórmula química son spinosyn A y spinosyn D y  $C_{41}H_{65}NO_{10}$ , respectivamente.

Actúa sobre el sistema nervioso central, pero de forma diferente que el resto de insecticidas convencionales. Es un agonista de los receptores acetilcolina nicotínicos; spinosad se acopla (a través de un sistema de proteínas) a los receptores nicotínicos de acetilcolina, activándolos y permitiendo el flujo del ion sodio al interior de la célula postsináptica provocando hiperexcitación del sistema nerviosos central del insecto (IRAC, 2014).

Spinosad se obtiene a partir de la fermentación de *Saccharopolyspora spinosa*. En medio de cultivo el aspecto de la colonia es filamentosa, conformada por hifas que contienen cadenas largas de esporas amarillentas y en forma de espinas (Lu *et al.*, 2001). El micelio aerobio es color rosa-amarillento y el vegetativo café-amarillento. A través de la fermentación, *S. spinosa* produce más de 20 spinosinas con propiedades insecticidas, siendo las más abundantes la A y D (Thompson *et al.*, 2000).

Aunque no están claros los mecanismos de resistencia de los insectos a spinosad, ya existen reportes de resistencia de *Plutella xylostella* en diversas regiones de Estados Unidos (Zhao *et al.*, 2002; 2006); de *Spodoptera exigua* en Tailandia (Moulton *et al.*, 2000); de *Bactrocera dorsalis* (Ju-chun y Hai-tung, 2006); de *Liriomyza trifolii* (Scott, 2004) y *Heliothis virescens* (Yung *et al.*, 2003) entre otras plagas; sin embargo, no existen registros de resistencia de *Spodoptera frugiperda* a spinosad.

## **5. Interacción patógeno-insecticida**

Con el incremento en la demanda de alimentos y fibras el ser humano se ha vuelto dependiente de los insecticidas, dándole poca importancia o ignorando a otras alternativas de

control para combatir las plagas. Sin embargo, el uso exclusivo de insecticidas como único método de control no siempre ha proporcionado el control duradero de los insectos plaga, por lo que, en los últimos años se ha tenido interés en diseñar programas donde los insecticidas trabajen en forma armónica con los agentes biológicos que intervienen en el control de las plagas. La combinación de métodos de control químico y biológico desencadena una reducción de la plaga, causando el mínimo disturbio en la actividad de enemigos naturales, por lo que se puede lograr una mayor permanencia en la supresión de la plaga (Bartlett, 1975).

Una de las principales áreas de investigación de los programas de manejo integrado de plagas, MIP, es estudiar la compatibilidad entre agentes biológicos y químicos de control (García e Ignoffo, 1979; Sosa-Gomez *et al.*, 2003), fenómeno que se ha observado en algunas combinaciones hongo-insecticida debido a que el producto químico afecta de alguna forma el desarrollo del patógeno o inhibe la germinación de las esporas de forma temporal o permanente. En los casos en que es necesario aplicar conjuntamente agroquímicos y bioplaguicidas el producto químico no debe ejercer efectos adversos sobre el desarrollo del agente biológico, ya que si esto ocurriera, el bioplaguicida no cumpliría con su función (Pavone, 2009).

El empleo de hongos entomopatógenos combinados con insecticidas es una estrategia de control viable debido a que puede haber compatibilidad entre ambos agentes de control. Desde 1964 Telenga observó que después de aplicar insecticidas en los cultivos se presentaban hongos causando epizootias en los insectos plaga. A partir de estos hallazgos otros investigadores enfocaron sus investigaciones en combinar hongos con diferentes dosis de insecticidas. Existen estudios enfocados a evaluar la compatibilidad de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* con diversas formulaciones de insecticidas sintéticos.

Los insecticidas químicos pueden afectar la capacidad de los hongos entomopatógenos (Alazogaray *et al.*, 1998). Por ejemplo, los insecticidas endosulfan, clorpirifós, fenitrothion, diazinon, malation, isazofos o pirimifosmetil inhiben el crecimiento de *Beauveria bassiana*, reduciendo la eficiencia de la mortalidad de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Rivera *et al.*, 1994), los piretroides cipermetrina y deltametrina también afectan su germinación (Cazorla y Morales, 2010) y, profenofos, indoxicarb, imidacloprid, triazofos y metildemeton, en dosis de campo, reducen la germinación de sus esporas (Amutha *et al.*, 2010).

Otras combinaciones de hongos con dosis bajas de insecticidas resultan compatibles porque permiten el crecimiento de los hongos e, incluso, pueden causar efecto sinérgico o aditivo en la mortalidad de la plaga si se aplican conjuntamente. Por ejemplo, *Beauveria bassiana* en combinación con abamectina o carbaril tiene efecto aditivo en larvas de *Leptinotarsa decemlineata* (Anderson *et al.*, 1989). Así mismo ocurre en su combinación con dosis subletal de spinosad sobre *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae) (Gosselin *et al.*, 2009). Por su parte, *Metarhizium anisopliae* combinado con dosis bajas de spinosad tuvo acción sinergista en la mortalidad de *Agriotes lineatus* y *Agriotes obscurus* (Ericson *et al.*, 2007) y; en caso de *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae), su compatibilidad fue clave para su reducción en frutos en huertos de mango en Kenya (Ekesi *et al.*, 2011). Conocer como es la interacción entre hongos e insecticidas permitiría evitar interferencias y aprovechar posibles sinergismos.

Normalmente la comparación del uso de agentes químicos y biológicos se hace sólo desde el punto de vista económico y de eficacia. Esta comparación no es aconsejable si no se considera que su modo de acción es diferente. Es claro que los insecticidas inicialmente son de bajo costo, son capaces de eliminar a los insectos plaga, pero a largo plazo generan resistencia y dejan residuos en la cadena alimenticia. Mientras que, los bioinsecticidas son más costosos y toman

más tiempo para causar la muerte de la plaga pero esto puede ser compensado por su establecimiento en el medio como agentes permanentes de mortalidad que tienen un prolongado período de control y son más selectivos a la fauna benéfica (Posada-Florez *et al.*, 2004).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Cría de los insectos**

La cría de *S. frugiperda* se realizó en el Laboratorio de Toxicología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo individualizando larvas neonatas en recipientes de plástico de 4cm de diámetro x 4cm de alto proveídos con 8 mL de dieta artificial (Fall Armyworm, Southland Products Inc®, Lake Village, Arkansas), donde se les mantuvo hasta la eclosión de los adultos. Todas la etapas de desarrollo (huevo-adulto) del gusano cogollero se llevaron a cabo en cámara de cría a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , con humedad relativa de 60% (HR) y fotoperiodo de 14:10 luz:oscuridad (L:O). Para el apareamiento y obtención de huevos, grupos de 30 a 40 adultos se colocaron en bolsas de papel extendidas y colocadas horizontalmente, las cuales desarrollan (volumen de 18.5 x 40 x 11cm de alto). Allí se les alimentó con dilución de azúcar al 10% (p/v), embebida en una esponja dentro de una caja Petri. Las masas de huevos se cosecharon cada tercer día y se colocaron en recipientes plásticos de 18.5cm de diámetro x 7.7cm de alto para su eclosión.

### **Insectos de prueba**

En todos los bioensayos se usaron larvas de *S. frugiperda* de 7 días de nacidas (tercer ínstar, L3) procedentes de una colonia de laboratorio susceptible a insecticidas por no haber sido expuestas a ellos en al menos cinco años.

## Insecticidas

Se evaluaron cinco insecticidas comerciales con los siguientes ingredientes activos (i. a.): azadiractina, clorpirifós etil, lambda cialotrina, metomilo y spinosad, cada uno de un grupo químico distinto y todos con registro de uso en México para el control de cogollero en maíz (Cuadro 1).

Cuadro 1. Insecticidas cuya toxicidad fue evaluada en larvas de *S. frugiperda* así como con los aislamientos *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Ingrediente activo	Nombre comercial	Grupo químico	[i. a.] (%)	Dosis recomendada (mg/mL)	Fabricante
<b>Clorpirifós etil</b>	Carioca-48	Organofosforado	44.44	0.55-0.83	Agroquímica Tridente
<b>Lambda cialotrina</b>	Karate-zeon	Piretroide	5.15	0.025-0.038	Syngenta
<b>Metomilo</b>	Lannate-Lv	Carbamato	29	0.725-1.45	DuPont
<b>Spinosad</b>	Spintor	Spinosino	11.6	0.087-0.116	Dow AgroSciences
<b>Azadiractina</b>	Neeem	Alifático Botánico	3	0.037-0.15	PHC (Plant Health Care de México)

[i. a.], concentración de ingrediente activo. La concentración de campo se calculó para un gasto de 400 L de agua/ha.

## Bioensayos de dosis-respuesta en *Spodoptera frugiperda*

Una vez establecido el rango de concentraciones de cada insecticida que produce entre el 5 y 95% de mortalidad, se determinaron cuatro a cinco concentraciones intermedias para usarlas en bioensayos de dosis-respuesta en las larvas L3 de *S. frugiperda*, con los cuales se determinó la CL<sub>50</sub> de cada insecticida.

La aplicación de los insecticidas se hizo en una torre de aspersion Potter (Potter, 1952), asperjando 1 mL de cada una de las concentraciones usadas. La torre consistió de un vaso de

cristal de 25 cm de diámetro y 50 cm de altura con lados rectos y dispuesto boca abajo. En su pared superior, a través de una perforación, se le adaptó una boquilla de atomización neumática de cono sólido, con dos canales: uno para inyectar aire (Spraying Systems co® serie: 1650) y, el otro para inyectar la mezcla líquida de aspersión (Spraying Systems Co® Serie: 64), ambos de 6.5 mm de diámetro. La presión fue proporcionada por un compresor (Goni® de ¼ HP) a 1.054 kg cm<sup>2</sup> (15 lb pulgada<sup>2</sup>). Se trataron 3 grupos de 15 o 20 larvas L3 de gusano cogollero en cada una de las 6 o 7 concentraciones de insecticida usadas en cada bioensayo. Los bioensayos se repitieron dos veces en generaciones distintas del cogollero, implicando un total aproximado de 120 larvas por dosis. El número de larvas tratadas en cada grupo (pseudoréplica) dependió de la cantidad de organismos disponibles para el bioensayo en cada momento. Los grupos testigo recibieron aspersión de agua con Tween 80 al 0.03%. Las larvas tratadas fueron individualizadas en recipientes de plástico con 1 mL de dieta artificial y se incubaron a 25 ± 2°C, HR de 60% y fotoperiodo 14:10 (L:O). La mortalidad se registró 48 h después del tratamiento.

### **Hongos entomopatógenos**

Se usaron cuatro aislamientos: dos de *Beauveria bassiana*: Bb y Bb88 y, dos de *Metarhizium anisopliae*: ETL y MGC 07. Dichas cepas forman parte de la colección del Laboratorio de Patología de Insectos del programa de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, los cuales se conservan a -80°C y su elección se basó en que se han estudiado y caracterizado en nuestro Laboratorio (Orduño-Cruz *et al.*, 2011; Carrillo-Benítez *et al.*, 2013) por lo que resultaba de interés abundar en su conocimiento.

### **Inóculo fúngico y sus diluciones**

La suspensión madre de conidios de cada aislamiento se preparó a partir de cultivos monospóricos efectuados en cajas Petri con Agar Dextrosa Sabouraud (ADS). Para ello, el

crecimiento micelial de 15 días fue raspado con espátula y mezclado con 5 mL de agua estéril con Tween 80 al 0.03% en un tubo falcon estéril de 50 mL, la suspensión se agitó en vortex por 5 minutos y se filtró en otro tubo falcon usando gasa y un embudo estériles. El filtrado constituyó la suspensión madre, la cual se guardó a 4°C por un máximo de 24 h y antes de usarla se tituló haciendo una dilución 1:1,000 en agua estéril con Tween 80 al 0.03% en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL; se contaron los conidios haciendo tres lecturas en un hemocitómetro (Neubauer Improved, Superior Marienfeld, Germany). A partir de cada solución madre se realizaron las diluciones necesarias para obtener las concentraciones de trabajo a  $1 \times 10^8$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ .

### **Viabilidad de conidios**

A partir de la suspensión madre de cada aislamiento fúngico se preparó otra suspensión con  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  y de ésta, se sembraron 10  $\mu\text{L}$  en el centro de cada una de dos áreas circulares marcadas en el reverso de cajas Petri con 15 mL de ADS, las cuales se incubaron por 20 h a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , HR de 60 %, en total oscuridad. Al final del periodo de incubación se colocó una gota de lactofenol azul de algodón para detener la germinación de conidios. Se contaron 100 conidios en cada área de siembra usando un microscopio compuesto (Zeiss Primo Star®) los cuales fueron observados a 40X, diferenciando a los germinados de los no germinados y se determinó el porcentaje de germinación mediante la fórmula: % de germinación = (total de conidios germinados / total de conidios germinados y no germinados) x 100 (Rivera, 1993). Se contaron en total 200 conidios por caja Petri y para cada aislamiento se cultivó una caja; el experimento se repitió 3 veces en diferente tiempo. Los conidios se consideraron germinados cuando el tubo germinativo fue más largo que el diámetro del conidio (Luz y Fargues, 1997).

### **Efecto de insecticidas en la germinación de conidios de *B. bassiana* y *M. anisopliae***

Se realizaron bioensayos de dosis-respuesta de los insecticidas en los aislamientos fúngicos. En todos ellos se usaron seis dosis y un testigo sin insecticida en cada una de tres repeticiones. Los insecticidas fueron mezclados con el medio de cultivo ADS a temperatura de 40-45°C, el cual sirvió como diluyente.

La dosificación de los insecticidas en el medio ADS se hizo en términos de concentración de ingrediente activo (i. a.) de formulaciones comerciales. Así la dosis de 1% de i. a. de lambda cialotrina (formulada con 5.15% de i. a., ver Cuadro 1) requirió 19.4 mL de insecticida comercial para 100 mL de medio de cultivo. Luego, partiendo de una solución madre al 1% ( $=10 \mu\text{L mL}^{-1}$ ) de i. a. de cada formulado comercial se hicieron cuatro diluciones sucesivas 1:10 hasta obtener una dilución 1:1,000,000 ( $=0.0001 \mu\text{L mL}^{-1}$ ), las cuales se filtraron en membranas de 0.2  $\mu\text{m}$  (Acrodisc® Syringe Filters) y de ellas se tomó la cantidad necesaria para agregarla al medio ADS para obtener las concentraciones deseadas de la mezcla agar-insecticida, misma que luego se homogenizó con vortex y se vació en porciones de 15 mL en cada caja Petri de 90 mm de diámetro. Todo el material empleado fue previamente esterilizado.

Una vez solidificada la mezcla agar-insecticida, los aislamientos se sembraron siguiendo el mismo procedimiento descrito para la evaluación de la viabilidad de conidios. El testigo consistió en agar libre de insecticida y, cuando se probaron varios insecticidas sobre un mismo aislamiento se usó un mismo testigo para todos ellos. Las cajas se incubaron a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , HR de 60%, en total oscuridad por 20-24 h. La germinación de conidios se detuvo colocando una gota de lactofenol azul de algodón y se procedió a determinar el porcentaje de germinación mediante el método descrito en la viabilidad de conidios. Para cada aislamiento se cultivó una caja Petri por concentración, la cual tuvo dos sitios de siembra como los descritos en la sección anterior. De cada bioensayo se realizaron 3 repeticiones independientes en el tiempo. Con estos

bioensayos se identificó a los insecticidas menos agresivos contra la germinación de los dos aislamientos de *B. bassiana* y de *M. anisopliae*.

### **Interacción de los aislamientos Bb88 y ETL con clorpirifós etil y spinosad en *S. frugiperda***

Se determinó que clorpirifós etil y spinosad fueron los insecticidas que menos afectaron la germinación de los conidios de los cuatro aislamientos evaluados y, que entre estos, Bb88 y ETL fueron los hongos menos sensibles a los insecticidas.

La interacción fue analizada para las combinaciones de hongo-insecticida determinadas como más compatibles mediante los bioensayos previos: Bb88 y ETL con clorpirifós etil y, los mismos hongos con spinosad. Para ello se utilizó la  $CL_{50}$  de clorpirifós etil ( $0.24 \mu\text{L mL}^{-1}$ ) y de spinosad ( $0.025 \mu\text{L mL}^{-1}$ ) con los aislamientos Bb88 y ETL (suspensión  $1 \times 10^8$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ) sobre larvas L3 del *S. frugiperda*. Las cuatro combinaciones resultantes se aplicaron a los insectos de prueba (larvas L3) en tres secuencias: 1) hongo seguido (a las 24 h) de insecticida (hongo/insecticida); 2) ambos simultáneamente (hongo-insecticida) y; 3) insecticida seguido de hongo (insecticida/hongo). En conjunto, las cuatro combinaciones con tres secuencias cada una, conformaron los siguientes doce tratamientos: en Bb88 con clorpirifós: Bb88/cl, Bb88-cl y cl/Bb88; en ETL con clorpirifós: ETL/cl, ETL-cl y cl/ETL; en Bb88 con spinosad: Bb88/sp, Bb88-sp y sp/Bb88 y; en ETL con spinosad: ETL/sp, ETL-sp y Sp/ETL. Adicionalmente, otros cinco tratamientos fueron agregados como testigos: testigo absoluto (agua con Tween 80 al 0.03%), testigo Bb88, testigo ETL, testigo de clorpirifós etil (cl), testigo de spinosad (sp). De esta manera se conformó un total de 17 tratamientos para este estudio.

Todos los tratamientos fueron aplicados por aspersion de 1 mL de la suspensión correspondiente en la torre de aspersion Potter a grupos de 15 o 20 larvas L3, dependiendo de la disponibilidad de organismos en cada ensayo. Cada tratamiento se aplicó a tres grupos de larvas

en cada una de tres repeticiones independientes. Una vez aplicados los tratamientos, las larvas se colocaron individualmente en recipientes plásticos de 4cm de diámetro x 4cm de alto con dieta artificial y se incubaron a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , HR de 60% y fotoperiodo 14:10 L:O.

Para inducir la esporulación, las larvas muertas se colocaron en cámara de humedad por 7 días. La esporulación, se tomó como evidencia de que el hongo infectó a la larva antes de su muerte.

### **Variables respuesta y su análisis**

En los bioensayos de dosis-respuesta en *S. frugiperda* la variable respuesta fue la mortalidad de las larvas tratadas con las diferentes concentraciones de cada uno de los insecticidas. La variable fue sometida a análisis Probit con el programa GenStat para determinar la  $CL_{50}$  de cada insecticida en el gusano cogollero. En dichos análisis no se incluyó el grupo testigo porque no hubo mortalidad en él.

La variable respuesta del efecto de los insecticidas en la germinación de los hongos fue la germinación de conidios sobre la mezcla agar-insecticida en cada una de 6 concentraciones de cada insecticida. Con dicha variable se determinaron la  $CL_{50s}$  de cada insecticida en cada hongo mediante análisis Probit con el programa GenStat. En el análisis no se incluyó el grupo testigo porque no hubo mortalidad en él.

En los bioensayos de interacción hongos con insecticidas se registraron dos variables, la mortalidad de las larvas tratadas y la esporulación de las larvas muertas en los tratamientos que

incluyeron alguno de los hongos. Ambas variables se analizaron mediante la Prueba de Proporciones con el programa Statistix V. 8.1 de Analytical Software.

Con los resultados de mortalidad y esporulación se formaron distintos contrastes de interés para determinar el efecto de los factores individuales: insecticidas, hongos y secuencias en ambas variables: mortalidad y esporulación.

## RESULTADOS

### Bioensayo de dosis-respuesta de los insecticidas en *Spodoptera frugiperda*

Las respectivas  $CL_{50}$  de los insecticidas clorpirifós etil, lambda cialotrina, metomilo y spinosad para larvas de *S. frugiperda* en L3 fueron 0.245, 0.017, 0.042 y 0.025  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro 2.  $CL_{50}$  de insecticidas en larvas de tercer ínstar de *Spodoptera frugiperda*.

Ingrediente activo	n	$CL_{50}$ ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ de i. a.)	Límites de confianza al 95%		Pendiente $\pm$ (es)	Ecuación de regresión
Clorpirifos etil	734	0.2455	0.2344	0.2568	5.512 (0.370)	8.36 + 5.51 x
Lambda cialotrina	691	0.0171	0.0138	0.0212	1.304 (0.080)	7.3 + 1.30 x
Metomilo	735	0.0426	0.0374	0.0480	2.286 (0.168)	8.13 + 2.28 x
Spinosad	630	0.0256	0.0202	0.0319	1.593 (0.178)	7.54 + 1.59 x

n, total de larvas L3 incluidas en el bioensayo; i. a., ingrediente activo; es, error estándar.

Para el insecticida Neeem (azadiractina al 3%) de Plant Health Care (PHC) no fue posible determinar la  $CL_{50}$  porque la mortalidad más alta obtenida a las 48 h fue menor al 50%

asperjando directamente el producto comercial sobre las larvas. Una primera muestra de este insecticida fue adquirida en tienda (Lote: 1208303-5) y, una segunda muestra fue proveída directamente por la empresa formuladora (PHC) en un bote de presentación comercial perteneciente a un lote de producción distinto (130417-1). Debido a ello, se decidió eliminar dicho insecticida en las siguientes fases de la investigación.

### **Efecto de insecticidas en la germinación de conidios de *B. bassiana* y *M. anisopliae***

El análisis de la toxicidad de los insecticidas sobre la germinación de los conidios mostró que los menos tóxicos fueron clorpirifós etil y spinosad, lo cual se dedujo por la mayor germinación observada en todos los aislamientos. Clorpirifós etil y spinosad permitieron germinaciones cercanas al 95% en los dos aislamientos de *B. bassiana* a partir de la concentración de 0.1  $\mu\text{L mL}^{-1}$  y menores a ésta y; de 63.5% ( $\pm 1.32$ ) y 87.33% ( $\pm 0.88$ ), respectivamente, para el aislamiento ETL y; de 9.5% ( $\pm 0.5$ ) y 28.5% ( $\pm 1.04$ ), en el mismo orden, para MGC 07 (Cuadro 3), implicando que las cepas de *M. anisopliae* fueron más sensibles a los cuatro insecticidas que las cepas de *B. bassiana*.

Tres insecticidas (clorpirifos etil, lambda cialotrina y spinosad) inhibieron el 100% de la germinación de conidios de los cuatro aislamientos en la mayor concentración evaluada (10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) (Cuadro 3) y, metomilo, a esta misma concentración, permitió el 6.5% de germinación de Bb, la cual se estimó irrelevante. La germinación de esporas en el testigo de Bb, Bb88 y ETL fue mayor del 90% en todos los casos, mientras que en MGC 07 fue del 86% (Cuadro 3).

Cuadro 3. Germinación de conidios de los aislamientos Bb y Bb88 (de *B. bassiana*), ETL y MGC 07 (de *M. anisopliae*) bajo diferentes concentraciones de cuatro insecticidas.

Insecticidas	Aislamiento	concentraciones de insecticidas ( $\mu\text{L mL}^{-1}$ )						
		10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001	testigo

		% de germinación de esporas						
clorpirifos etil	Bb	0	76.50±1.04	97.17±1.01	95.83±0.72	96.00±0.28	97.00±1.04	97.83±0.72
	Bb88	“	84.83±0.72	94.67±0.60	96.17±0.72	97.17±0.16	97.33±0.33	98.33±0.44
	ETL	0	48.83±1.58	63.50±1.32	72.50±2.08	82.17±0.44	83.67±2.52	92.00±0.57
	MGC 07	“	2.83±1.30	9.50±0.50	11.83±1.01	16.17±1.96	41.50±0.86	86.33±1.45
lambda cialotrina	Bb	0	0	96.17±0.66	95.83±0.83	95.17±0.44	96.67±0.88	97.83±0.72
	Bb88	“	0	82.67±1.45	95.50±1.25	97.00±1.15	98.17±0.44	98.33±0.44
	ETL	0	0	33.33±1.74	75.83±2.16	88.67±1.58	89.50±0.86	92.00±0.57
	MGC 07	“	“	22.50±1.25	61.33±1.36	71.83±0.88	60.67±1.2	86.33±1.45
metomilo	Bb	6.50±1.04	67.67±1.01	94.17±0.83	95.33±1.36	96.33±1.16	96.83±1.16	97.83±0.72
	Bb88	0	34.33±1.16	96.50±0.57	97.17±0.16	94.33±1.2	95.83±0.92	98.33±0.44
	ETL	0	32.33±1.16	53.83±0.72	66.33±1.30	62.50±0.76	64.50±0.76	92.00±0.57
	MGC 07	“	3.33±0.88	26.00±0.50	25.17±1.69	22.00±1.00	16.17±1.01	86.33±1.45
spinosad	Bb	0	91.00±0.57	93.50±0.57	92.83±1.48	94.83±0.16	97.00±0.28	97.83±0.72
	Bb88	“	94.83±0.72	97.33±0.44	98.83±0.92	99.00±0.50	98.83±0.72	98.33±0.44
	ETL	0	2.83±0.33	87.33±0.88	83.00±0.86	80.67±1.48	79.33±0.60	92.00±0.57
	MGC 07	“	11.83±1.01	28.50±1.04	32.33±1.01	36.83±0.60	41.33±0.44	86.33±1.45

Las CL<sub>50s</sub> determinadas para los insecticidas en las cuatro cepas se consignan en el Cuadro 4 y, de ellas se destacan las correspondientes a clorpirifós etil y spinosad (los insecticidas menos tóxicos para hongos) sobre los aislamientos Bb88 y ETL (los más resistentes a los insecticidas).

La CL<sub>50</sub> de clorpirifós etil y spinosad sobre los conidios de Bb88, fue de 1.404  $\mu\text{L mL}^{-1}$  y 2.689  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , respectivamente (Cuadro 4), mientras que en ETL fue de 0.118  $\mu\text{L mL}^{-1}$  y 0.059  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , respectivamente.

Cuadro 4. CL<sub>50</sub> de los insecticidas en la germinación de conidios de los aislamientos Bb y Bb88 de *B. bassiana* y, ETL y MGC 07 de *M. anisopliae*.

Ingrediente activo	Aislamiento	n	CL <sub>50</sub> (LC 95%)	Pendiente ±(es)	Ecuación de regresión
Clorpirifos etil	Bb	600	0.856 (0.463-1.732)	-0.791 (0.093)	4.947 - 0.791 x
	Bb88	“	1.404 (0.512-4.063)	-0.979 (0.107)	5.144 - 0.979 x
	ETL	“	0.118 (0.032-0.538)	-0.45 (0.075)	4.582 - 0.45 x

	MGC07	“	1.594x10 <sup>-5</sup> (3.376x10 <sup>-6</sup> - 4.715x10 <sup>-5</sup> )	-0.410 (0.040)	3.03 - 0.410 x
	Bb	600	0.856 (0.463-1.732)	-0.791 (0.093)	4.947 - 0.791 x
Lambda	Bb88	“	0.155 (0.058-0.413)	-0.979 (0.107)	4.207 - 0.979 x
cialotrina	ETL	“	0.020 (0.010-0.041)	-0.836 (0.094)	3.587 - 0.836 x
	MGC07	“	0.003 (0.0008-0.009)	-0.552 (0.086)	3.622 - 0.552 x
	Bb	600	0.856 (0.463-1.732)	-0.791 (0.093)	4.947 - 0.791 x
	Bb88	“	0.392 (0.147-1.069)	-0.979 (0.107)	4.602 - 0.979 x
Metomilo	ETL	“	0.014 (0.002-0.074)	-0.339 (0.066)	4.377 (0.152)
	MGC07	“	5.01x10 <sup>-8</sup> (0 - 1.491x10 <sup>-5</sup> )	-0.184 (0.064)	3.654 - 0.184 x
	Bb	600	0.856 (0.463-1.732)	-0.791 (0.093)	4.947 - 0.791 x
	Bb88	“	2.689 (0.953-8.22)	-0.979 (0.107)	5.421 - 0.979 x
Spinosad	ETL	“	0.059 (0.008-0.490)	-0.560 (0.133)	4.313 - 0.560 x
	MGC07	“	7.767x10 <sup>-5</sup> (4.516x10 <sup>-6</sup> - 0.0004)	-0.289 (0.044)	3.810 - 0.289 x

n, total de conidios evaluados; CL<sub>50</sub>, concentración letal media en µL/mL de i. a; LC, límites de confianza al 95%; es, error estándar.

En presencia de clorpirifós, el 50% de esporas de Bb88 germinaron a una concentración 5.7 veces mayor a la CL<sub>50</sub> determinada en las larvas del gusano cogollero y, en presencia de spinosad, el 50% de las esporas germinadas de Bb88 y ETL fue 105 veces y 2.3 veces mayor, respectivamente, a la correspondiente CL<sub>50</sub> determinada en *S. frugiperda*. Mientras que, la concentración a la que germinó el 50% de esporas de ETL en presencia de clorpirifós etil fue 2.08 veces menor a la correspondiente CL<sub>50</sub> en las larvas del gusano cogollero (Cuadro 5).

Cuadro 5. CL<sub>50</sub> de clorpirifós etil y spinosad en *Spodoptera frugiperda* y, concentración de los mismos insecticidas que permitieron el 50 y 85% de germinación de los hongos Bb88 y ETL.

Ingrediente activo	Dosis recomendada (mg/mL)	CL <sub>50</sub> en <i>S. frugiperda</i>	CG <sub>50</sub> en los hongos		CG <sub>85</sub> en los hongos	
			Bb88	ETL	Bb88	ETL
clorpirifós etil	0.55-0.83	0.2455	1.404	0.118	0.1226	0.00058
spinosad	0.087-0.116	0.0256	2.689	0.059	0.2351	0.00083

CL<sub>50</sub>, concentración letal media en µL/mL de i. a; CG<sub>50</sub>, concentración de germinación media de esporas en µL/mL de i. a; CG<sub>85</sub>, concentración de germinación del 85% de esporas en µL/mL de i. a. La concentración de campo se calculó para un gasto de 400 L de agua/ha.

### Interacción de los aislamientos Bb88 y ETL con clorpirifós etil y spinosad en *S. frugiperda*

## Efecto de los insecticidas en la mortalidad

Los resultados de mortalidad y esporulación observados en los distintos tratamientos se presentan en el Cuadro 6.

Fueron tres los principales efectos de los insecticidas en la mortalidad: 1) las cuatro combinaciones de insecticidas con hongos fueron superiores a los testigos de hongo ( $P < 0.0001$ ); 2) las combinaciones de clorpirifós etil con los hongos causaron menor mortalidad que el testigo de clorpirifós solo ( $P = 0.0133$ ), mientras que las combinaciones de spinosad con ambos hongos dieron igual mortalidad que su testigo de spinosad ( $P = 0.1468$ ) y; 3) cada insecticida indujo el mismo nivel de mortalidad con los dos aislamientos: clorpirifós con Bb88 ( $263/520 = 0.5057$ ) y, con ETL, ( $292/520 = 0.5615$ ) ( $P = 0.0715$ ); y spinosad con Bb88 ( $227/441 = 0.5147$ ) y spinosad con ETL ( $220/441 = 0.4988$ ) ( $P = 0.6373$ ) (Figura 1).

Cuadro 6. Mortalidad y esporulación de larvas de tercer ínstar de *Spodoptera frugiperda* tratadas con las combinaciones insecticidas y aislamientos fúngicos (Bb88 o ETL) en distintas secuencias.

Tratamiento	n	Muertos	Mortalidad de larvas ( $\pm$ es)	Larvas esporuladas	Esporulación de larvas tratadas ( $\pm$ es)
Bb88	320	3	0.0086 (0.005)	3	0.0086 (0.005)
ETL	320	1	0.0032 (0.003)	1	0.0032 (0.003)
cl	173	108	0.6256 (0.037)	N/A	N/A
sp	147	65	0.4409 (0.041)	N/A	N/A
Testigo absoluto	107	1	0.0083 (0.009)	N/A	N/A
Bb88/cl	173	78	0.4516 (0.038)	7	0.0403 (0.015)
Bb88-cl	174	75	0.4321 (0.038)	70	0.4022 (0.037)
cl/Bb88	173	110	0.6360 (0.037)	3	0.0122 (0.010)
ETL/cl	173	87	0.5022 (0.038)	11	0.0635 (0.019)
ETL-cl	173	94	0.5433 (0.038)	67	0.3872 (0.037)
cl/ETL	174	111	0.6382 (0.018)	7	0.0401 (0.015)
Bb88/sp	147	66	0.4436 (0.041)	1	0.0065 (0.007)
Bb88-sp	147	87	0.5914 (0.041)	69	0.4682 (0.041)
sp/Bb88	147	74	0.5060 (0.041)	43	0.2884 (0.038)

ETL/sp	147	80	0.5473 (0.041)	4	0.0261 (0.013)
ETL-sp	147	67	0.4573 (0.041)	46	0.3089 (0.038)
sp/ETL	147	73	0.5001 (0.041)	56	0.3780 (0.040)

n, total de larvas L3 evaluadas; cl, clorpirifós etil; sp, spinosad; es, error estándar.

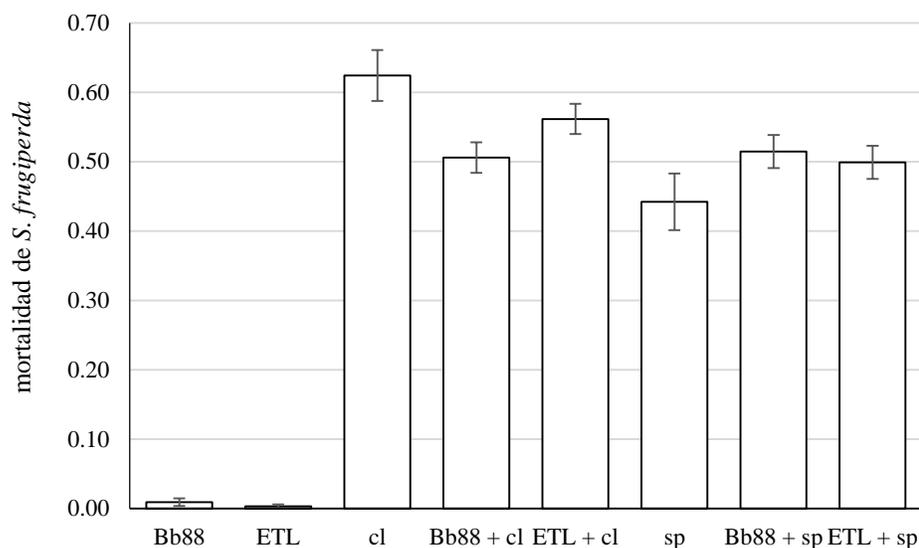


Figura 1. Efecto de las combinaciones de los aislamientos Bb88, de *Beauveria bassiana* y ETL, de *Metarhizium anisopliae* con los insecticidas clorpirifós etil, spinosad en la mortalidad de larvas L3 de *Spodoptera frugiperda*. Las barras indican el error estándar.

### Efecto de los hongos en la mortalidad

En un nivel de análisis global se detectaron dos efectos principales de los hongos en la mortalidad: 1) un efecto antagonista en su combinación con clorpirifós, manifestado por una menor mortalidad en la combinación ( $555/1040=0.5336$ ) que en el insecticida solo ( $108/173=0.6256$ ) ( $P=0.0266$ ) (Figura 2) y, 2) un efecto neutro en la combinación con spinosad, la cual causó la misma mortalidad en la combinación ( $447/882=0.5068$ ) que con el insecticida solo ( $65/147=0.4409$ ) ( $P=0.1468$ ) (Figura 2).

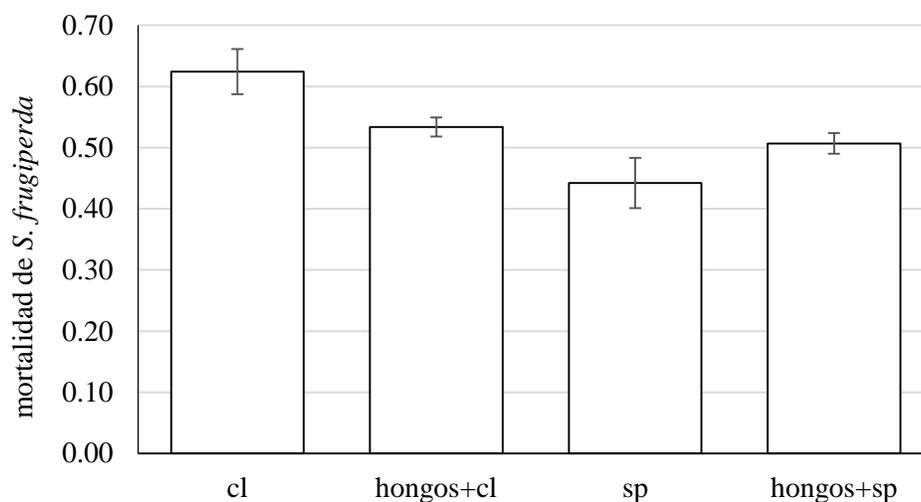


Figura 2. Efecto general de los aislamientos Bb88 y ETL en la mortalidad de larvas L3 de *Spodoptera frugiperda* tratadas con las combinaciones de esos aislamientos con los insecticidas clorpirifós etil y spinosad. Las barras indican el error estándar.

En el nivel de combinaciones individuales se detectó que el antagonismo referido arriba ocurrió en la combinación de Bb88 con clorpirifós: la mortalidad que ésta produjo ( $263/520=0.5057$ ) fue menor que la de clorpirifós solo ( $108/173=0.6256$ ) ( $P=0.0068$ ). Con las combinaciones de ETL con clorpirifós ( $292/520=0.5615$ ), Bb88 con spinosad ( $227/441=0.5147$ ) y ETL con spinosad ( $220/441=0.4988$ ), las mortalidades fueron semejantes a las de los respectivos testigos de insecticida ( $P \geq 0.1275$ ) (Figura 1), implicando que no hubo efecto de los hongos en la mortalidad producida por esas combinaciones.

### **Efecto de las secuencias en la mortalidad**

Las secuencias de aplicación de las combinaciones generaron tres tipos de efectos: un efecto sinérgico (incremento en la mortalidad), un efecto antagónico (reducción de mortalidad) y un efecto neutro. El primero resultó en 34% de mayor mortalidad con la secuencia Bb88-sp (aplicación simultánea) ( $87/147=0.5914$ ), con relación al insecticida control ( $65/147=0.4409$ ) ( $P=0.0102$ ). El segundo efecto (antagonismo) fue exclusivo de las secuencias Bb88/cl y Bb88-cl,

manifestado en baja mortalidad ( $78/173=0.4516$  y  $75/174=0.4321$ , respectivamente) en relación con el insecticida control ( $108/173=0.6256$ ) ( $P \leq 0.0012$ ) (Figure 3). El tercer efecto de las secuencias fue la neutralidad (o ausencia de efecto), el cual consistió en igual mortalidad con las secuencias de ETL con spinosad (Figura 4) y en menor grado con las secuencias de ETL con clorpirifós (Figura 3).

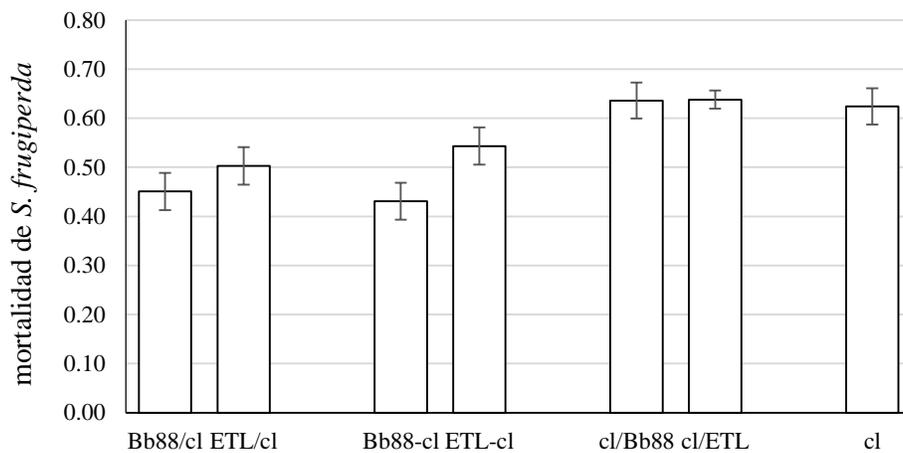


Figura 3. Efecto de las secuencias de aplicación de las combinaciones de los aislamientos Bb88 y ETL con clorpirifós en la mortalidad de larvas L3 de *Spodoptera frugiperda*. Las barras indican el error estándar.

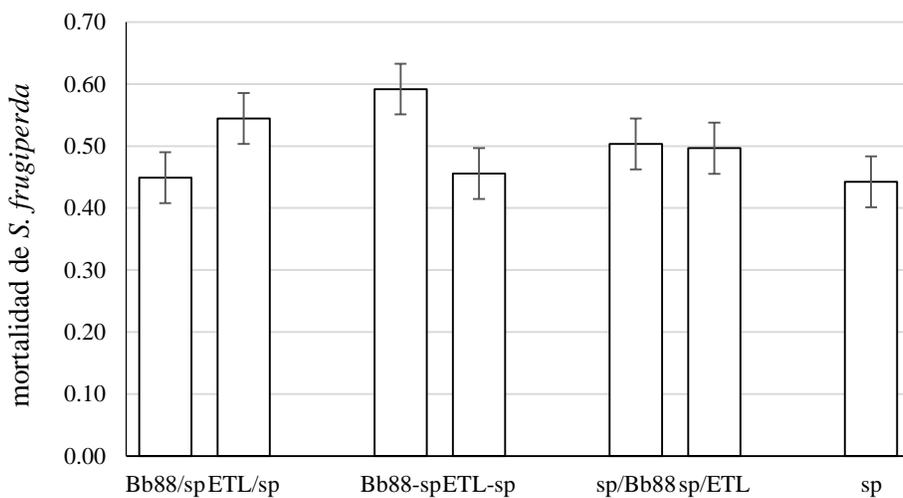


Figura 4. Efecto de las secuencias de aplicación de las combinaciones de los aislamientos Bb88 y ETL con spinosad en la mortalidad de larvas L3 de *Spodoptera frugiperda*. Las barras indican el error estándar.

### **Efecto de los insecticidas en la esporulación**

La esporulación de las larvas muertas es un indicador de que los hongos infectaron a las larvas antes de su muerte. Los datos de este estudio indican que hubo mayor infección (esporulación) en larvas tratadas con las combinaciones (384/1922=0.199) que con los testigos fúngicos (4/640=0.0062) ( $P < 0.0001$ ), indicando que los insecticidas redujeron la resistencia natural de *S. frugiperda* a los hongos. Spinosad indujo mayor tasa de esporulación (219/882=0.2482) que clorpirifós (165/1040=0.1586) ( $P < 0.0001$ ) (Figura 5).

### **Efecto de los hongos en la esporulación**

Los hongos no tuvieron influencia en la esporulación (infección) de las larvas tratadas con las combinaciones de hongos con insecticidas, lo cual se evidencia porque ambos produjeron el mismo nivel de esporulación con cada uno de los insecticidas: aproximadamente el 15% en combinación con clorpirifós (Bb88, 80/520=0.1538 y ETL, 85/520=0.1634) ( $P = 0.6713$ ); en tanto que, en combinación con spinosad, fue del 25%, aproximadamente (Bb88, 113/441=0.2562 y ETL, 106/441=0.2403) ( $P = 0.5854$ ) (Figura 6).

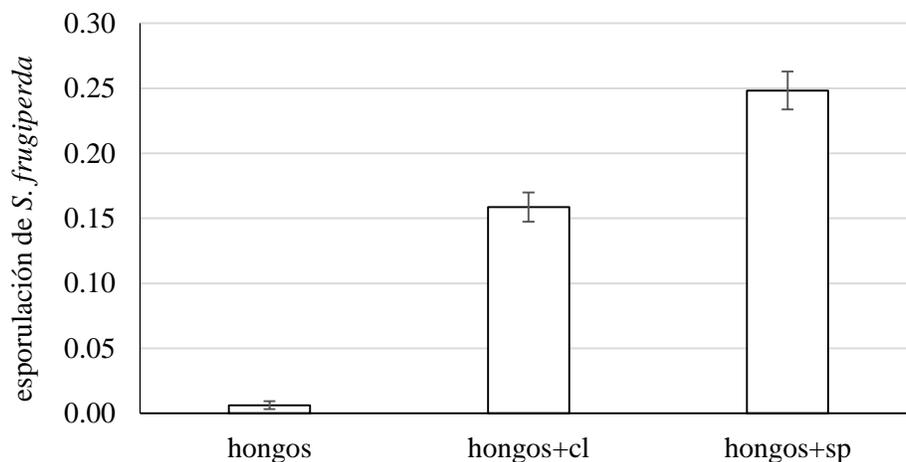


Figura 5. Efecto de los insecticidas en la esporulación de larvas L3 de *Spodoptera frugiperda* tratadas con combinaciones de los aislamientos Bb88 y ETL con clorpirifós (cl) y spinosad (sp). Las barras indican el error estándar.

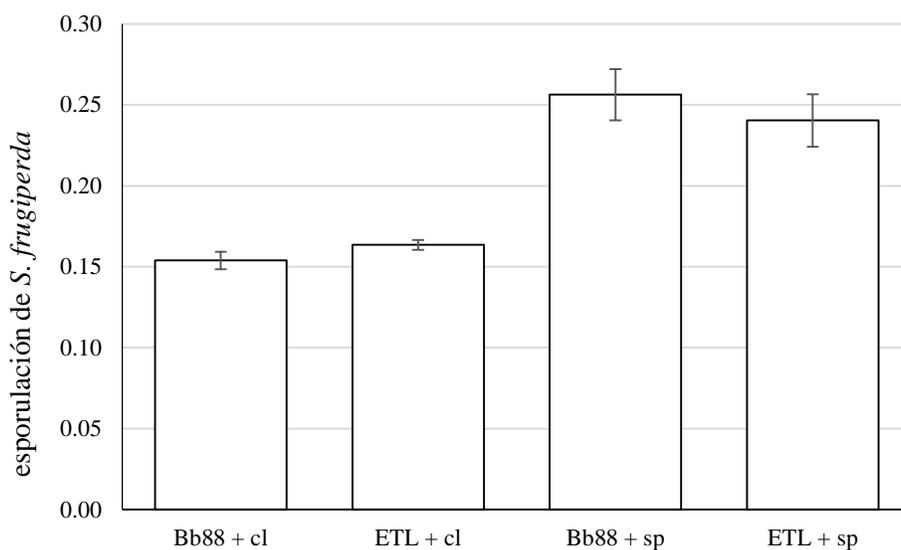


Figura 6. Efecto de los hongos en la esporulación de larvas L3 de *Spodoptera frugiperda* tratadas con las combinaciones de los aislamientos Bb88 y ETL con clorpirifos y spinosad. Las barras indican el error estándar.

**Efecto de las secuencias en la esporulación**

Las secuencias también tuvieron efecto sobre la esporulación. De manera general, la primera secuencia, hongos/insecticidas, ( $23/640=0.0359$ ) fue menor que la segunda, hongos-

insecticidas, (256/641=0.3993) ( $P<0.0001$ ) y ésta, mayor que la tercera, insecticidas/hongos, (109/641=0.1700) ( $P<0.0001$ ). Este mismo patrón se observó en las secuencias de cada insecticida con ambos hongos.

En las combinaciones individuales las secuencias tuvieron efectos relevantes sobre la esporulación. En las combinaciones de clorpirifós etil con Bb88 y con ETL, sus respectivas segunda secuencias (70/174=0.4022, en Bb88-cl y 67/173=0.3872, en ETL-cl) produjeron mayor esporulación que las otras dos ( $P\leq 0.0001$ ) (Figura 7).

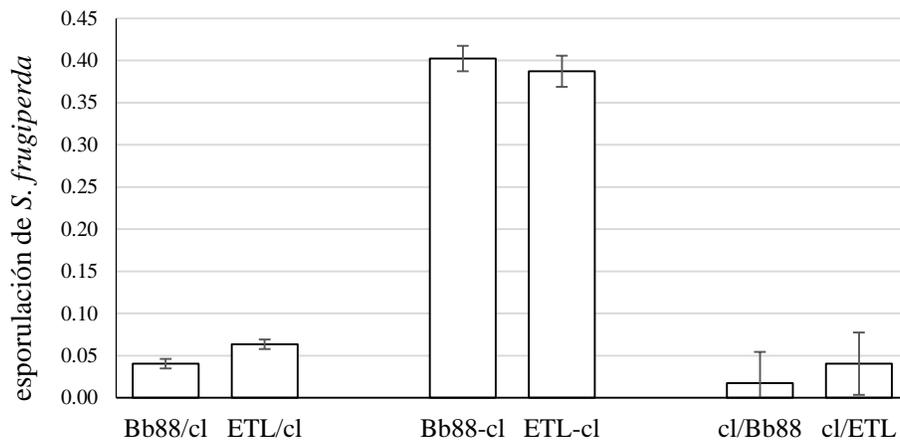


Figura 7. Efecto de las secuencias de aplicación en la esporulación de larvas L3 de *Spodoptera frugiperda* tratadas con combinaciones de los aislamientos Bb88 y ETL con clorpirifos. Las barras indican el error estándar.

La esporulación en las secuencias de la combinación de spinosad con Bb88 fue mayor en la segunda, Bb88-sp, (69/147=0.4693) que en las otras dos ( $P<0.0001$ ); en tanto que, en la combinación de ETL con spinosad, la esporulación en la segunda secuencia, ETL-sp, (46/147=0.30) fue semejante a la tercera (56/147=0.3809) ( $P=0.2205$ ) y ambas superiores a la primera ( $P<0.0001$ ) (Figura 8).

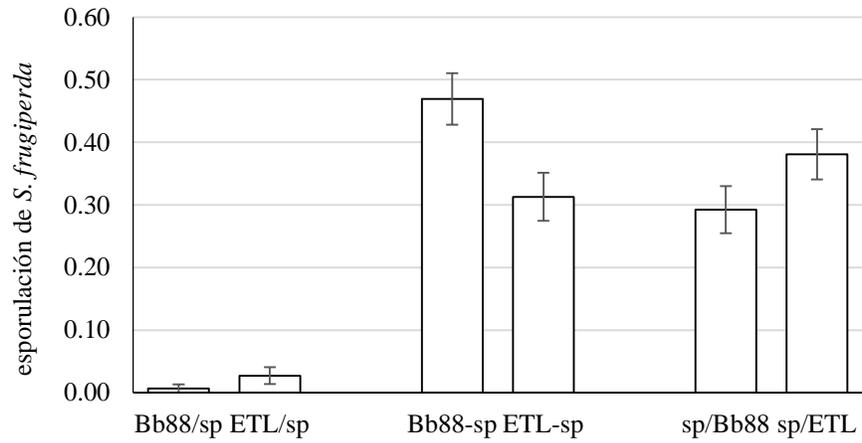


Figura 8. Efecto de las secuencias de aplicación en la esporulación de larvas L3 de *Spodoptera frugiperda* tratadas con combinaciones de los aislamientos Bb88 y ETL con spinosad. Las barras indican el error estándar.

## DISCUSIÓN

### **Bioensayo de dosis-respuesta de los insecticidas en *Spodoptera frugiperda***

De menos a mayor toxicidad sobre las larvas de gusano cogollero, el orden de los cinco insecticidas evaluados es el siguiente: clorpirifos etil, metomilo, spinosad y lambda cialotrina. El mismo orden de toxicidad fue determinado parcialmente en el trabajo de Yu (1992) para una población de *S. frugiperda* de Florida, E.U.A. y también en el Ríos-Diez *et al.* (2011) para otra población en Colombia, por lo que muy probablemente ese orden de toxicidad sea válido para cualquier población de gusano cogollero en el mundo.

### **Efecto de insecticidas en las germinación de conidios de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.**

Los resultados de germinación de los conidios de los distintos hongos sugieren que la susceptibilidad de los aislamientos es dependiente tanto del propio aislamiento, como de la especie y del género del hongo. En presencia de clorpirifós, la germinación de esporas de las cepas de *B. bassiana* (Bb y Bb88) superaron el 90% en una concentración 0.4 veces menor a la  $CL_{50}$  determinada en larvas de *S. frugiperda* y, por arriba del 60% en las esporas de ETL con una concentración también 0.4 veces menor que la respectiva  $CL_{50}$  sobre larvas de *S. frugiperda*. Mientras que, en presencia de spinosad la germinación de esporas de Bb y Bb88 superó el 90% a una concentración 40 veces mayor a la  $CL_{50}$  determinada en las larvas del gusano cogollero, y del 80% en las esporas de ETL con una concentración 4 veces mayor que la respectiva  $CL_{50}$  en el gusano cogollero.

La germinación de esporas del aislamiento MCG 07, de *M. anisopliae*, fue menor al 42% en la menor concentración evaluada ( $0.0001 \mu\text{L mL}^{-1}$ ), lo cual indica que, de los cuatro hongos evaluados, éste fue el más susceptible a clorpirifós etil y spinosad. Por lo tanto, el buen

desempeño de las combinaciones hongo con insecticida depende de cada combinación particular, como lo muestran nuestros datos.

Nuestros resultados sustentan el hecho de que las concentraciones inferiores a las recomendadas en campo no afectan la germinación de los entomopatógenos fúngicos. La concentración de clorpirifós a la que germinó el 85% de esporas de Bb88 y ETL fue 6.7 y 1,431 veces menor, respectivamente, a la recomendada en campo (Cuadro 5). Mientras que, la concentración de spinosad a la que germinó el 85% de esporas de Bb88 fue 2 veces mayor a la recomendada y, para ETL fue 139 veces menor (Cuadro 5). Anderson y Roberts (1983) respaldan nuestros resultados al indicar que la germinación de conidios de *B. bassiana* no fue afectada al estar en contacto con dosis inferiores a las recomendadas de los insecticidas permetrina, carbaril, oxamil, carbufuran y azinfos metil así como de spinosad (Gosselin *et al.*, 2009).

### **Interacción de los aislamientos Bb88 y ETL con clorpirifós etil y spinosad en *S. frugiperda***

Mediante la secuencia Bb88-sp se alcanzó el propósito de incrementar la mortalidad de las larvas por arriba del testigo de insecticida; sin embargo, el incremento alcanzado parece insuficientemente competitivo para efectos agronómicos; no obstante, ese hallazgo constata que esta técnica tiene potencial para mejorar el control de las plagas si se encuentran las combinaciones adecuadas. Se estima que, si la infectividad natural de los aislamientos fúngicos usados en este trabajo hubiera sido mayor sobre el huésped, como la observada en los aislamientos estudiados por García *et al.* (2011) (mayor al 60% con  $1 \times 10^8$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ) muy posiblemente habría sido mayor la ganancia de mortalidad y, quizás también, más generalizada en las distintas combinaciones de los hongos con insecticidas, porque eso se ha obtenido en

varios trabajos (Anderson *et al.*, 1989; Ericsson *et al.*, 2007; Gosselin *et al.*, 2009; Ekesi *et al.*, 2011) donde la infectividad de los hongos solos es relevante.

La baja mortalidad causada por los hongos solos (<1%) se debió a la alta resistencia natural de las larvas de *S. frugiperda* y no a la falta de viabilidad de los inóculos usados en este estudio, lo cual se evidenció al obtener mortalidades de 80 y 100% con Bb88 y ETL, respectivamente, en larvas de *Galleria mellonella* y de 20% y 45% en adultos de *Callosobruchus maculatus*, en el mismo orden, usando alícuotas de las mismas suspensiones de esporas aplicadas en los tratamientos.

La mortalidad observada se debió más a los insecticidas que a los hongos. Aunque muchas de las larvas muertas estuvieron infectadas por los hongos, ellas murieron sin mostrar signos de la infección, la cual fue evidente al obtener esporulación en los cadáveres sometidos a la cámara de humedad. Dicha evidencia sugiere que la muerte de las larvas fue provocada por los insecticidas antes que los hongos completaran su desarrollo en los huéspedes.

La esporulación *post mortem* (manifestación de la infección de las larvas en vida) de ambos aislamientos fue mayor en combinación con los insecticidas que en los testigos de hongo solo, evidenciando que los insecticidas rompieron la resistencia natural de las larvas a los hongos y que éstos pudieron infectarlas bajo el efecto de las combinaciones de hongos con insecticidas.

El antagonismo observado entre Bb88 y clorpirifós es un hallazgo inesperado y encontramos pocas referencias a este fenómeno entre hongos e insecticidas, por ejemplo Gosselin *et al.* (2009), quien lo encontró en una de sus combinaciones, pero no lo explicó. En el presente estudio, ese antagonismo ocurrió solo cuando el hongo se aplicó antes o simultáneamente con el insecticida. Se estima que la causa más probable de ese antagonismo fue algún factor enzimático producido por el hongo en el medio de cultivo, el cual fue extraído junto

con las esporas durante la preparación de la suspensión madre de conidios y, que dicho factor actuó directamente sobre el clorpirifós en la aplicación simultánea y, también residualmente, cuando el insecticida se aplicó 24 hr después que el hongo.

Esta interpretación tiene apoyo en el antecedente de que a *B. bassiana*, *Isaria fumosoroseus* y, en menor grado, a *M. anisopliae* se les determinó capacidad para producir esterasas y glutatión S-transferasas (GST) (Ramzi y Zibae, 2014), ambas conocidas por su capacidad para degradar insecticidas en insectos (Srinivas *et al.*, 2004; Kostaropoulos *et al.* 2001).

La no detección de antagonismo entre Bb88 y spinosad sugiere que el factor del hongo que produjo el antagonismo con clorpirifós, no actúa sobre esta otra molécula ni interfiere en su ruta metabólica en el insecto. Al respecto, el trabajo de Wang *et al.*, (2009) indica que spinosad es metabolizado por el citocromo P450 monooxigenasa en *Helicoverpa armígera*.

Las secuencias de aplicación tuvieron un efecto importante en la esporulación. La segunda secuencia de todas las combinaciones de hongo con insecticida (aplicación simultánea) produjo la mayor esporulación: 39% de las larvas tratadas (=93% de las larvas muertas); la tercera secuencia (el hongo después del insecticida) produjo 17% (=28.8% de las larvas muertas). Lo cual indica que la facilitación de la infección inducida por estos insecticidas fue máxima en la aplicación simultánea y que disminuyó en el lapso de 24 horas que hubo entre la aplicación del insecticida y el hongo en la tercera secuencia. Se estima que el mecanismo facilitador podría ser el estrés bioquímico que los insecticidas ocasionan en los insectos (Phillip *et al.*, 1991).

El factor hongo no tuvo efecto sobre la esporulación. Ambos hongos combinados con clorpirifós etil infectaron (esporularon) aproximadamente al 15% de las larvas tratadas y,

combinados con spinosad, ambos infectaron al 25%, aproximadamente, lo cual implica que los factores importantes para la infección fueron los insecticidas y la secuencia de aplicación.

### LITERATURA CITADA

- Alazogaray, R., C. Luz, G. Ionizete, I. Silva, R. Lecuona and M. Tigano 1998. Effect of deltamethrin on germination and virulence of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. on *Triatoma infestans* (Klug). An. Soc. Entomol. Brasil. 27: 663- 667.
- Alean, I. C. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homóptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá, D. C. Colombia.
- Amutha, M., J. Gulsar Banu, T. Surulivelu and N. Gopalakrishnan. 2010. Effect of commonly used insecticides on the growth of white Muscardine fungus, *Beauveria bassiana* under laboratory conditions. Journal of Biopesticides. 3:(1 Special Issue) 143-146.
- Anderson, T. E., A. E. Hajek, D. W. Roberts, H. K. Preisler and J. L. Robertson. 1989. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): effects of combinations of *Beauveria bassiana* with insecticides. Journal of Economical Entomology. 82 (1): 83-89.
- ATSDR (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades). 2003. [En línea]. Disponible en [http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs155.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs155.pdf) (consultado noviembre de 2014).
- Baffi, M., G. Rocha, C. Soares, C. Ceron y A. Bonetti. 2008. Esterase enzymes involved in pirethroid and organophosphate resistance in a Brazilian population of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acar, Ixodidae). Molecular Biochemistry Parasitology. 160: 70-73.
- Bahena, J. F. 2013. Uso de feromonas sexuales para el manejo del gusano cogollero del maíz en agricultura de conservación. Enlace. 14(4): 27-30.
- Banda, T. J. F., S. D. Enkerlin, F. G. De Alba, B. L. E. Garza. 1981. Importancia económica de *Heliothis zea* (Boddie) y determinación del umbral económico, distribución matemática y muestreo secuencial de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) en maíz criollo. Fitófilo 85: 101-118.
- Bartlett, B. R. 1975. Integración del control químico y del biológico. In: DeBach, P. (ed.) Biological control of insect pests and weeds. London. Pp 949.
- Bayer CropScience México. 2007. Bayer de México, S.A. de C.V. México. [En línea]. Disponible en <http://www.bayercropscience.com.mx> (consultado septiembre de 2014).
- Behle, W. R. 2006. Importance of direct spray and spray residue contact for infection of *Trichoplusia ni* larvae by field applications of *Beauveria bassiana*. J. Econ. Entomol. 99: 1120-1128.
- Bisset, J. A., M. M. Rodríguez, D. Molina, C. Díaz y L. A. Soca. 2001. Esterasas elevadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Aedes aegypti*. Rev. Cubana Med. Trop. 53(1): 37-43.

- Blanco, C. A., M. Portilla, J. L. Jurat-Fuentes, J. F. Sánchez, D. Viteri, P. Vega-Aquino, A. P. Terán-Vargas, A. Azuara-Domínguez, J. D. López, Jr., R. Arias, Yu-Cheng Zhu, D. Lugo-Barrera and R. Jackson. 2010. Susceptibility of isofamilies of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac and Cry1Fa proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Southwestern Entomologist*. 35(3):409-415.
- Braman, S. K., R. R. Duncan, W. W. Hanna, and M. C. Engelke. 2004. Turfgrass species and cultivars influences on survival and parasitism of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 97: 1993-1998.
- Campbell, R. K. T. E. Anderson, M. Semel and D. W. Roberts. 1985. Management of the colorado potato beetle using the entomopatogenous fungus *Beauveria bassiana*. *Am. Potato J.* 62:29-37.
- Capinera, J. L. 1995. Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS). pp 1-6.
- Carballo, V. M., L. Rodríguez y J. Durán. 2001. Evaluación de *Beauveria bassiana* para el control del picudo del chile en laboratorio. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. 62: 54-59.
- Cardona, M.C. 1998. Entomología económica y manejo de plagas. Palmira: Universidad Nacional de Colombia. p.99.
- Carneiro, A. A., E. A. Gomes, C. T. Guimarães, F. T. Fernandes, N. P. Carneiro and I. Cruz. 2008. Molecular characterization and pathogenicity of isolates of *Beauveria* spp. to fall armyworm. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 43(4): 513-520.
- Carrillo-Benítez, M. G., A. W. Guzmán-Franco, R. Alatorre-Rosas, and J. N. Enríquez-Vara. 2013. Diversity and genetic population structure of fungal pathogens infecting white grub larvae in agricultural soils. *Microbial Ecology*. 65(2): 437-449.
- Carson, R. 1962. *Silent Spring*. Ed. Mariner Books. Boston: Houghton Mifflin. 400 p.
- Cazorla, D. y M. P. Morales. 2010. Compatibilidad de 13 aislamientos de *Beauveria bassiana* patógenos para *Rhodnius prolixus* (Triatominae) con insecticidas químicos. *Bol. Mal. Salud Amb. Vol. L (2)*: 261-270.
- CESAVEG (Comité Estatal de Sanidad Vegetal Guanajuato). 2012. Campaña manejo fitosanitario de maíz. Plagas y enfermedades en maíz. [En línea]. Disponible en <http://www.cesaveg.org.mx/2012/> (consultado agosto de 2014).
- Cossio-Bayugar, R., R. Barhoumi, R. Burghardt, G. Gale and P. Holman. 2002. Basal cellular alterations of esterase, glutathione, glutathione s-transferase, intracellular calcium, and membrane potentials in coumaphos-resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Cell Lines. *Pesticide Biochemistry Physiology*. 72: 1-9.
- De la Rosa, W., R. Alatorre-Rosas, J. Trujillo and J. F. Barrera. 1997. Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) strains against the coffee borer (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Economic Entomology*. 90: 1534-1538.

- De la Rosa, W., R. Alatorre-Rosas, J. F. Barrera y C. Toreillo. 2000. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) under field conditions. *J. Econ Entomol.* 93: 1409-1414.
- Domsch, K. H., W. Gams and T. H. Anderson. 1993. Compendium of soil fungi. Institute of Soil Biology. Federal Agricultural Research Centre. 845pp. Gubler, D. J. 1998. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 480-496.
- Ekesi, S., N. K. Maniania & S. A. Mohamed. 2011. Efficacy of soil application of *Metarhizium anisopliae* and the use of GF-120 spinosad bait spray for suppression of *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae) in mango orchards, *Biocontrol Science and Technology*, 21:3, 299-316.
- Ericsson, J. D., J. T. Kabaluk, M. S. Goettel and J. H. Myers. 2007. Spinosad interacts synergistically with the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* against the exotic wireworms *Agriotes lineatus* and *Agriotes obscurus* (Coleoptera: Elateridae). *Journal of Economic Entomology*, 100(1):31-38.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 1997. Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos. E. D. Ongley. Estudio FAO: riego y drenaje No. 55, FAO, Roma.
- Ferron, P. 1985. Fungal control. pp. 313-346. *In*: Kerkut, G. A. and L. I Gilbert (Eds.). *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, vol. 12. Oxford, Pergamon, pp. 849.
- García, C. y C. Ignoffo. 1979. Sensitivity of *Nomuraea rileyi* to antibiotics, sulfonamides and fungicidal substances. *Journal of Invertebrate Pathology*. 33: 124-125.
- García, G. C, M. M. B. González, and S. Rivas A. 2005. Field efficacy of *Beauveria bassiana* conidia for control of *Pieris rapae* (L) population on cabbage. Joint meeting IOBC-NRS/Biocontrol Network, Oxford-Magog, QC.
- García-Gutiérrez, C., N. M. Rosas-García, M. Norzagaray-Campos and I. Chaírez-Hernández. 2010. Efficacy of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to control *Pieris rapae* on cabbage in the field. *Southwestern Entomologist* 35(1):75-83.
- García, G. C., M. M. B. González y M. N. Bautista. 2011. Patogenicidad de aislamientos de hongos entomopatógenos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 37(2) 21-222.
- Gosselin, M.-E., G. Bélair, L. Simard & J. Brodeur. 2009. Toxicity of spinosad and *Beauveria bassiana* to the black cutworm, and the additivity of sublethal doses, *Biocontrol Science and Technology*, 19(2): 201-217.
- Guerrero, C. J., L. R. Carrillo, P. A. Aguilera. 1999. Caracterización morfológica y germinación de cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*, asociado a larvas de escarabaeidos y curculionidos. *Agro sur*. (27): 2 Valdivia.
- Hu, G., R. J. St. Leger. 2002. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*M. anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 6383-6387.

- Immaraju, J. A. 1998. The comercial use of azadirachtin and its integration into viable pest control programs. *Pestic. Sci.* 54(3): 285-289.
- IRAC (The Insecticide Resistance Action Committee). 2014. Clasificación del modo de acción de insecticidas y acaricidas. [En línea]. Disponible en <http://www.irac-online.org/documents/folleto-modo-de-accion-insecticidas-y-acaricidas/?ext=pdf> (consultado diciembre de 2014).
- Ju-chun, H. y F. Hai-tung. 2006. Development of resistance to spinosad in Oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) in laboratory selection and cross-resistance. *J. Econ. Entomol.* 99: 931-936.
- Kaushik, N., B. G. Singh, U. K. Tomar, S. N. Naik, S. Vir, S. S. Bisla, K. K. Sharma, S. K. Banerjee and P. Thakkar. 2007. Regional and habitat variability in azadirachtin content of Indian neem (*Azadirachta indica* A. Juss). *Curr. Sci. India.* 92(10):1400-14006.
- Kostaropoulos I, Papadopoulos AI, Metaxakis A, Boukouvala E, Papadopoulou-Mourkidou E. 2001, The role of glutathione S-transferases in the detoxification of some organophosphorus insecticides in larvae and pupae of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pest Manag Sci.* 57(6), 501-8.
- León-García, I., E. Rodríguez-Leyva, L. D. Ortega-Arenas y J. F. Solís-Aguilar. 2012. Susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a insecticidas asociados a césped de Quintana Roo, México. *Agrociencia.* 46: 279-287.
- Lezama G., R., R. Alatorre R., L. F. Bojalil J., J. Molina O., M. Arenas V., M. González R., y O. Rebolledo D. 1996. Virulence of five entomopathogenic fungi (Hyphomycetes) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs and neonate larvae. *Vedalia (México)* 3: 35-40.
- Lezama G., R., J. J. Hamm, J. Molina O., M. López E., A. Pescador R., M. González R.; L. E. Styer. 2000. Occurrence of entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican states of Michoacán, Colima, Jalisco and Tamaulipas. *Florida Entomologist* 84(1): 23-28.
- Lezama G., R., J. Molina O., M. López., A. Pescador., E. Galindo., C. A. Ángel y A. C. Michel. 2005. Efecto del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* sobre el control del gusano cogollero del maíz en campo. *Avances de Investigación Agropecuaria (México)* 9(1): 1-6.
- Lozano, M., M. Rodríguez, N. Vásquez y G. Gutiérrez. 2000. Efecto de *Metarhizium anisopliae* sobre plagas rizófagas de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) en Colombia. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica).* 56:58-64.
- Lu, Z., Z. Liu, L. Wang, Y. Zhang, W. Qi y M. Goodfellow. 2001. *Saccharopolyspora flava* sp. nov. and *Saccharopolyspora thermophila* sp. nov., novel actinomycetes from soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 51: 319-325.
- Luz, C. and J. Fargues. 1997. Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. *Mycopathologia.* 138: 117-125.

- Mordue, A. J., E. D. Morgan and A. J. Nisbet. 2005. Azadirachtin, a natural product in insect control. *Comp. Mol. Insect Sci.* 6: 117-135
- Moses, M., E. Johnson, W. Anger, V. Burse, S. Horstman, R. Jackson, R. Lewis, K. Maddy, R. McConnell, W. Meggs and S. Zahm. 1993. Environmental equity and pesticide exposure. *Toxicology and Industrial Health.* 9(5): 913-959.
- Moulton, J. K., A. D. Pepper y J. T. Dennehy. 2000. Beet armyworm (*Spodoptera exigua*) resistance to spinosad. *Pest. Manag. Sci.* 56: 842-848.
- National Research Council. 1992. *In: Neem: a tree for solving global problems.* Ruskin, F. R. (ed.) National Academy Press (Ed.) Washington, D. C. USA. 141 p.
- OMS/PNUMA (Organización Mundial de la Salud y Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente). 1992. Consecuencias sanitarias del empleo de plaguicidas en la agricultura. Ginebra.
- Orduño-Cruz, N., A. W. Guzmán-Franco, E. Rodríguez-Leyva, J. López-Collado, J. M. Valdéz-Carrasco and G. Mora-Aguilera. 2011. Susceptibility of the cactus weevil *Metamasius spinolae* to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* under laboratory and field conditions. *Journal of Applied Microbiology* 111: 939-948.
- Pava-Ripoll, M., F. J. Posadas, B. Momen, C. Wang and R. St. Leger. 2008. Increased pathogenicity against coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) by *Metarhizium anisopliae* expressing the scorpion toxin (AaIT) gene. *Journal of Invertebrate Pathology.* 99: 220-226.
- Pavone, D., M. Díaz, L. Trujillo y B. Dorta. 2009. A granular formulation of *Nomuraea rileyi* Falow (Samson) for the control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Interciencia.* 34(2): 1030-134.
- Pessarakli, M. 2007. Handbook of turfgrass management and physiology. CRC Press. USA. 400 p.
- Phillip, K. P., C. C. Chao, T. Molitor, M. Murtaugh, F. Strgar and B. M. Sharp. 1991. Stress and pathogenesis of infectious disease. *Reviews of Infectious Diseases.* 13: 710-720.
- Posada, L. 1989. Lista de insectos dañinos y otras plagas en Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. Boletín Técnico No. 43. Produmedios, Bogotá. 662 p.
- Posada-Florez, F. J., D. A. Villalba-Gault, A. E. Bustillo-Pardey. 2004. Los insecticidas y el hongo *Beauveria bassiana* en el control de la broca del café. *Cenicafé.* 55(2): 136-149.
- Potter, C. 1952. An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films, with data on electrostatic charge on atomized spray fluids. *Annals of Applied Biology.* 39: 1-29.
- Pucheta Diaz, M., M. A. Flores, N. S. Rodríguez y M. De la Torre. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *INCI.* 31(12): 856-860.
- Quintela, E. D. and C. W. McCoy. 1997. Pathogenicity enhancement of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to fist instars of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) with sublethal doses of imidacloprid. *Environ. Entomol.* 26(5): 1173-1182.

- Quintela, E. D. and C. W. McCoy. 1998. Conidial attachment of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the larval cuticle of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) treated with imidacloprid. *J. Invertebr. Pathol.* 72: 220-230.
- Ramzan, A. M., B. M. Hamid, M. Afzal, M. Ashfaq and S. S. Talib. 2010. Compatibility of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* with selective insecticides. *Pak. J. Bot.* 42(6): 4207-4214.
- Ramzi, S. and A. Zibae. 2014. Biochemical properties of different entomopathogenic fungi and their virulence against *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae. *Biocontrol Science and Technology.* 24(5): 597-610.
- Reinert, J. A., M. C. Engelke, J. C. Reed, S. J. Maranz, and B. R. Wise-man. 1997. Susceptibility of cool and warm season turfgrasses to fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Int. Turfgrass Soc. Res. J.* 8: 1003-1011.
- Ríos-Díez, J. D. and C. I. Saldamando-Benjumea. 2011. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) strains from central Colombia to two insecticides, methomyl and lambda-cyhalothrin: a study of the genetic basis of resistance. *Journal of Economic Entomology.* 104(5):1698-1705.
- Ritchie, S. W., J. J. Hanway, G. O. Benson., 1986. How a corn plant develops. Ames, Iowa State University. Special report no. 48. 21 p.
- Rivera, M. A., P. A. Bustillo y M. R. Marín. 1994. Compatibilidad de dos aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en mezcla con insecticidas usados en el control de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). *Revista Colombiana de Entomología* 20 (4): 209-214.
- Robbs, C. F. and A. M. Bittencourt. 1998. Controle biológico de insetos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 6:71.
- SAGARPA. 2010. Estudio de gran visión y factibilidad económica y financiera para el desarrollo de infraestructura de almacenamiento y distribución de granos y oleaginosas para el mediano y largo plazo a nivel nacional. [En línea]. Disponible en [http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios\\_promercado/GRANOS.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/GRANOS.pdf) (consultado agosto de 2014).
- SAGARPA. 2013. Agricultura de autoconsumo. [En línea]. Disponible en <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/oaxaca/Paginas/Autoconsumo2013.aspx> (consultado septiembre de 2014).
- Salvador, J. R. 2001. Maíz. Departamento de Fitotecnia. UACH, Chapingo, México. pp 14.
- Scott, F. J. 2004. Development and stability of insecticide resistance in the leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) to cyromazine, abamectin, and spinosad. *J. Econ. Entomol.* 97: 112-119.
- Shelton, A. M., J. D. Vandenberg, M. Ramos, and T. W. Wilsey. 1998. Efficacy and persistence of *Beauveria bassiana* and other fungi for control of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) on cabbage seedlings. *J. Entomol. Sci.* 33: 142–151.

- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2013. [En línea]. Disponible en <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> (consultado agosto de 2014).
- Srinivas R, SK Jayalakshmi, K Sreeramulu, 2004. Hydrolysis of organophosphorus compounds by an esterase isozyme from insecticide resistant pest *Helicoverpa armigera*. Indian Journal of experimental biology. 42, 214-216.
- Sosa-Gomez, D., K. Delpin, F. Moscardi y M. Nozaki. 2003. The impact of fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson epizootics and on populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Neotrop. Entomol. 32(2): 289-291.
- Telenga, N. A. 1957. The employment of muscardine fungi in the control of the sugar-beet weevil. Zashchita Rast Ot Vredit I Boleznei. 1957(3): 29.
- Thomazoni, D., M. A. Formentini and L. F. A. Alves. 2014. Patogenicity of entomopathogenic fungi to *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Arq. Inst. Biol., São Paulo, 81(2): 126-133.
- Thompson, D., R. Dutton y T. C. Sparks. 2000. Spinosad – a case study: an example from a natural products discovery programme. Pest Manag. Sci. 56: 696-702.
- Vandenberg, J. D., A. M. Shelton and W. T. Wilsey. 1998. Assessment of *Beauveria bassiana* sprays for control of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) on crucifers. Journal of Economic Entomology. 91(3): 624-630.
- Vásquez, P. C. A., Y. Saldarriaga y G. F. Pineda. 2004. Compatibilidad del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* con triflumuron. Rev. Colomb. Entomol. (30)1: 23-27.
- Vergara, R. R. 2004. Enfoque agroecológico del empleo de entomopatógenos para el control de plagas. Conferencia dictada en el Octavo Seminario de Agroecología Agromedicina y Medio Ambiente. Tunja 22 y 23 de Noviembre.
- Wang, D., X. Qiu, X. Ren, W. Zhang and K. Wang. 2009. Effects of spinosad on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from China: Tolerance status, synergism and enzymatic responses. Pest Manag. Sci. 65: 1040-1046.
- Wiseman, B. R., Painter, R. H. and Wasson, C. E. 1966. Detecting corn seedling differences in the greenhouse by visual classification of damage by the fall armyworm. Journal of Economic Entomology, 59, 1211-1214.
- Yu, S. J. 1992. Detection and biochemical characterization on insecticide resistance in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 85(3): 675-682.
- Yung, P. Y., D. B. Woodward y R. M. Roe. 2003. Spinosad selection of a laboratory strain of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), and characterization of resistance. Crop Protection 22: 265-273.
- Zhao, J. Z., Y. X. Li, H. L. Collins, L. Gusukuma-Minuto, R. F. L. Mau, G. D. Thompson y A. M. Shelton. 2002. Monitoring and characterization of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad. J. Econ. Entomol. 95: 430-436.
- Zhao, J. Z., H. L. Collins, Y. X. Li, R. F. L. Mau, G. D. Thompson, M. Hertlein, J. T. Andaloro, R. Boykin y A. M. Shelton. 2006. Monitoring of diamondback moth (Lepidoptera:

Plutellidae) resistance to spinosad, indoxacarb, and emamectin benzoate. J .Econ. Entomol. 99: 176-181.

Zimmermann, G. 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. Pesticide Science. 37: 375-379.