



Evaluación de mortalidad de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* L.) con el uso de *Metarhizium anisopliae* in vitro

Evaluation of mortality of mollusc worm (Spodoptera frugiperda L.) with the use of Metarhizium anisopliae in vitro

AMARO, Luis¹; PARRAGUIRRE, Conrado²; ROMERO, Omar³; RIVERA, José⁴; SÁNCHEZ, Primo⁵

¹Posgrado en Manejo Sostenible de Agroecosistemas BUAP, luisjosuebiol@gmail.com; ² Centro de Agroecología ICUAP-BUAP, conrado.parraguirre@correo.buap.mx; ³Centro de Agroecología ICUAP-BUAP, biol.ora@hotmail.com; ⁴ Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, ICUAP-BUAP, jart70@yahoo.com; ⁵Centro de Agroecología ICUAP-BUAP, primosamo@yahoo.com;

Tema Generador: Manejo de Agroecosistemas y Producción Orgánica

Resumen

El uso de hongos entomopatógenos como control microbiano, presenta ventajas sobre el uso de insecticidas químicos, resalta su alta especificidad sobre los hospederos y su baja contaminación ambiental. Sin embargo, la producción de agentes de control biológico como *Metarhizium anisopliae*, presenta limitantes en la concentración óptima de conidios, además se desconoce el potencial que pueden tener las cepas nativas. En la presente investigación, se realizó la evaluación de mortalidad de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* L.) en condiciones de laboratorio, mediante el empleo de *Metarhizium anisopliae*. La concentración de 53×10^4 conidios/mL de la cepa nativa, reportó una mortalidad del 72.5% y la más baja se obtuvo de la cepa de *Metarhizium* comercial en la concentración de 4×10^4 con/mL, equivalente al 32.5%. El mayor índice de mortalidad para ambas cepas, ocurrió a las 72 hrs post-infección. Estos Resultados demuestran la factibilidad del uso de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* L.) in vitro.

Palabras clave: Control biológico; cepa nativa; mortalidad y conidios.

Abstract

The use of entomopathogenic fungi as a microbial control has advantages over the use of chemical insecticides, highlighting their high host specificity and low environmental contamination. However, the production of biological control agents such as *Metarhizium anisopliae*, presents limitations in the optimum concentration of conidia, and the potential of native strains is unknown. In the present investigation, the mortality of the worm (*Spodoptera frugiperda* L.) was evaluated under laboratory conditions using *Metarhizium anisopliae*. The concentration of 53×10^4 con/mL of the native strain reported a mortality of 72.5% and the lowest was obtained from the commercial *Metarhizium* strain at the concentration of 4×10^4 con/mL, equivalent to 32.5%. The highest mortality rate for both strains occurred at 72 hrs post-infection. These results demonstrate the feasibility of the use of *Metarhizium anisopliae* for the biological control of the cogwheel worm (*Spodoptera frugiperda* L.) in vitro.

Keywords: Biological control; native strain; mortality and conidia.



Introducción

En la actualidad la producción de alimentos enfrenta el reto de mantener un alto nivel de calidad, considerando aspectos de inocuidad alimentaria y sistemas de producción con retribución más justa para los productores. El gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* L.), puede ocasionar una reducción en la producción de maíz, que va desde un 20% hasta la pérdida total del cultivo, ataca las primeras etapas del desarrollo de la planta e incluso en épocas de floración. En los últimos años el empleo de sustancias tóxicas en México se ha multiplicado y el empleo de plaguicidas se incrementa anualmente un 10%, por lo que es necesario modificar estas prácticas agrícolas, para reducir el riesgo en la salud de los productores y de los consumidores. El uso de organismos benéficos como una alternativa sostenible de control de insectos, es recomendable dentro de un manejo integrado de plagas, ya que no tiene efectos nocivos para el medio ambiente, la salud del hombre y los animales (Jiménez, 1998). Particularmente, los hongos han sido una de las mejores alternativas para el control de plagas en los últimos años; asimismo, presentan un amplio espectro de huéspedes (De Faria y Wraight, 2007). Entre los hongos más utilizados como insecticidas biológicos se incluye a *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin. *Metarhizium anisopliae* ataca más de 200 especies de insectos de diversos órdenes: Orthoptera, Hemiptera, Lepidoptera, Dermaptera, Hymenoptera, Coleoptera, entre otros (Polar *et al.*, 2008). La presente investigación tuvo como objetivo, identificar y caracterizar la cepa nativa CP-MA1 de *Metarhizium*, además de evaluar su efecto patogénico en gusano cogollero *in vitro*.

Materiales y métodos

Se tomaron preparaciones de medio de cultivo (PDA) con aislados monospóricos de cepas de *M. Anisopliae* (una comercial y otra nativa), de 10 días de desarrollo, posteriormente se agregó 10 mL de agua destilada estéril (ADE) para suspender y remover esporas y conidios. Para el ensayo de mortalidad en la presente investigación, se tomaron las diluciones 10-1, 10-5 y 10-10 para ambas cepas de *M. anisopliae*. Para la evaluación de la germinación de conidios se siguió la metodología de Berlanga y Hernández (2002). Se colocaron cinco puntos con una suspensión de 1×10^4 conidios/ml en cajas de Petri (100 x 15 mm) con PDA. Se observaron 100 conidios y se registró el número de conidios germinados de los cinco puntos y este valor representó directamente la tasa de germinación en porcentaje de una unidad experimental. Se preparó una dieta artificial de SOUTH LAND PRODUCTS INC (870-265-3747) que incluyó una serie de sustancias sintéticas a base de harinas de soya y de trigo, conservadores y complejos vitamínicos (Montes *et al.*, 2001). La dieta artificial fue elaborada en base a una modificación realizada por Dilcia



et al., (1989). Para lo cual, se realizó 1420 mL de dieta en dos etapas. Primero se midió 710 mL de agua destilada estéril en una probeta, luego se colocó en un recipiente de aluminio y se puso a hervir durante 5 minutos, inmediatamente se retiró del fuego y se colocó 150 gr de dieta SOUTH LAND y se disolvió con un agitador electrónico hasta homogeneizar la mezcla. Posteriormente, se colocó a baño María y se colocaron 5 mL de dieta sobre vasos transparentes de plástico y se dejó solidificar. Las larvas de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) de tercer instar utilizados en la presente investigación, provienen de un criadero del departamento de fitosanidad del Colegio de Postgraduados, *Campus* Montecillo, Estado de México. La metodología para la inoculación de los tratamientos consistió en colocar 20 larvas en inmersión en una caja petri, posteriormente se retiró el exceso de inóculo sobre las larvas (Lucero *et al.*, 2004) y se colocó cada una de ellas en recipientes de plástico con tapa semitransparente de 25 mL de capacidad con tapa, la cual, posee una ventana circular en el centro facilitando el intercambio gaseoso con 5 mL de dieta (Arévalo y Zenner, 2009) y se incubaron a 28 °C. Para el caso del testigo, se utilizó agua destilada estéril. Las larvas se evaluaron cada 24 horas, a partir del tercer día de haber iniciado el experimento. El diseño para la presente investigación fue de bloques al azar, donde se compararon tres concentraciones de conidios y se evaluaron 7 tratamientos incluyendo al testigo, cada tratamiento tuvo 40 repeticiones; teniendo así, un total de 280 larvas de tercer instar de gusano cogollero. Durante el periodo de monitoreo, se registró el número de larvas vivas y el de cadáveres con esporulación debido al efecto del hongo entomopatógeno (Nájera *et al.*, 2005). La mortalidad expresada en porcentaje, se determinó mediante la siguiente fórmula:

Donde:

%M = Porcentaje de mortalidad larval

P₀ = Población inicial

Lv= larvas muertas por el tratamiento

Los Resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de separación de medias por Tukey (p <0.05), utilizando el paquete estadístico SPSS versión 17 (Statistical Package for Social Sciences).

Resultados y discusión

La mayor concentración de conidios se obtuvo en *M. anisopliae* 1/10 con 53x10⁴ con/mL y *Metarhizium* comercial 1/10 con 36x10⁴ con/mL. Las concentraciones más bajas se obtuvieron con *M. anisopliae* 5/10, *Metarhizium* comercial 5/10, *M. anisopliae* 10/10 y *Metarhizium* comercial 10/10; con 9x10⁴, 7x10⁴, 5x10⁴ y 4x10⁴ con/mL respectiva-



mente. No se observó diferencias significativas de concentraciones entre *Metarhizium* comercial 10/10 y *M. anisopliae* 10/10 y de esta última concentración con *Metarhizium* comercial 5/10. Por su parte, las concentraciones de *M. anisopliae* 5/10, *Metarhizium* comercial 1/10 y *M. anisopliae* 1/10, mostraron diferencia significativa. Los rangos del porcentaje de viabilidad son muy heterogéneos entre las cepas de *M. anisopliae*, la diferencia entre el mayor fue de 72% y el menor de 13% de viabilidad.

La esporulación de *M. anisopliae* sobre larvas, se realizó de 5 a 6 días después de su muerte. Inicialmente aparecieron colonias blancas algodonosas, características del estado de crecimiento del micelio (**Figura 1**). La emergencia del hongo se realizó por diferentes vías, tales como el aparato bucal y abdomen. En la **Figura 1a** se observa que la emergencia del hongo se realizó en la parte inferior de la cabeza, colonizando el aparato bucal e invadiendo el cuerpo de la larva mediante la producción de enzimas; por su parte en la **Figura 1b**, se observan dos colonias de *M. anisopliae* en diferentes zonas, la primera está ubicada en la parte lateral del tórax y la segunda en el abdomen; así mismo en la **Figura 1c**, se observa la esporulación del hongo en la parte inferior del abdomen y por último en la **Figura 1e**, se observa la esporulación de hongo con coloración verdosa, característico de este género (Quesada *et al.*, 2004). La presencia de *M. anisopliae* se observó también sobre adultos (**Figura 1f**), ya que la infección puede ocurrir si hay entrada de esporas a las celdas, antes de que éstas sean operculadas, ocasionando la muerte del hospedero (Espinosa *et al.*, 2011).



Figura 1. Colonización de *M. anisopliae* sobre larvas de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*); **a**, **b** y **c**: colonización de *M. anisopliae* en estado de crecimiento sobre el cuerpo de la larva; **d**: esporulación del hongo con crecimiento radial y coloración verdosa; **e**: colonias de *M. anisopliae* observadas en microscopio (resolución 40X) y **f**: emergencia y colonización de *M. anisopliae* sobre adulto emergido de gusano cogollero.

La mortalidad de larvas de gusano cogollero, mediante la utilización de *Metarhizium* nativo, ocurrió a las 72 hrs, donde se registró el mayor índice de mortalidad para cada uno de los tratamientos (TL_{50}). La concentración de 1/10 (53×10^4 con/mL) causó mayor mortalidad con 29 larvas, equivalentes al 72.5% del total de la población correspondiente a este tratamiento; teniendo diferencias significativas con las demás concentraciones. Estudios en laboratorio realizados por Lezama *et al.*, (1996) han demostrado que *S. frugiperda* es susceptible al hongo *M. anisopliae* en los estados biológicos de huevo y larva, con porcentajes de mortalidad de 100% y valores de TL_{50} de 2.5 A 2.9 días en huevo y 1.3 a 3.1 días en larva, bajo una concentración de 1×10^8 conidios/mL, semejantes a los obtenidos en esta investigación. Así mismo Nájera *et al.*, (2005) reportan que la cepa nativa de *Metarhizium anisopliae* originario del estado de Jalisco-México, provocó el 80% de mortalidad a los 30 días de haber iniciado el experimento sobre larvas de *Phyllophaga* spp., a una concentración de 2×10^8 con/g, Resultados similares a esta investigación.



Conclusiones

La mayor producción de conidios se presentó en la cepa nativa de *M. anisopliae* con 53×10^4 con/mL en medio de cultivo PDA, representando así mayor producción de estructuras reproductivas en comparación a la cepa comercial.

La concentración 10^{-1} de cepa nativa de *M. anisopliae* presentó mayor porcentaje de mortalidad 72.5% a las 72 hr post-infección, en comparación a la cepa comercial 10/10 con el 32.5% que fue el resultado más bajo obtenido en la presente investigación.

Literatura citada

- ARÉVALO, M. H. y ZENNER, de P. I. Evaluación de dietas merídicas para la cría en laboratorio de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Actualidad y Divulgación Científica*, v. 1. n. 12. p. 79-90. 2009.
- BERLANGA, A. M., y HERNÁNDEZ, V. M, Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la virulencia de *Metarhizium anisopliae*, *M. annisopliae* var *acridum* y *Beauveria bassiana* en *Shistocerca piceifrons piceifrons*. *Manejo Integrado de Plagas*, n. 63. p. 51-55, 2002.
- DE FARIA, M. R. y WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and micoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and internacional classification of formulation types. *Biological Control*, v. 1. n. 43. p. 237-256, 2007.
- DILCIA, H.; FERRER, F. y LINARES, B. Introducción de *Telenomas remusnixon* (hym.: scelionidae) para controlar *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en Yaritagua Venezuela. *Agronomía tropical*, v. 39. n. 1-3. p. 45-61. 1989.
- ESPINOSA, E. O.; LARA, J. R.; OTERO, C. G.; ALATORRE, R. R. y VALDEZ, C. J. Susceptibilidad de larvas, pupas y abejas adultas a aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Sorokin) y *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize). *Interciencia*, v. 36. n. 2, p. 148-152, 2001.
- JIMÉNEZ, Z. J. Control de calidad en hongos entomopatógenos. In: Memoria de artículos en Resumen y en extenso, XXI Congreso Nacional de Control Biológico. Río Bravo, Tamaulipas, México. p. 113-114, 1998.
- LEZAMA, G. R.; ALATORRE, R. R.; BOJALIL, J. L. F.; MOLINA, O. J.; ARENAS, V. M.; GONZALES, R. M. y REBOLLEDO, D. O. Virulence of the entomopathogenic fungi (Hyphomycetes) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: noctuidae) eggs and neonate larvae. *Vedalia*, v. 3 n. 1, p. 35-39, 1996.



VI CONGRESSO LATINO-AMERICANO
X CONGRESSO BRASILEIRO
V SEMINÁRIO DE DEF. E ENTOMOL.
12-15 SETEMBRO 2017
BRASÍLIA- DF, BRASIL

Tema Gerador 9

Manejo de Agroecossistemas
e Agricultura Orgânica



LUCERO, M. A. M.; PEÑA, V. L. A. y BACCA, I. T. Evaluación de la actividad biocontroladora de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Ancognatha scarabaeiodes* (Coleóptera: Scarabaeidae). *Revista corpoica*, v. 5. n. 1. p. 43-48, 2005.

MONTES, M. J. A.; ESPINOZA, P. N.; GARRIDO, R. E. y GUTIÉRREZ, M. F. A. Reproducción de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* L.) del maíz (*Zea maíz*) bajo condiciones de laboratorio. *INIFAP*, p. 1, 2001.

NÁJERA, R. M. B. M.; GARCÍA, M. M.; CROCKER, L. R. y HERNÁNDEZ, V. V. Virulencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, nativos del occidente de México, contra larvas de tercer estadio de *Phyllophaga crinita* (coleoptera: melolonthidae) bajo condiciones de laboratorio. *Fitosanidad*. v. 9. n. 1, p. 33-36. 2005.

POLAR, P.; MOORE, D.; KAIRO, M. y RAMSUBHAG, A. Topically applied myco acaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges. *Exp Appl Acarol*. v. 46 n. 1, p. 119-148. 2008.

QUESADA, M. E. Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. v. 87. n. 1, p. 51-58. 2004.