

**ACTIVIDAD DE FORMULACIONES EN ACEITE DE *Nomuraea rileyi*
(Farlow) Samson E *Isaria tenuipes* (Peck) Samson, SOBRE LARVAS
DE CUATRO LEPIDOPTEROS**

PAULINA VEGA AQUINO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OPTAR AL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

EN PARASITOLOGIA AGRICOLA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

PROGRAMA DE GRADUADOS

Diciembre de 2008, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIRECCIÓN DE POSTGRADO**

**ACTIVIDAD DE FORMULACIONES EN ACEITE DE *Nomuraea rileyi*
(Farlow) Samson E *Isaria tenuipes* (Peck) Samson, SOBRE LARVAS
DE CUATRO LEPIDOPTEROS**

TESIS

POR

PAULINA VEGA AQUINO

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como
requisito parcial para optar al grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal:

Dr. Sergio R. Sánchez Peña

Asesor:



Dr. Carlos A. Blanco Montero

Asesor:

Dr. Jerónimo Landeros Flores

Asesor:

Dr. Ernesto Cerna Chávez

Dr. Jerónimo Landeros Flores
Director de Postgrado

Diciembre de 2008, Buenavista, Saltillo, Coahuila.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ya que me brindo la oportunidad de ser alumna nuevamente

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme la beca de posgrado y la beca mixta para viajes de estancia en el extranjero

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología, por otorgarme la beca de tesis terminal

Al Dr. Sergio Sánchez, por su apoyo dentro y fuera de la universidad, grandes ideas, conocimientos compartidos, constante entusiasmo; por alentarnos a seguir adelante y su orientación para lograr cada vez más objetivos

Al Dr. Carlos Blanco y Susana Fredin, por su extrema confianza, tiempo dedicado y por el gran apoyo brindado constantemente, especialmente durante la estancia en el USDA y para la publicación del artículo de investigación

Al Dr. Jerónimo Landeros Flores, por su confianza, por el apoyo brindado como profesor, asesor y director de posgrado, por su ayuda y revisión en las presentaciones de evaluación de proyectos y por el tiempo dedicado a este trabajo

Al Dr. Ernesto Cerna Chávez, por el apoyo brindado para la revisión de la tesis y por su disposición para participar dentro del comité de asesores

A Ma. Cristina Sánchez F., por su apoyo, confianza y gran colaboración para realizar las actividades de laboratorio dentro de la universidad

A la Lic. Esperanza de la Peña, por su apoyo y confianza desde los estudios de licenciatura

Al departamento de Parasitología, por recibirme dentro de los estudiantes de posgrado y contribuir ampliamente con nuestra formación

A los compañeros, por todo lo que aprendemos y compartimos dentro de esta gran universidad

DEDICATORIA

A mi familia, por su confianza y apoyo

COMPENDIO

ACTIVIDAD DE FORMULACIONES EN ACEITE DE *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson E *Isaria tenuipes* (Peck) Samson, SOBRE LARVAS DE CUATRO LEPIDOPTEROS

POR

PAULINA VEGA AQUINO

MAESTRÍA EN CIENCIAS
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. DICIEMBRE 2008.

Palabras clave: *Nomuraea rileyi*, *Isaria tenuipes*, formulaciones en aceite, Noctuidos, larvas.

Se llevaron a cabo bioensayos para evaluar la actividad de conidias de los hongos entomopatógenos *Nomuraea rileyi* e *Isaria tenuipes* suspendidas en aceite, sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Helicoverpa zea*, y *Heliothis virescens*.

Las pruebas consistieron en dos secciones de bioensayos. En la primera sección se utilizaron cepas de *N. rileyi* (recién colectadas) y una cepa de *I. tenuipes*, sobre *S. frugiperda*. Las conidias fueron suspendidas en agua con Tween 80, en aceites vegetales (canola y soya) y en aceite mineral. Ambos hongos fueron altamente compatibles con los aceites y causaron mortalidades de 100 % o cercanas, en casi todos los tratamientos en aceite; los valores más bajos de TL₅₀

fueron obtenidos para *N. rileyi* en aceite mineral (4.7 días); para *I. tenuipes* en aceite de soya 6.0 días. En la segunda sección de bioensayos se utilizaron cepas de la colección del USDA- ARSEF en formulaciones en aceite (mineral, canola, oliva, girasol y cacahuate) sobre estados inmaduros de *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Helicoverpa zea*, y *Heliothis virescens* en aceite mineral y aceite de canola se registraron las más altas mortalidades sobre especies de *Spodoptera*, en aceite mineral se obtuvieron los mejores resultados, los valores de TL₅₀ fueron 2.5 días para la cepa 135, y 2.9 para la cepa 762. Para *I. tenuipes* los valores más bajos (5.1 a 5.6 días) fueron obtenidos en las formulaciones en aceite mineral sobre *Spodoptera* spp. y *H. zea* respectivamente. Adicionalmente, se hicieron bioensayos con ambos hongos sobre prepupas de las cuatro especies, los mejores resultados se obtuvieron sobre *S. exigua*: 90% (cepa 4096) y 100 % (cepa 2488) de *I. tenuipes*, and cepa 135 de *N. rileyi* sobre *S. frugiperda* (95%). La actividad específica de las diferentes formulaciones dependió de la especie de hospedero y el aceite usado. Los resultados sugieren futuras evaluaciones en campo.

ABSTRACT

**ACTIVITY OF OIL FORMULATIONS OF *Nomuraea rileyi*
(Farlow) Samson AND *Isaria tenuipes* (Peck) Samson, AGAINST LARVAE
OF FOUR LEPIDOPTEROUS**

BY

PAULINA VEGA AQUINO

**MASTER IN SCIENCES
AGRICULTURAL PARASITHOLOGY
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. DECEMBER 2008.**
Keywords: *Nomuraea rileyi*, *Isaria tenuipes*, oil formulations, Noctuids, larvae,
prepupae.

Bioassays were carried out to evaluate the activity of oil-suspended conidia of the fungal entomopathogens *Nomuraea rileyi* and *Isaria tenuipes* against larvae of *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Helicoverpa zea*, and *Heliothis virescens*.

The tests consisted of two bioassay sets. In the first test set we tested strains of *N. rileyi* (freshly isolated) and of *I. tenuipes* against *S. frugiperda*. Conidia were suspended in water + Tween 80% and in vegetable (canola, soybean) and mineral oils. Both fungi were highly compatible with oils and caused mortalities of 100 % or near in almost all oil treatments; the lowest LT₅₀ was

obtained for *N. rileyi* in mineral oil (4.7 days); for *I. tenuipes* in soybean oil, 6.0 days. At the second test set were tested strains from the USDA-ARSEF collection in oil formulations (mineral, canola, sunflower, olive and peanut oils) against immature stages of *S. exigua*, *S. frugiperda*, *H. zea* and *H. virescens*. *Nomuraea rileyi* in mineral oil formulations induced the highest mortalities (100 %) against *Spodoptera* spI., the LT₅₀ was 2.5 days (strain 135) and 2.9 days (strain 762). For *I. tenuipes* the lowest LT₅₀ values (5.1 to 5.6 days) were obtained in mineral oil formulations against *Spodoptera* spI. and *H. zea* respectively. Additionally, we tested both fungi against prepupae of all four lepidopteran species; mortality was similar for both fungi across host species, except for two strains of *I. tenuipes* against *S. exigua*: 90% (strain 4096) and 100 % (strain 2488), and strain 135 of *N. rileyi* against *S. frugiperda* (95%). The specific activity of different formulations was dependent of host species and oil used. These results suggest further evaluation of these entomopathogens, with oil application technologies in agriculture, particularly in organic and sustainable settings.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	4
III. HIPÓTESIS	4
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1. Los hongos entomopatógenos biología y taxonomía	5
4.2. Descripción de <i>Nomuraea rileyi</i> e <i>Isaria tenuipes</i>	9
4.2.1 Género <i>Nomuraea</i>	9
4.2.1.1 <i>Nomuraea rileyi</i>	10
4.2.2 Género <i>Isaria</i>	11
4.2.2.1 <i>Isaria tenuipes</i>	11
4.3 Importancia de los principales lepidópteros plaga	12

4.3.1	Métodos de control	_____	14
4.3.2	Bioinsecticidas	_____	14
4.4.	Soluciones de conidias	_____	16
4.4.1	Formulaciones en aceite	_____	17
4.5	Hongos entomopatógenos y sus interacciones	_____	18
V.	METODOLOGÍA	_____	21
5.1.	Localización del Área de Estudio	_____	22
5.2.	Primera sección de bioensayos	_____	22
5.2.1.	Obtención insectos y aislamientos de los hongos entomopatógenos	_____	22
5.2.2.	Infección de <i>S. frugiperda</i> por inmersión utilizando formulaciones acuosas de <i>N. rileyi</i>	_____	23
5.2.3.	Conidias en suspensiones acuosas y en aceite de <i>N. rileyi</i> e <i>I. tenuipes</i> sobre larvas de tercer estadio.	_____	24
5.3.	Segunda sección de bioensayos	_____	25
5.3.1.	Insectos, cepas de los hongos, aceites	_____	25

	usados y condiciones en los bioensayos	
5.3.2.	Mortalidad de 2do, 3er y 4to estadio larval de cuatro especies de Noctuidos expuestos a la cepa 762 de <i>N. rileyi</i> .	26
5.3.3.	Mortalidad de larvas del tercer estadio sobre cuatro especies de Noctuidos expuestos a las cepas 135 y 762 de <i>N. rileyi</i> y 4096 y 2488 de <i>I. tenuipes</i>	26
5.3.4.	Mortalidad de prepupas de cuatro especies de lepidópteros expuestas a las cepas 135 de <i>N. rileyi</i> . 2488, 2489 y 4096 de <i>I. tenuipes</i> .	27
5.4.	Análisis estadístico	28
VI.	RESULTADOS	28
6.1	Primera sección de bioensayos	28
6.2.	Obtención insectos y aislamientos de los hongos entomopatógenos	28
6.2.1.	Conidias en suspensiones acuosas y en aceite de <i>N. rileyi</i> e <i>I. tenuipes</i> sobre larvas de tercer estadio.	31
6.3.	Segunda sección de bioensayos	33

6.3.1.	Mortalidad de 2do., 3er y 4to estadio larval de cuatro especies de Noctuidos expuestos a la cepa 762 de <i>N. rileyi</i> .	33
6.3.2.	Mortalidad de larvas del tercer estadio sobre cuatro especies de Noctuidos expuestos a las cepas 135 y 762 de <i>N. rileyi</i> y 4096 y 2488 de <i>I. tenuipes</i>	34
6.3.3.	Mortalidad de prepupas de cuatro especies de lepidópteros expuestas a las cepas 135 de <i>N. rileyi</i> . 2488, 2489 y 4096 de <i>I. tenuipes</i> .	37
VII.	CONCLUSIONES	39
VIII.	LITERATURA REVISADA	40
IX.	APENDICE	45
X.	ARTÍCULO	49

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación actual de los géneros de hongos entomopatógenos incluidos en la revisión de Roy <i>et al.</i> publicada en 2006.	6
Cuadro 2. Características para identificación de especies: Hospedero y morfología de conidias.	9
Cuadro 3. Ingredientes de la dieta artificial por galón.	15
Cuadro 4. Cepas usadas en los bioensayos de la colección USDA-ARSEF.	21
Cuadro 5. Lt_{50} , formulaciones acuosas y en aceite sobre <i>S. frugiperda</i> .	32
Cuadro 6. Porcentajes de mortalidad para cuatro especies de lepidópteros con formulaciones en aceite mineral de la cepa 762.	33
Cuadro 7. Lt_{50} para <i>Spodoptera</i> , <i>Heliothis</i> y <i>Helicoverpa</i> spp. para cada formulación en aceite de <i>N. rileyi</i> e <i>I. tenuipes</i> , de la segunda sección de bioensayos.	48

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Entomophthora muscae</i> en el hospedero <i>Delia radicum</i> .	7
Figura 2. Porcentaje de mortalidad con tres cepas de <i>N. rileyi</i> sobre tres estadios de <i>S. frugiperda</i> .	29
Figura 3. Porcentaje de mortalidad con una cepa de <i>N. rileyi</i> sobre el tercer estadio de <i>S. frugiperda</i> .	30
Figura 4. Porcentaje de mortalidad con formulaciones en aceite de la cepa NrDN1 de <i>N. rileyi</i> sobre el tercer estadio de <i>S. frugiperda</i> .	31
Figura 5. Porcentaje de mortalidad de cuatro especies de lepidópteros con la cepa 762 en formulaciones de cinco aceites.	34
Figura 6. Porcentajes de mortalidad de tres especies de lepidópteros con formulaciones de cinco aceites de la cepa 135.	35

Figura 7. Porcentaje de mortalidad de cuatro especies de lepidópteros con la cepa 4096 en formulaciones de cinco aceites.	36
Figura 8. Porcentajes de mortalidad de tres especies de lepidópteros con formulaciones de cinco aceites de la cepa 2488.	37
Figura 9. Porcentaje de mortalidad para prepupas de cuatro especies de lepidópteros con formulaciones en aceite mineral de <i>I. tenuipes</i> y <i>N. rileyi</i> .	38
Figura 10. Diferencias entre medios de cultivo PDA con huevo y PDA con levadura, después de 2 transferencias.	45
Figura 11. Larvas de cuarto estadio muertas por formulaciones en aceite de <i>N. rileyi</i> , aun sin esporular	46
Figura 12. Desarrollo de sinemas en pupa de <i>H. virescens</i> infectada por la cepa 2488 de <i>I. tenuipes</i> .	47

I. INTRODUCCIÓN

En la agricultura existen diversos problemas con los que se deben lidiar; uno de ellos es el ataque de organismos considerados plaga. Actualmente se pueden encontrar alternativas para equilibrar las poblaciones de plagas. Dentro del manejo en los sistemas de producción, los hongos entomopatógenos son un ejemplo de estas alternativas. Estos son enemigos naturales de insectos y ácaros, predominando los Hyphomycetes (Ascomycota) y los Entomophthorales (Zygomycota).

Se sabe relativamente poco acerca de la ecología funcional y la fisiología de estos hongos, lo que ha limitado su manipulación en el control biológico de plagas. La infección de los hospederos ocurre mediante la penetración de las hifas por la cutícula. Los entomopatógenos pueden causar epizootias cuando las condiciones ambientales, en particular la humedad relativa y temperatura son favorables, típicamente las epizootias ocurren en los periodos de clima templado (Roy *et al.* 2006).

Entre los entomopatógenos que han sido objeto de estudio pertenecientes a los Hyphomycetes se puede mencionar *Nomuraea rileyi* (Hypocreales: Clavicipitaceae), el cual ha sido reportado provocando epizootias en algunas especies de lepidópteros. Este hongo produce conidias verdes, la forma de éstas va de elipsoidal a cilíndrica, se forman

en cadenas, en conidioforos ramificados con fíalides en forma de botella (Lezama, G. R. 1993). En el área correspondiente a la U.A.A.A.N se han encontrado individuos muertos por la acción de este hongo sobre *Spodoptera frugiperda* y *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae).

El hongo *Isaria tenuipes* (Hypocreales: Clavicipitaceae) (Roy *et al.* 2006) (algunas veces encontrado dentro de la literatura como *Paecilomyces tenuipes* *Isaria japonica* y otros sinónimos) es patógeno de varios lepidópteros. Este hongo infecta larvas y pupas (Fukatsu, 1997), y no ha sido investigado tan a fondo en relación a su potencial como patógeno de plagas como *N. rileyi*; este hongo cuenta con características distintivas como sinemas, conidias ovales, con coloración de blanco a café (Zimmermann, 1980).

En la búsqueda de generación de conocimiento sobre el manejo de los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico para ser utilizados como una herramienta más en el manejo integrado de plagas, se ha encontrado que el uso de estos hongos en formulaciones de aceite presenta ventajas en situaciones específicas. Las formulaciones en aceite de hongos entomopatógenos incrementan la efectividad (Prior *et al.*, 1988).

Las relaciones hospedero-patógeno son frecuentemente consideradas en términos del impacto de la susceptibilidad del hospedero y la virulencia del patógeno (Moore *et al.*, 1992). Dos de los temas con más éxito en hongos para control biológico son infectividad y persistencia del inóculo en el ambiente. También, el incremento en la adhesión de las conidias puede ser útil para sobrepasar la barrera de la patogenicidad (Moore y Prior, 1993).

Los hongos entomopatógenos como bioinsecticidas son adecuados por su amplia propagación en la agricultura. El modo de acción de los hongos, penetración a través de la cutícula, hace que su efectividad sea más amplia que bacterias, virus o protozoarios los cuales tienen que ser ingeridos (Hanley *et al.*, 1995).

En este trabajo se evaluó el aspecto de virulencia utilizando formulaciones de conidias a partir de *N. rielyi* y *P. tenuipes* en suspensiones acuosas y en aceites.

II. OBJETIVO

Determinar la virulencia de los hongos *Nomuraea rileyi* y *Isaria tenuipes* mediante el porcentaje de mortalidad y el tiempo letal medio (TL50), contra cuatro especies de lepidópteros expuestos a formulaciones en aceites de ambos hongos.

III. HIPÓTESIS

Las formulaciones en aceites de conidias de *Nomuraea rileyi* e *Isaria tenuipes* presentarán un alto grado de virulencia sobre plagas agrícolas tales como *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens* y *Helicoverpa zea* y el tiempo letal medio será de alrededor de cuatro días.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Los hongos entomopatógenos biología y taxonomía

Los hongos entomopatógenos (tabla 1) son enemigos naturales comunes de artrópodos en todo el mundo, llamando la atención como agentes potenciales de control biológicos. La investigación fundamental se ha enfocado en muchos aspectos teóricos y prácticos de su biología, la fisiología, ecología y epidemiología, pero predominantemente desde el punto de vista de su potencial en la regulación de población de sus hospederos. Hay más de 700 especies de entomopatógenos dentro del reino Fungi.

La mayoría de las especies son de las divisiones Ascomycota y Zygomycota. Los hongos ascomycetos eran divididos en dos grupos, los Ascomycetes y los Deuteromycetes, este último era conocido como Hongos Imperfectos, especies para las que ninguna fase sexual era conocida. Estudios culturales y moleculares han demostrado que algunos de éstos “hongos imperfectos,” (la clase Hyphomycetes en los Deuteromycetes) eran las fases anamórficas (formas asexuales) de los Ascomycetos dentro del orden Hypocreales, familia Clavicipitaceae. Dentro de los Zygomycetes la

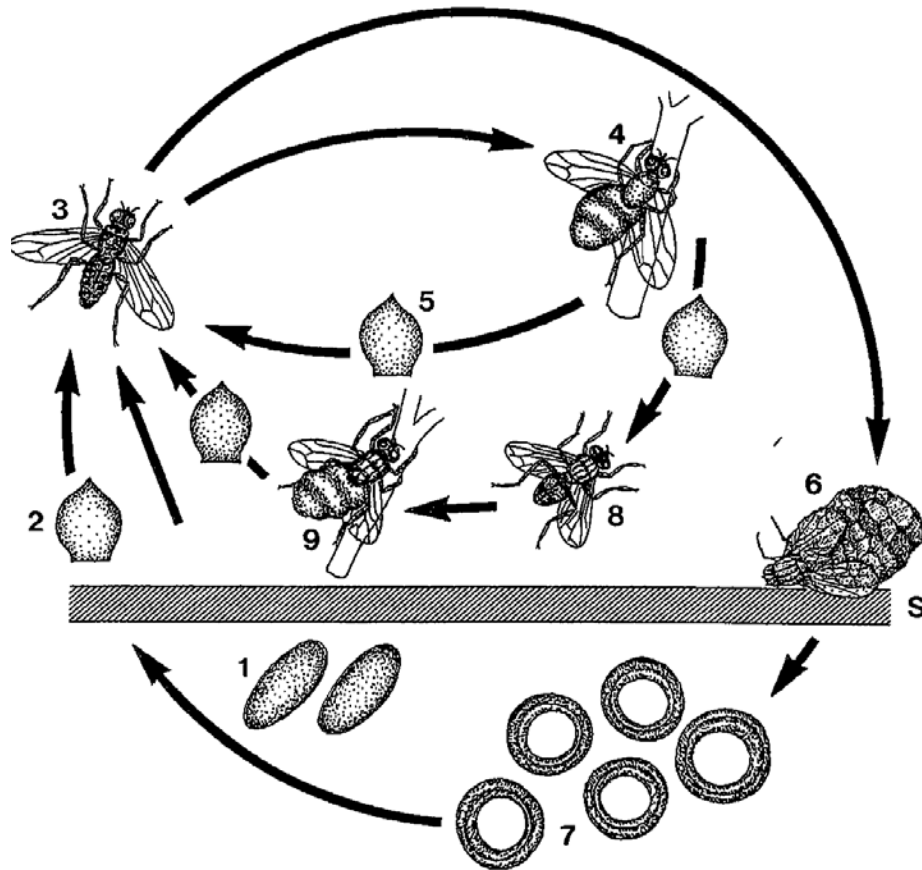
mayoría de las especies de entomopatógenos están en el orden Entomophthorales (Roy *et al.* 2006).

Cuadro 1. Clasificación actual de los géneros de hongos entomopatógenos incluidos en la revisión de Roy *et al.* publicada en 2006.

División	Clase	Orden	Familia	Género
Zygomycota	Zygomycetes	Entomophthorales	Entomophthoraceae	<i>Entomophaga</i> <i>Entomophthora</i> <i>Erynia</i> <i>Eryniopsis</i> <i>Furia</i> <i>Massospora</i> <i>Strongwellsea</i> <i>Pandora</i> <i>Zoophthora</i>
			Neozygiteae	<i>Neozygites</i>
			Ancylistaceae	<i>Conidiobolus</i>
Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Clavicipitaceae	<i>Beauveria</i> ^a <i>Cordyceps</i> <i>Cordycepioideus</i> <i>Lecanicillium</i> ^a <i>Metarhizium</i> ^a <i>Hirsutella</i> ^a <i>Nomuraea</i>

^a*Beauveria*, *Hirsutella* y *Metarhizium*: anamorfo de Clavicipitaceae con conexiones telomorfo a *Cordyceps*; *Lecanicillium*: anamorfo Clavicipitaceae con conexiones telomorfo a *Torrubiella*.

Figura 1. Ciclo de vida de *Entomophthora muscae* en el hospedero *Delia radicum*.



Cada sistema hospedero-patógeno exhibe y posee peculiaridades. Por ejemplo, algunos hongos tienen solo una especie de hospedero, mientras que otros tienen muchas especies de hospederos. Sin embargo, los ciclos de vida de hongos entomopatógenos exhiben generalidades similares.

En la figura 1 se muestra el ciclo de vida de un hongo entomopatógeno el cual se interpreta de la siguiente manera, S = superficie del suelo. 1. Durante el invierno el

estadio del hospedero, en este ejemplo, pupa en el suelo. 2. La conidia asexual, infectiva fue producida por las estructuras del hongo sobrevivientes al invierno y están listas para infectar los estadios susceptibles de los hospederos por adhesión a la cutícula y penetra en el hemocele. 3. Moscas adultas (en este caso la etapa susceptible del hospedero) emerge de la pupa y vuelve a infectar. 4. Después del periodo de incubación el hospedero muere. En el caso de *E. muscae* la muerte del hospedero ocurre adhiriéndose a la vegetación y conidias son producidas desde la muerte del hospedero. 5. Estas conidias pueden infectar hospederos susceptibles. Estas moscas mueren por la infección y producen más inóculo, y como resultado puede ocurrir una epizootia durante un periodo de tiempo. 6. Cuando el número de hospederos susceptibles decrece (por ejemplo, durante el otoño), algunos individuos infectados no producen conidias infectivas en su muerte. Estructuras fungales, que pueden sobrevivir a tiempo prolongado sin la presencia del hospedero, son producidas. En este caso las moscas dejan caer a la superficie del suelo esporas de reposo o de resistencia que producen una pared gruesa (sexual o asexual). Estas estructuras no son infectivas. 7. Las esporas sobreviven el invierno en el suelo y producen conidias infectivas el siguiente año (2). 8. El hongo puede tener un hospedero alternativo, frecuentemente taxonómicamente relacionado al hospedero primario. En este caso otras especies de moscas pueden ser infectadas. 9. Los hospederos alternativos muertos después de la infección y de producir conidias de estos hospederos pueden infectar especímenes del hospedero primario (Eilenberg, and Meadow 2002, citado por Roy *et al.* 2006).

Los hongos infectan un amplio rango de insectos hospederos a comparación de otros organismos e infectan comúnmente Lepidópteros, Homópteros, Himenópteros, Coleópteros y Dípteros (Deacon, 1983).

4.2 Descripción de *Nomuraea rileyi* e *Isaria tenuipes*

4.2.1. Genero *Nomuraea*

Micelio septado, blanco, apariencia esponjada del crecimiento, cubre completamente el insecto; usualmente verde, o purpura grisáceo, conidióforos simples o raramente con sinemas, los racimos de fialides cortos; las células conidiógenas, con el ápice pequeño, conidias redondas a ovoide o alargado y ligeramente encorvado, las cadenas divergentes, pálido verde oscuro, púrpura-gris a la púrpura, o (raramente) blanco en masa (Humber, 1998).

Cuadro 2. Características para identificación de especies: Hospedero y morfología de conidias.

Hospedero	Conidia	Especies
Lepidoptera: Noctuidae	Ovoide, gris-verdosa, raramente blanca.	<i>rileyi</i>
Arañas	Ovoide a cilíndrica o fusionada gris-lavanda (rosa a purpura) a gris.	<i>atypicola</i>

(Humber, 1998).

4.2.1.1. *Nomuraea rileyi*

Nomuraea rileyi (Ascomycetes: Hypocreales, fase mitospórica de Clavicipitaceae) es un patógeno dimórfico de insectos con desconocido estado telomórfico. Es especialista e infecta solo larvas de lepidópteros con preferencia hacia la familia Noctuidae. En todo el mundo, este hongo causa epizootias en poblaciones de importantes plagas. Más de treinta especies de lepidópteros han sido identificadas como susceptibles a este hongo en larvas polífagas de los géneros

Heliothis, Spodoptera, Pseudoplusia, Trichoplusia, Plutella, y Rachiplusia, entre los más susceptibles. Bajo apropiadas condiciones ambientales, ha sido reportado reduciendo drásticamente poblaciones de Noctuidos plaga en Estados Unidos, México, Ecuador, Brasil, Argentina, India, y Australia. Investigaciones han mostrado que aislamientos del hongo de diferentes hospederos y áreas geográficas poseen propiedades biológicas variables. Por ejemplo, aislamientos de *Spodoptera frugiperda* fueron más virulentos a *S. frugiperda* que los aislamientos de *Anticarsia gemmatalis*, entre otros ejemplos (Suwannakut, *et al.* 2005).

4.2.2 Genero *Isaria*

Conidioforos usualmente bien desarrollados, sinemas en varias especies, septado, fálides, hialino, conidia unicelular hialina a colorida (tonalidad de blanca a amarilla, lila, gris, lavanda o gris-verde), en condiciones de baja humedad cadenas divergentes.

Esto se refiere a la clasificación de *Paecilomyces* según Samson (1973).
Subdivisiones taxonómicas: Sección *Paecilomyces*: no entomopatógenos; teleomórficos en Plectomycetes (*Byssochlamys*, etc.)

Sección Isarioidea (reclasificada como género *Isaria*) todas las especies entomopatógenas; telomórficos en Pyrenomycetes (Hypocreales:Clavicipitaceae) y especialmente con *Cordyceps* spp. como entomopatógenos (Humber, 1998).

4.2.2.1. *Isaria tenuipes*

Sinemas de 2 a 5 cm.de altura con un pie amarillo limón y algo aplanados, plumoso y blancos en la parte superior adonde es ramificado y se encuentran las esporas que son blanca en masa y hialinas individualmente. Las esporas le confieren la apariencia pulverulenta y farinácea (López y García, 2002).

Los conidioforos son septados y abundantes, esporas (conidios) algo alantoides de 4 a 5 por 1.5 a 2 micras. Fíalides piriformes de cuello más o menos largo, los conidios se originan individuales o en cadenas cortas. Debido a la gran cantidad de esporas producidas, al tocar los sinemas se desprende un abundante polvo blanco (esporas) (López y García, 2002).

I. tenuipes es un hongo que parasita varios lepidópteros. Infecta pupas o larvas de palomillas, formando sinemas amarillos simples, furcados o brazos irregulares, usualmente de 1.5 a 4.7 cm de largo y brazos densamente poblados y estructuras conidiogenas hinchadas en la punta (Samson, 1974). Ha sido aislado y cultivado en medio artificial a partir de los sinemas que forma, adicionalmente hay reportes los cuales mencionan que se ha inoculado artificialmente a pupas (Fukatsu, 1997).

4.3. Importancia de los principales lepidópteros plaga.

Spodoptera frugiperda Smith 1797, es una especie polífaga que ataca diversos cultivos económicamente importantes en varios países (Praça, *et al.* 2006). Durante las etapas de crecimiento vegetativo del cultivo, las larvas consumen principalmente las

hojas e indirectamente afectan el rendimiento del cultivo reduciendo el área fotosintética, ataques a plantas pequeñas dañan o destruyen el tejido meristemático, ocasionando reducción en el tamaño de las plantas y modificando su arquitectura (Merege, 2001 citado por Praça, *et al.* 2006). El periodo crítico de ataque es la pre-floración y en este periodo la producción puede ser afectada hasta en un 20%, aunque frecuentemente ocasionan pérdida total de la mazorca por pudrición o no comerciabilidad. Esos daños son maximizados en las épocas secas del año (Cruz e Turpin, 1982; citado por Praça, *et al.* 2006). Las larvas de este insecto pueden atacar en todos los estadios del cultivo (Cruz *et al.* 1997; citado por Praça, *et al.* 2006); causa grandes pérdidas en México, América Central y América del Sur (Merege, 2001; citado por Praça, *et al.* 2006).

Anteriormente dentro de la clasificación de lepidópteros se consideraba el complejo *Heliothis*, en el cual se consideraban como de mayor importancia en la agricultura *Helicoverpa (Heliothis) zea* y *Heliothis virescens*, en algodón de crítica importancia en varias áreas de producción. Adicionalmente, este complejo o grupo de especies es importante en otros cultivos como maíz, tomate, soya, sorgo y tabaco (Chairman, 1979).

Heliothis virescens y *Helicoverpa zea* son insectos polífagos de importancia económica en diversos sistemas de cultivo (Fitt, 1989). Debido a la aplicación intensiva de insecticidas con el objetivo de controlar estas plagas, han adquirido resistencia a un amplio rango de insecticidas sintéticos (Sparks 1981, Luttrell *et al.* 1987, Terán-Vargas *et al.* 2005).

4.3.1 Métodos de control

Las larvas de lepidópteros son susceptibles a entomopatógenos como bacterias, hongos, nematodos, protozoarios y virus (Gardner y Fuxa 1980; Lezama-Gutiérrez *et al.* 1996).

4.3.2. Bioinsecticidas

En la actualidad se conocen diferentes especies de microorganismos entomopatógenos con potencial para ser usados en programas de control. Entre ellos están bacterias, hongos, virus y nematodos (Gardner y Fuxa, 1980; Melo y Azevedo, 2000). La mayoría de estos entomopatógenos tienen mayor eficiencia aplicados sobre los primeros estadios larvales. Entre los entomopatógenos más estudiados en maíz están: *Bacillus thuringiensis*, virus de la polihedrosis nuclear (VPN) y *Nomurea rileyi* (Botelho, *et al.*, 2006).

El primer plaguicida comercial a base de virus para uso en la agricultura fue hecho en 1975 bajo el nombre de Elcar, este fue un NPV aislado de y usado para el control de *Helicoverpa* (= *Heliothis*) *zea*. El virus infectaba 7 especies de *Heliothis* y *Helicoverpa* (Deacon, 1983).

Cuadro 3. Ingredientes usados para preparar dieta artificial, cantidades por galón.

Ingredientes	Cantidad utilizada
Harina de soya	156 g
Germen de trigo	133 g
Sal	36 g
Azucar	156 g
Vitaminas	36 g
Agar	85 g
Metil Paraben	3.8 g
Ácido sorbico	3.8 g
Aureomicina	3.8 g
	ml / galón
Mezcla de ácidos 10	540 ml
Agua destilada	418 ml
Ácido propiónico	42 ml
Ácido fosfórico	1000 ml

4.4. Formulaciones de conidias

El uso comercial de hongos patógenos de insectos como micoinsecticidas, requiere que las conidias permanezcan viables e infectivas durante y después del almacenamiento y transporte, también se requiere que el producto sea accesible económicamente (Hanley, *et al.* 1995).

Daoust, *et al.* 1983, discutió el efecto de formulaciones en la viabilidad en conidias de *Metarhizium anisopliae*. En sus experimentos 14 aceites fueron probados incluyendo aceite mineral, aceite de hígado de bacalao y 12 aceites vegetales, ellos encontraron que los catorce aceites fueron perjudiciales para la viabilidad de las conidias después de dos meses de almacenamiento, y que los ácidos orgánicos y agua fueron letales para las conidias.

Conidias de *Beauveria bassiana* y otras especies de hongos entomopatógenos son fuertemente hidrofóbicos y difícilmente se suspenden en agua; muchas veces se utilizan detergentes, sin embargo, en las suspensiones en agua las conidias pueden germinar y perder su infectividad después de veinticuatro horas (Hanley, *et al.* 1995).

4.4.1. Formulaciones en aceite

Los aceites inertes inorgánicos y orgánicos son formulados para aplicación como insecticidas. Los insecticidas son formulados como gases, líquidos o sólidos, frecuentemente con aditivos para realzar sus características como fácil aplicación y persistencia. La mayoría de los insecticidas son formulados para su aplicación como líquidos. Usualmente el agente activo es mezclado con agua. Sin embargo, la mayoría de los insecticidas son emulsiones concentradas (EC), en los cuales a un insecticida se le agrega agua y se dispersa en la suspensión, sólo como jabón líquido o detergente emulsificable en agua. Las emulsiones concentradas son fáciles de guardar y aplicar.

Las formulaciones de hongos en aceite han mostrado buenos resultados en el control biológico de plagas bajo condiciones de campo (Bateman *et al.* 1993 y Batta, 2003). Sin embargo, hay poca información disponible sobre el efecto de los componentes empleados en las formulaciones en aceite (Luz y Batagin, 2005). Probablemente previenen la desecación de las conidias, e incrementan la adhesión y la propagación del inoculo sobre el cuerpo de los hospederos (Vimala y Prasad, 1994).

4.5. Hongos entomopatógenos y sus interacciones

En ecosistemas naturales y agrícolas, complejas interacciones multitróficas involucran a los herbívoros, depredadores, parasitoides y patógenos contribuyendo a la estructura de comunidades de artrópodos. Estudios de relaciones individuales entre insectos y sus depredadores, parasitoides y microorganismos patógenos son muchos y variados (Furlong y Pell, 2005).

Aspectos adicionales incluyen las interacciones entre enemigos naturales. King y Bell en 1978 (citados por Furlong y Pell, 2005), reportaron que el parasitismo de larvas de *Helicoverpa zea* por *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae), incrementa la susceptibilidad del hospedero a *N. rileyi* cuando el hongo es aplicado a la larva inmediatamente después del ataque del parasitoide.

Se han realizado varios estudios para probar la especificidad de un hongo candidato a como agente de control biológico, basados en pruebas de laboratorio e investigaciones de exposición a depredadores conocidos y parasitoides adultos de plagas a elevadas dosis de hongos, por ejemplo, tres especies de depredadores de insectos y cuatro especies de parasitoides en extremadamente altas dosis de *N. rileyi* en laboratorio,

dio como resultado carencia de mortalidad causada por el hongo sobre estos enemigos naturales (Goettel *et al.*, 1990, Ignoffo, 1981; citados por Furlong y Pell, 2005).

Un aspecto importante referente al uso de entomopatógenos trata de su interacción con plaguicidas. Se tiene poco conocimiento sobre la interacción entre herbicidas y microorganismos, comparado con lo conocido acerca de los efectos de los herbicidas en plantas. Algunos efectos directos de los herbicidas, además de matar malezas, pueden incluir predisposición de hongos a fungicidas, actuando como sinergistas o teniendo propiedades fungicidas (Levesque y Rahe, 1992). Los herbicidas también pueden tener efectos indirectos causados por el control de malezas. Estos pueden incluir cambios en las interacciones normales entre hongos, cultivos, malezas y cambios en el microambiente (Levesque y Rahe citados por Morjan *et al.* 2002).

Los efectos fungicidas del herbicida glifosato y formulaciones de glifosato fueron evaluados bajo condiciones de laboratorio en los hongos entomopatógenos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *N. rileyi*, y *Neozygites floridana*. Medios de crecimiento previamente inoculados con los hongos entomopatógenos fueron expuestos a agua destilada, glifosato (ingrediente activo), siete formulaciones de glifosato, y cinco formulaciones sin ingrediente activo (inertes). La actividad fungicida fue determinada en medios de crecimiento sólidos midiendo el área de crecimiento micelial inhibido (*B.*

bassiana, *M. anisopliae*, y *N. rileyi*), y en el medio de crecimiento líquido determinando la densidad de esporas (*N. floridana*). Las propiedades fungicidas de las formulaciones de glifosato difirieron entre las especies de hongos. *Neozygites floridana* y *M. anisopliae* fueron susceptibles a todas las formulaciones de glifosato. RoundUp Ready-To-Use fue consistentemente una de las formulaciones de glifosato con propiedades fungicidas más fuertes. La actividad fungicida de varias formulaciones presentó un efecto sinérgico con glifosato. RoundUp Original fue la única formulación que no mostró ninguna interacción en la actividad fungicida entre glifosato y la formulación. Los resultados mostraron que los cuatro hongos son susceptibles a varias de las formulaciones de glifosato cuando fueron expuestos a concentraciones de campo (Morjan, *et al.* 2002).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudió la actividad de *N. rileyi* e *I. tenuipes* sobre larvas de *S. frugiperda*, *S. exigua*, *Helicoverpa zea*, y *Heliothis virescens*, (Lepidoptera: Noctuidae). El experimento consistió en dos grupos de bioensayos: en el primero se utilizaron cepas recién colectadas de *N. rileyi* aisladas de *S. frugiperda* en Saltillo, Coahuila, Mexico; e *I. tenuipes* de el Agricultural Research Service (USDA-ARSEF collection) estos fueron probados únicamente sobre gusano cogollero, *S. frugiperda*. En el segundo grupo de pruebas todas las cepas se obtuvieron de la colección de hongos entomopatógenos del USDA-ARSEF (Cuadro 4); éstas se probaron sobre larvas y prepupas de *S. frugiperda*, *S. exigua*, *H. zea* y *H. virescens*.

Cuadro 4. Cepas usadas en los bioensayos de la colección USDA-ARSEF.

Cepa ARSEF	Hongo	Origen	Hospedero
135	<i>Nomuraea rileyi</i>	Stoneville, MS	Lepidoptera: Noctuidae
762	<i>Nomuraea rileyi</i>	Columbia, Missouri	<i>Plathypena scabra</i>
2488	<i>Isaria tenuipes</i>	Gomez Farias, Mexico	<i>S. frugiperda</i>
2489	<i>Isaria tenuipes</i>	Gomez Farias, Mexico	<i>S. frugiperda</i>
4096	<i>Isaria tenuipes</i>	Brazil	Lepidoptera: Noctuidae

5.1. Localización del Área de Estudio

Primera parte del estudio

Se realizaron pruebas en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, la cual se encuentra a una altura sobre el nivel del mar de 1789.83 m, latitud de 25° 22'35'' y longitud de 101° 01'00'', presenta una precipitación promedio anual de 300 a 400 mm, una temperatura media anual de 17.5° C. Se indican estos datos pues tanto las larvas (*S. frugiperda*) como las cepas de *N. rileyi* utilizadas aquí se colectaron en esta localidad.

Segunda parte del estudio

Bioensayos realizados en la Unidad Stoneville, Mississippi, Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA-ARS),

5.2. Primera sección de bioensayos

5.2.1. Obtención insectos y aislamientos de los hongos entomopatógenos

En Septiembre del 2006 se aislaron tres cepas de *Nomuraea rileyi*, a partir de larvas de *Spodoptera frugiperda* colectadas en maíz, para esta primera parte solo se utilizó una cepa de *Isaria tenuipes*, esta se obtuvo de la colección de hongos

entomopatógenos del departamento de agricultura de Estados Unidos (USDA-ARSEF) (Cuadro 4).

Cada cepa se aisló en agar papa dextrosa (PDA) fortificado con huevo, este se utilizó cuando se aislo *N. rileyi* directamente de la larva, posteriormente se utilizo medio de cultivo con extracto de levadura (1%) para mantener la propagación de las dos especies de hongos y la producción de conidias.

La producción de larvas para los bioensayos se realizó mediante la cría de una colonia de *S. frugiperda*, se colectaron de campo masas de huevecillos, larvas y palomillas de esta especie, las larvas se conservaron en dieta semisintética a base de germen de trigo (Cuadro 3).

5.2.2. Infección de *S. frugiperda* por inmersión utilizando formulaciones acuosas de *N. rileyi*.

Por medio de inmersión de larvas de *S. frugiperda* en formulaciones en agua de *N. rileyi* de tres cepas. Se realizaron dos bioensayos, en el primero se evaluaron las tres cepas (NrL1, NrDN1 y NrSS2) para identificar la que tuviera mayor virulencia, sobre larvas de primer, segundo y tercer estadio, el porcentaje total de mortalidad se registro siete días después, y el segundo utilizando la cepa que obtuvo los mejores resultados del

bioensayo anterior únicamente sobre larvas de tercer estadio y registrando la muerte a los dos, cuatro y siete días después de la inoculación. Las larvas fueron sumergidas en las suspensiones de conidias del hongo la cual se encontraba a una concentración de 2.5×10^7 conidias/ml en agua con Tween 80 (Merck Schuchardt, Hohenbrunn, Germany) al 0.05 %. Ochenta larvas se utilizaron para cada tratamiento, cada larva se sumergió en la suspensión durante dos segundos, el testigo consistió en sumergir las larvas en una solución de Tween sin conidias. Después de exponer las larvas a cada uno de los tratamientos se conservaron en recipientes plásticos con capacidad de 37 ml (SOLO Cup Company) con zacate bermuda (*Cynodon* spp.), y un algodón húmedo, a 25°C.

5.2.3. Conidias en suspensiones acuosas y en aceite de *N. rileyi* y *P. tenuipes* sobre larvas de tercer estadio.

Conidias de la cepa NrDN1 de *N. rileyi* fueron tomadas de los medios de cultivo con asas bacteriológicas y suspendidas en aceites, los aceites utilizados fueron (Soraya, Industrial Aceitera, S. A. de C. V.), mineral (Mennen, Colgate-Palmolive, S. A. de C. V.) y canola (Maravilla, Industria Aceitera, S. A. de C. V.). las conidias de *P. tenuipes* (cepa 2489) se suspendieron en aceite de soya. Las suspensiones en aceite (2 µl a una concentración de 2.5×10^7 conidia/ml, equivalente a 5×10^5 conidias/larva) fueron aplicadas en el dorso del abdominal de las larvas utilizando una micropipeta. Una cantidad equivalente de aceite de soya fue usada como testigo. se conservaron en

recipientes plásticos con capacidad de 37 ml (SOLO Cup Company) con zacate bermuda (*Cynodon* spp.), y un algodón húmedo, a 25°C. la mortalidad se registro durante los nueve días después de la inoculación.

5.3. Segunda sección de bioensayos

5.3.1. Insectos, cepas de los hongos, aceites usados y condiciones en los bioensayos

Cepas de *N. rileyi* e *I. tenuipes*, de la colección de ARSEF (Cuadro 4) crecieron en PDA con levadura a 25°C bajo luz fluorescente. Las conidias fueron suspendidas un cada aceite utilizado, estos fueron: girasol (Kroger, CO.), cacahuete

(LouAna, Ventura foods, Llc.), olive (Kroger, Co.), mineral (Johnson and Johnson, Inc.) y canola (LouAna, Ventura foods, Llc.). Se aplicaron 2 µl de suspension a 2.5×10^7 conidia/ml, equivalente a 5×10^5 conidias/larva en el dorso abdominal de cada larva de las cuatro especies de Noctuidos, *S. frugiperda*, *S. exigua*, *H. zea*, y *H. virescens*, las tres primeras especies mencionadas, se obtuvieron de Benzon Research, y *H. virescens* se obtuvo de la colonia del USDA-ARS en Stoneville, MS. las larvas se mantuvieron a 25° C en recipientes de plástico de 37 ml con dieta sintética. Las larvas muertas se separaron en cajas petri con algodón húmedo para incrementar la humedad e

inducir la esporulación, para verificar la infección del hongo, se utilizaron 100 larvas por tratamiento.

5.3.2. Mortalidad de 2do., 3er y 4to estadio larval de cuatro especies de Noctuidos expuestos a la cepa 762 de *N. rileyi*.

Para comparar la actividad de la cepa 762 en formulaciones en aceite mineral sobre tres estadios de *S. frugiperda*, *S. exigua*, *H. zea* y *H. virescens*, se aplicaron 2 µl de la suspensión en cada larva como fue descrito anteriormente, la mortalidad fue registrada durante ocho días.

5.3.3. Mortalidad de larvas del tercer estadio sobre cuatro especies de Noctuidos expuestos a las cepas 135 y 762 de *N. rileyi* y 4096 y 2488 de *P. tenuipes*

Se expusieron larvas del tercer estadio de las cuatro especies a cinco formulaciones en aceites (mineral, canola, girasol, oliva y cacahuete), como testigo aceite mineral sin conidias, y un testigo absoluto. Para este bioensayo, no se tienen resultados en las cepas 135 de *N. rileyi* sobre *H. zea* y 2488 de *P. tenuipes* sobre *S. exigua*, debido a la falta de larvas.

En un bioensayo adicional se evaluó la mortalidad de larvas de 3er instar de estas especies expuestas a formulaciones en aceite mineral de *P. tenuipes* (cepas 2488 y 4096 ARSEF).

5.3.3. Mortalidad de prepupas de cuatro especies de lepidópteros expuestas a las cepas 135 de *N. rileyi*. 2488, 2489 y 4096 de *P. tenuipes*.

Prepupas fueron expuestas a las suspensiones de hongos utilizadas en los bioensayos anteriores, utilizando el mismo procedimiento descrito para larvas. La mortalidad fue registrada ocho días después.

5.4. Análisis estadístico

Se utilizó un análisis probit para estimar el tiempo letal medio (LT_{50}), la mortalidad no fue ajustada (Abbott, 1925) debido a que la mortalidad del testigo fue menor o igual a 5 %. Se utilizó el programa StatsDirect (2008) de StatsDirect Ltd.

VI. RESULTADOS

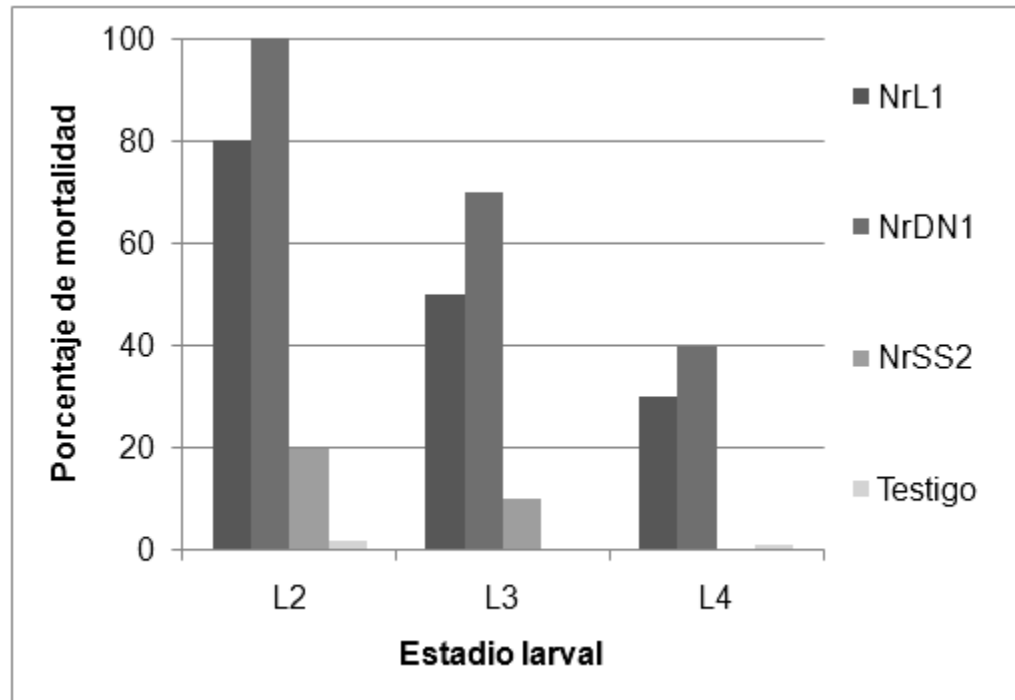
6.1. Obtención insectos y aislamientos de los hongos entomopatógenos

Las cepas de *N. rileyi* se tomaron de las larvas y crecieron en PDA con huevo, posteriormente se transfirieron a PDA con levadura ya que después de ser transferidos más de una vez en el medio de cultivo con huevo, el hongo solo desarrollaba crecimiento miceliar pero no llegaba a esporular (Figura 10). En el caso de *P. tebuipes* la cepa fue recibida del ARSEF en PDA y se mantuvo en este medio en el cual se obtuvo abundante esporulación.

6.2. Infección de *S. frugiperda* por inmersión utilizando formulaciones acuosas de *N. rileyi*.

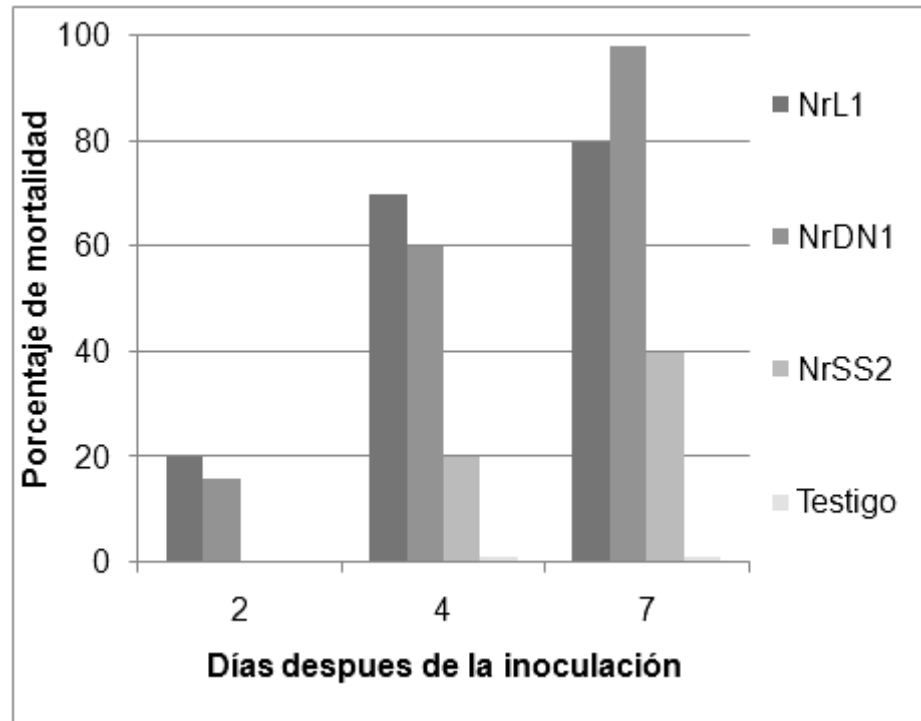
En la inoculación sobre diferentes estadios, se observó mortalidad en todos los estadios evaluados. La mortalidad se presentó rápidamente en larvas de segundo y tercer instar con la cepa NrDN1. La mortalidad de las larvas de los diferentes estadios fue 100% para el segundo estadio, 80 % para el tercero y 40 % para el cuarto, siete días después de la inoculación (Figura 2).

Figura 2. Porcentaje de mortalidad con tres cepas de *N. rileyi* sobre tres estadios de *S. frugiperda*.



Para las pruebas con un solo estadio, la mortalidad de 20 % en el tercer estadio fue observada a los dos días después de la inmersión en suspensión de conidias con la cepa NrDN1; el cuarto día para la cepa NrL1 se obtuvo 70 % de mortalidad y para NrDN1 60 %; en la única cepa en la que se obtuvo 100 % de mortalidad fue en la NrDN1, esto siete días después de de la infección del hongo (Figura 3).

Figura 3. Porcentaje de mortalidad con una cepa de *N. rileyi* sobre el tercer estadio de *S. frugiperda*.

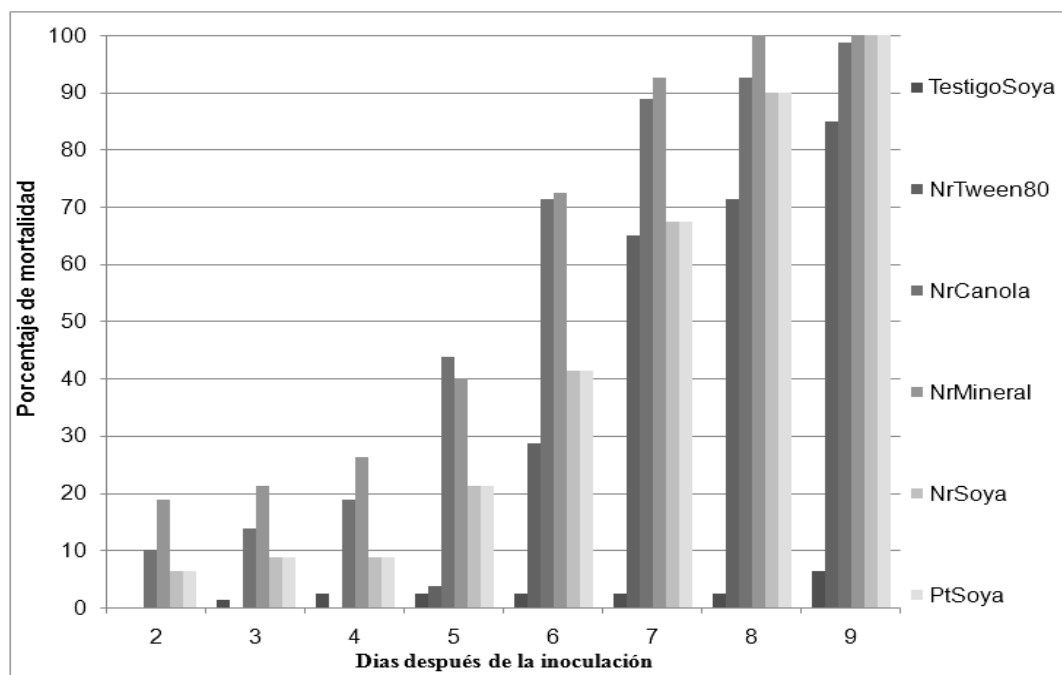


En ambas pruebas, las larvas mostraron las características comunes presentes en las infecciones provocadas por *N. rileyi* (Thorvilson, *et al.*, 1984). Bajo condiciones de alto porcentaje de humedad, cuatro o cinco días después de la inoculación era visible crecimiento miceliar, y siete u ocho días después de la muerte se presentó la producción de esporas en las larvas. Para los siguientes experimentos solo se usó el tercer estadio y la cepa NrDN1.

6.2.1. Conidias en suspensiones acuosas y en aceite de *N. rileyi* y *I. tenuipes* sobre larvas de tercer estadio.

En el tercer bioensayo (Figura 4), 6 a 19 % de larvas muertas fueron observadas para *N. rileyi* en formulaciones en aceite después de dos días. En el caso de formulaciones con Tween se registró el 3% de mortalidad después de cuatro días, en el tratamiento de *P. tenuipes* suspensión en aceite de soya se observó mortalidad de 5% al segundo días. El 100 % de mortalidad se presentó en los tratamientos de *P. tenuipes* y *N. rileyi* con aceite de soya, y el de *N. rileyi* en aceite mineral.

Figura 4. Porcentaje de mortalidad con formulaciones en aceite de la cepa NrDN1 de *N. rileyi* sobre el tercer estadio de *S. frugiperda*.



Los resultados más bajos de LT50 se presentaron en el rango de 4.7 días en aceite mineral a 6.0 en los otros tratamiento, el más alto 7.0 días para la formulación en Tween (Cuadro 5).

Cuadro 5. Lt 50, formulaciones acuosas y en aceite sobre *S. frugiperda*.

Hongo	Cepa	Surfactante	Lt₅₀ e intervalos de confianza
<i>N. rileyi</i>	NrDN1	Aceite de canola	5.11 (4.88 - 5.33)
<i>N. rileyi</i>	NrDN1	Tween80	7.02 (6.64 - 7.42)
<i>N. rileyi</i>	NrDN1	Aceite de soya	6.02 (5.47 - 6.58)
<i>N. rileyi</i>	NrDN1	Aceite mineral	4.73 (4.11 - 5.34)
<i>P. tenuipes</i>	ARSEF 2489	Aceite de soya	6.02 (5.47 - 6.58)

6.3. Segunda sección de bioensayos

6.3.1. Mortalidad de 2do., 3er y 4to estadio larval de cuatro especies de Noctuidos expuestos a la cepa 762 de *N. rileyi*.

El mayor porcentaje de mortalidad se obtuvo sobre *S. frugiperda*, el rango de mortalidad entre los estadios en orden decreciente fue *S. frugiperda* (92 a 100 %); *S. exigua* (74 a 100 %); *H. zea* (4 a 20 %); y *H. virescens* (6 a 15 %) (Cuadro 6).

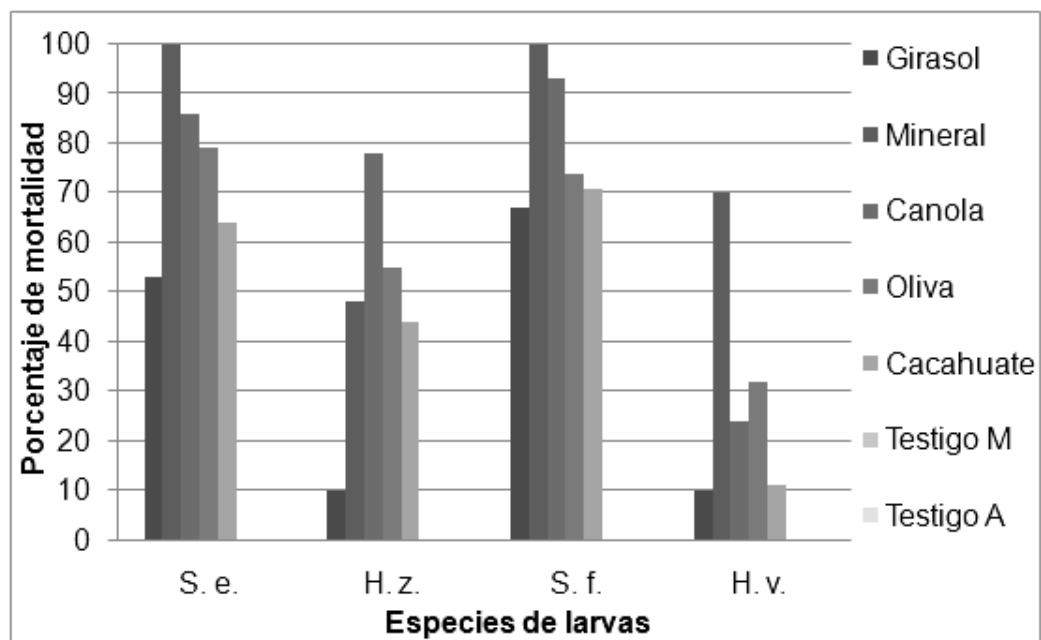
Cuadro 6. Porcentajes de mortalidad para cuatro especies de lepidópteros con formulaciones en aceite mineral de la cepa 762.

Species of larvae	Instar larval	Percentage of mortality
<i>S. exigua</i>	L2	92
	L3	80
	L4	74
<i>S. frugiperda</i>	L2	100
	L3	92
	L4	92
<i>H. zea</i>	L2	20
	L3	10
	L4	4
<i>H. virescens</i>	L2	15
	L3	12
	L4	6

6.3.2. Mortalidad de larvas del tercer estadio sobre cuatro especies de Noctuidos expuestos a las cepas 135 y 762 de *N. rileyi* y 4096 y 2488 de *P. tenuipes*

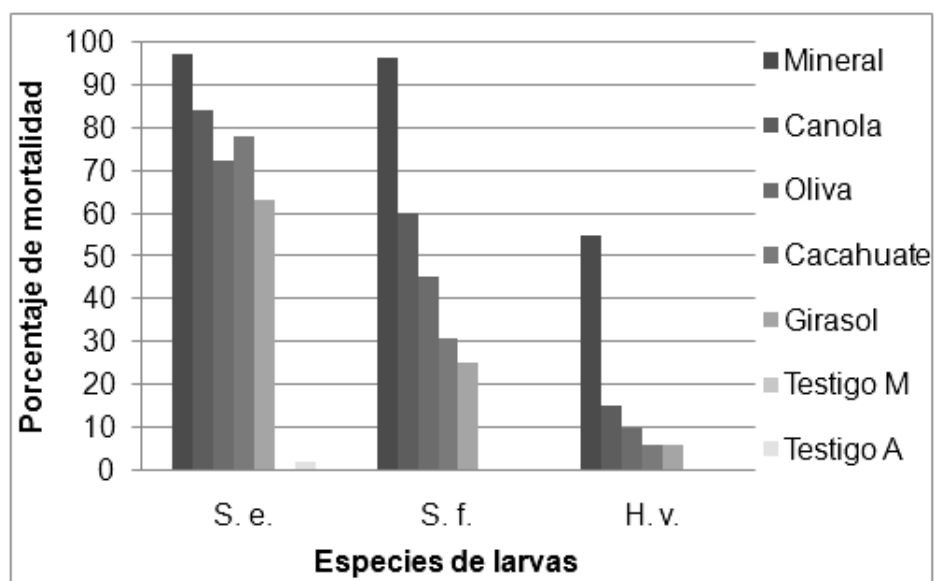
La mortalidad en los tratamientos con la cepa 762, para *S. exigua* en aceite mineral fue de 100 %, *H. zea* 78 % en aceite de canola, *S. frugiperda* 100% en aceite mineral, y 70 % en aceite mineral para *H. virescens* (Figura 5).

Figura 5. Porcentaje de mortalidad de cuatro especies de lepidópteros con la cepa 762 en formulaciones de cinco aceites.



Los porcentajes más altos para la cepa 135, sobre *S. exigua* 97 % en la formulación con aceite mineral, 96 % y 55 % en la misma formulación para *S. frugiperda* y *H. virescens* respectivamente (Figura 6).

Figura 6. Porcentajes de mortalidad de tres especies de lepidópteros con formulaciones de cinco aceites de la cepa 135.



En los tratamientos con formulaciones de *P. tenuipes*, en ambas cepas los más altos porcentajes se presentaron en las formulaciones en aceite (Figura 7 y 8).

Figura 7. Porcentaje de mortalidad de cuatro especies de lepidópteros con la cepa 4096 en formulaciones de cinco aceites.

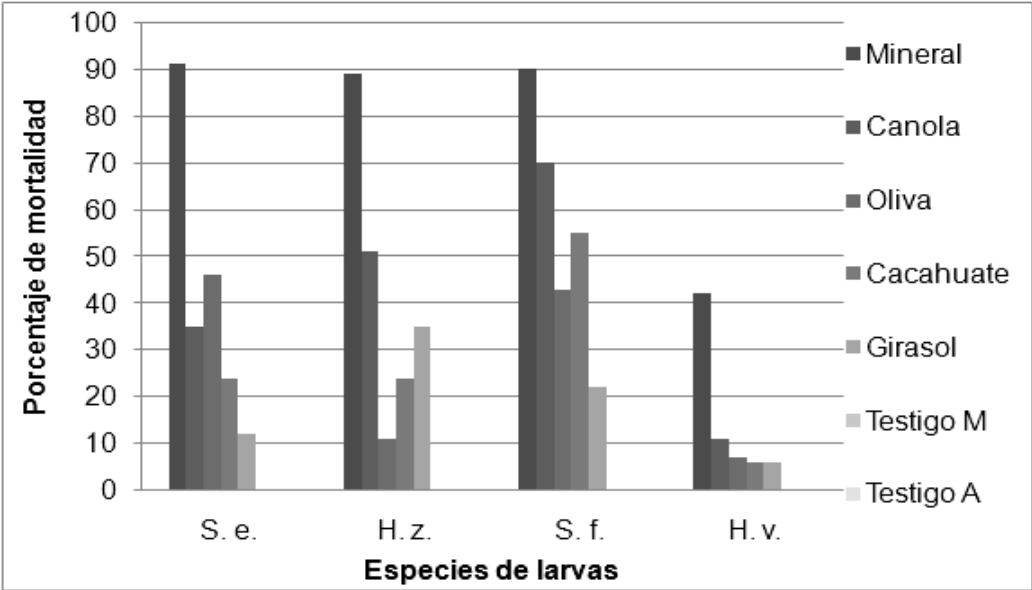
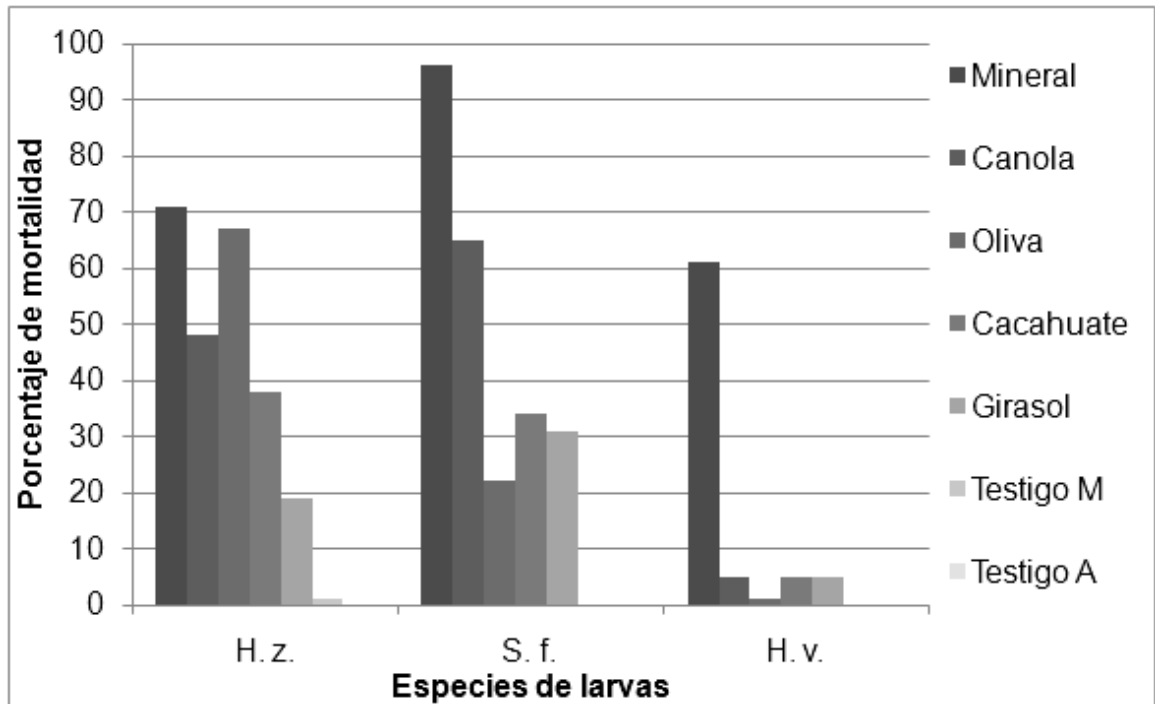


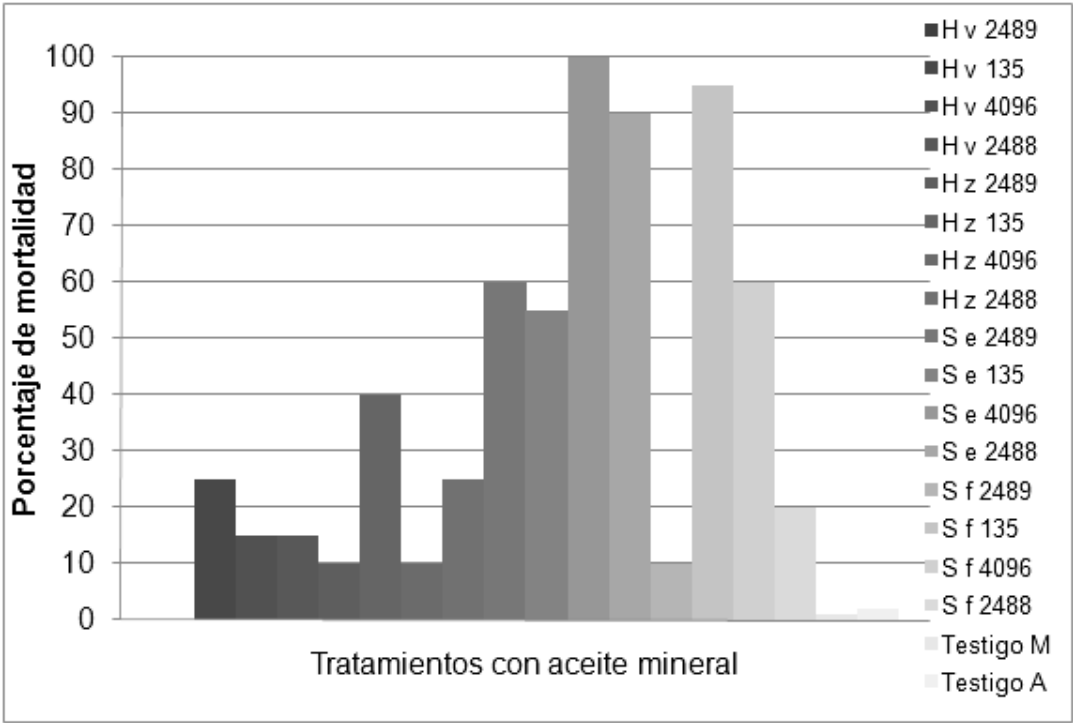
Figura 8. Porcentajes de mortalidad de tres especies de lepidópteros con formulaciones de cinco aceites de la cepa 2488.



6.3.3. Mortalidad de prepupas de cuatro especies de lepidópteros expuestas a las cepas 135 de *N. rileyi*, 2488, 2489 y 4096 de *P. tenuipes*.

En este bioensayo se obtuvo una gran variación en los porcentajes de mortalidad en cuanto a las especies de lepidóptero y de hongo, los resultados más sobresalientes se presentaron en la cepa 4096 (100 %) y 2488 (90 %) de *I. tenuipes* sobre *S. exigua*, y la cepa 135 de *N. rileyi* con 95 % de mortalidad sobre *S. frugiperda* (Figura 9).

Figura 9. Porcentaje de mortalidad para prepupas de cuatro especies de lepidópteros con formulaciones en aceite mineral de *I. tenuipes* y *N. rileyi*.



VII. CONCLUSIONES

1. La mayoría de las formulaciones de esporas de los hongos entomopatógenos causaron altos niveles de mortalidad sobre *Spodoptera* spp., y *Helicoverpa* mostro mortalidades intermedias. *Heliothis virescens* parece tener más resistencia a ambas especies de hongos. Los mecanismos de resistencia requieren investigaciones futuras.
2. Los valores de tiempo letal 50 pueden ser tan bajos como 2.2 días para *Spodoptera* spp.
3. La aplicación de *N. rileyi* and *P. tenuipes* en prpupas causa mortalidad evidente hasta el estado de pupa.
4. Considerando los altos porcentajes de mortalidad y los bajos tiempos letales observados, justifican investigaciones futuras en el tema.

VIII. LITERATURA CITADA

Bateman, R. P. *et al.* 1993. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidity. *Ann Appl Biol*; 122: 145–152.

Batta, Y. A. 2003. Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Crop Protection*; 22: 415–422.

Chairman, W. S. L. 1979. Economic thresholds and sampling of *Heliothis* species on cotton, corn, soybeans and other host plants. Southern cooperative series. Bulletin 231.

Deacon, J. W. 1983. Microbial control of plant pests and diseases. Aspects of microbiology 7. American society for microbiology. Washington, D. C. p. 88.

Fitt, G. P. 1989. The agroecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. *Ann. Rev. Entomol.* 34: 17-52.

Fukatsu, T. *et al.* 1997. Isolation, inoculation to insect host, and molecular phylogeny of an Entomogenous fungus *Isaria tenuipes*. J. Invertebr. Pathol. 70, 203-208.

Furlong, M. J. y Pell, K. J. 2005. Interactions between entomopathogenic fungi and arthropod natural enemies. En: Vega y Blackwell. Insect- Fungal associations (Ecology and evolution). Oxford University Press. New. York. p. 333: 51-73

Gardner, W. A., and J. R. Fuxa. 1980. Pathogens for the suppression of the fall armyworm. Fla. Entomol. 63: 439-447.

Hanley, E. A. *et al.* 1995. Formulations of entomopathogenic fungi for use as biological insecticides. Internacional application published under the patent cooperation treaty (PCT). International publication number 95/10597

Humber, R. A. 1998. Entomopathogenic fungal identification. APS/ESA Workshop. Joint Annual Meeting. Las Vegas, NV. p. 26.

Levesque, C. A. and Rahe, J. E. 1992. Herbicide interactions with fungal root pathogens, with special reference to glyphosate. Annu. Rev. Phytopathol. 30: 579-602.

Lezama G. R. 1993. Patogenicidad de Hongos (Hyphomycetes) y del Nematodo Entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis. Doctorado en Ciencias Especialidad en Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Colima. Tecomán, Colima.

Lezama-Gutierrez, R., R. Alatorre-Rosas, L. F. Bojalil-Jaber, J. Molina-Ochoa, M. Arenas-Vargas, M. Gonzalez-Ramirez, and o. Rebolledo-Dominguez. 1996. Virulence of five entomopathogenic fungi (Hyphomycetes) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs and neonate larvae. *Vedalia* 3: 35-39.

López, R. A. y Garcia, A. J. 2002. Fungy: Hycomycetes *Isaria tenuipes*. *Funga Veracruzana*. Num. 76

Luttrell, R. G., R. T. Roush, A. Ali, J. S. Mink, M. R. Reid and G. L. Snodgrass. 1987. Pyrethroid resistance in field populations of *H. virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Mississippi in 1986. *J. Econ. Entomol.* 80: 985-989.

Luz, C. and Batagin, I. 2005. Potential of oil-based formulations of *Beauveria bassiana* to control *Triatoma infestans*. *Mycopathologia*. 160: 51–62

Moore, D., Reed, M., Le Patourel, G., Abraham ,Y.J., Prior, C. 1992. Reduction of Feeding by the Desert Locust, *Schistocerca gregaria*, After Infection with *Metarhizium flavoviride*. *J. Invertebr. Pathol.* 60:304–307

Moore, D., and Prior, C. 1993. *Biocontrol News Info*. 14, 31N–40N.

Morjan, W. E., Pedigo, L. P. and Lewis, L. C. 2002. Fungicidal Effects of Glyphosate and Glyphosate Formulations on Four Species of Entomopathogenic Fungi. *Environmental Entomology- Biological Control*. 31(6): 1206-1212

Praça, L. B., da Silva Neto, S. P. y Gomes, M. R. 2006. *Spodoptera frugiperda* J. Smith 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) *Biologia, Amostragem e Métodos de Controle*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 1ª Edição. 1ª Impressão. Título. IV. Série 632.96 – CDD 21. Brasília, DF.

- Prior, C., Jollands, P., and le Patourel, G. 1988. *J. Invertebr. Pathol.* 52, 66–72.
- Roy, E. H., *et al.* 2006. Bizarre Interactions and Endgames: Entomopathogenic Fungi and Their Arthropod Hosts. *Annual Review of Entomology.* 51:331-358
- Samson, R. A. 1974. *Isaria* and some allied Hyphomycetes. *Stud. Mycol.* 6, 1–119.
- Sparks, T. C. 1981. Development of insecticide resistance in *Heliothis zea* and *Heliothis virescens* in North America. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 27: 186-192.
- Suwannakut, S., Boucias, D. G., Wiwat, C. 2005. Genotypic analysis of *Nomuraea rileyi* collected from various noctuid host. *J. Invertebr. Pathol.* 90, 169-176.
- Vimala, D. P. S. y Prasad, Y. G. 1994. Compatibility of oils and antifeedants of plant origin with the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 68, 91–93
- Zimmermann, G. V. 1980. *Isaria tenuipes* (Peck) Samson, ein seltener insektenpathogener Pilz an Noctuiden. *Anz Schädlingsskde., Pflanzenschutz, Umweltschutz, Berlin und Hamburg.* 53, 69-72

IX. APENDICE

Figura 10. Diferencias entre medios de cultivo PDA con huevo y PDA con levadura, después de 2 transferencias.

a)



b)

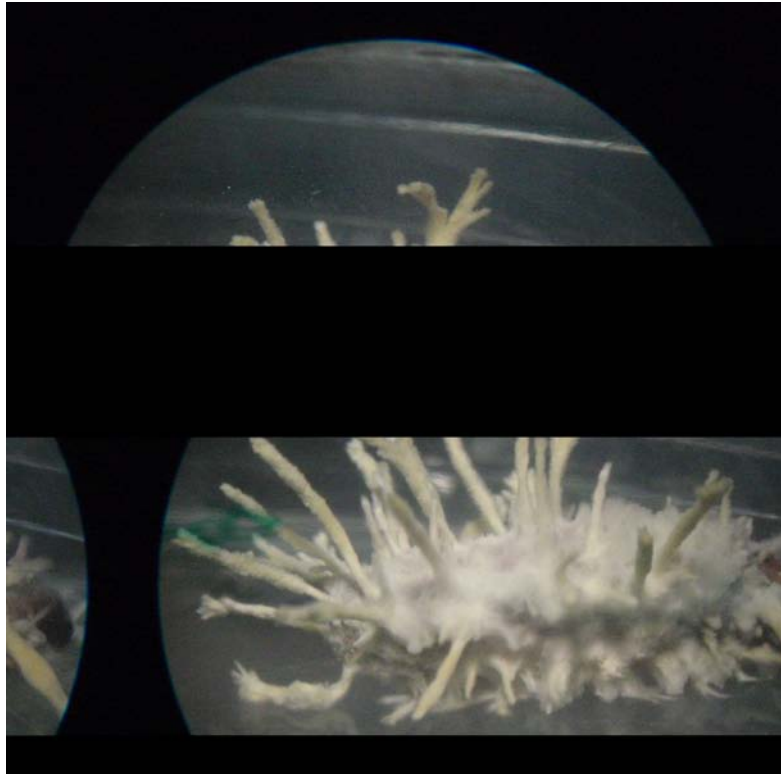


a). Dos cepas de *N. rileyi*, la primera revisada un mes después de haberse sembrado en medio de cultivo con huevo, sin esporular, la segunda caja petri muestra esporulación después de 10 días de la siembra en PDA con levadura. b). la primera caja muestra una cepa de *N. rileyi* en PDA con levadura con el hongo esporulando, la segunda caja es una cepa de *P. tenuipes* sin esporular en PDA con huevo.

Figura 11. Larvas de cuarto estadio muertas por formulaciones en aceite de *N. rileyi*, aun sin esporular,



Figura 12. Desarrollo de sinemas en pupa de *H. virescens* infectada por la cepa 2488 de *I. tenuipes*.



Cuadro 7. Lt 50 para *Spodoptera*, *Heliothis* y *Helicoverpa* spp. para cada formulación en aceite de *N. rileyi* e *I. tenuipes*, de la segunda sección de bioensayos.

Cepa (ARSEF)	Especie de larva	Acete mineral Lt50 e intervalos de confianza	Acete canola Lt50 e intervalos de confianza	Acete oliva Lt50 e intervalos de confianza	Acete cacahuete Lt50 e intervalos de confianza	Acete girasol Lt50 e intervalos de confianza
N. rileyi	S. frugiperda	2.90 1.82 - 3.96	4.68 4.11 - 5.24	5.85 4.97 - 6.76	5.43 4.41 - 6.48	5.96 5.17 - 6.78
762	H. virescens	6.80 6.36 - 7.26	8.77 8.38 - 9.58	8.44 8.18 - 8.92	9.08 8.54 - 11.55	9.18 8.58 - 12.19
	S. exigua	3.24 2.57 - 3.90	4.74 3.97 - 5.52	5.73 5.14 - 6.33	6.34 5.50 - 7.22	7.34 6.96 - 7.82
	H. zea	7.57 6.96 - 8.25	11.49 10.05 - 14.47	7.32 6.62 - 8.09	7.87 7.49 - 8.37	11.63 10.06 - 15.51
N. rileyi	S. frugiperda	2.58 1.31 - 3.82	6.02 4.98 - 7.11	7.40 5.96 - 8.98	8.93 7.03 - 11.16	10.26 7.04 - 14.21
135	H. virescens	7.26 6.38 - 8.25	11.52 10.09 - 14.26	11.88 10.17 - 16.48	14.25 11.48 - 22.45	12.09 10.16 - 18.83
	S. exigua	4.32 3.64 - 5.00	4.81 4.09 - 5.53	6.00 5.52 - 6.51	5.80 5.10 - 6.52	6.77 6.18 - 7.42
P. tenuipes	S. frugiperda	5.63 4.91 - 6.38	6.27 6.02 - 6.55	8.10 7.70 - 8.63	7.15 6.80 - 7.57	10.65 9.46 - 12.66
4096	H. virescens	8.51 7.80 - 9.02	16.71 12.82 - 27.98	17.79 13.31 - 32.86	12.57 10.39 - 18.35	20.98 14.55 - 54.10
	S. exigua	5.47 4.99 - 5.96	8.43 6.09 - 11.07	7.93 7.53 - 8.44	9.68 8.90 - 10.93	11.84 10.27 - 15.06
	H. zea	5.64 5.16 - 6.15	8.43 6.09 - 11.07	11.51 10.03 - 14.82	9.87 9.02 - 11.25	8.84 7.35 - 10.60
P. tenuipes	S. frugiperda	5.12 4.77 - 5.47	6.16 5.46 - 6.90	9.84 7.72 - 12.46	8.92 8.27 - 9.86	9.63 8.78 - 10.93
2488	H. virescens	7.29 6.95 - 7.71	16.54 12.64 - 29.81	-----	21.60 14.51 - 75.32	10.87 9.37 - 20.40
	H. zea	6.29 6.04 - 6.58	7.41 6.41 - 8.54	6.35 5.75 - 6.99	8.62 8.04 - 9.43	10.73 9.58 - 12.70

X. ARTÍCULO

Activity of oil-formulated conidia of the fungal entomopathogens *Nomuraea rileyi* and *Isaria tenuipes* against lepidopterous larvae

Submitted for Journal Invertebrate Pathology

Paulina Vega-Aquino¹, Sergio Sánchez-Peña¹ and Carlos A. Blanco²

¹Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, México C.P. 25315

²U.S.D.A. Agricultural Research Service, Southern Insect Management Research Unit, Stoneville, MS 38776

Abstract: The fungi *Nomuraea rileyi* and *Isaria tenuipes* are widespread and they are ecologically obligate pathogens of lepidopterans. Bioassays were carried out to evaluate the activity of oil-suspended conidia of *N. rileyi* and *I. tenuipes* against larvae of *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Helicoverpa zea*, and *Heliothis virescens*. The tests consisted of two bioassay sets. In the first set, conidia of strains of *N. rileyi* (freshly isolated) and of *I. tenuipes* (from USDA- ARSEF collection), were suspended in water + Tween 80%, and vegetable (canola, soybean) and mineral oils and tested against *S. frugiperda*. Both fungi were highly compatible with oils and caused mortalities of ≤ 100 % in all oil treatments; the lowest LT₅₀ values were 4.7 days for *N. rileyi* in mineral oil and 6.0 days for *I. tenuipes* in soybean oil. The second set included additional fungi strains in oil formulations (mineral, canola, sunflower, olive and peanut oils) tested against larvae of *S. exigua*, *S. frugiperda*, *H. zea* and *H. virescens*. The highest activity was that of *N. rileyi* in mineral oil formulations against *Spodoptera* spp.,

with LT₅₀ values of 2.5 days (strain ARSEF 135) and 2.9 days (strain ARSEF 762) respectively. For *I. tenuipes* the lowest LT₅₀ values (5.1 to 5.6 days) were obtained with mineral oil formulations against *Spodoptera* spp. and *H. zea* respectively. Additionally, we tested both fungi against prepupae of all four lepidopteran species. Mortalities with *I. tenuipes* against *S. exigua* ranged from 90% (strain ARSEF 4096) to 100 % (strain ARSEF 2488) *Nomuraea rileyi* (ARSEF 135) *S. frugiperda* produced 95% mortality. The specific activity of different formulations was dependent of host species and oil used. These results indicate that a comprehensive evaluation of these entomopathogens in agriculture using oil application technologies is important, particularly, in organic and sustainable settings.

Keywords: Entomopathogens, *Nomuraea rileyi*, *Isaria tenuipes*, oil formulations, Lepidoptera, Noctuidae, *Spodoptera*, *Heliothis*, *Helicoverpa*, larvae, prepupae.

1. Introduction

Entomopathogenic fungi are frequent natural enemies of arthropods worldwide (Hajek and Leger, 1994; Shah and Pell, 2003). Research on these fungi has focused predominantly on aspects related to population regulation and control of arthropods (Roy et al. 2006). *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson and *Isaria tenuipes* Peck (Hypocreales: Clavicipitaceae) are anamorphic (asexual phase) fungi. *N. rileyi* infects larvae of Lepidoptera in the family Noctuidae, including the agricultural pests cabbage looper (*Trichoplusia ni* [Hübner]), velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis* [Hübner]), soybean looper (*Pseudoplusia includens* [Walker]), bollworm (*Helicoverpa armigera* [Hübner]), corn earworm or bollworm (*Helicoverpa zea* [Boddie]), tobacco budworm (*Heliothis virescens* F.), and many species of armyworms (*Spodoptera* spp.), including the African cotton leafworm, *S. littoralis* (Boisduval), beet armyworm (*S. exigua* [Hübner]), and fall armyworm (*S. frugiperda* [J. E. Smith]) (Ignoffo 1981, Ignoffo and Boucias 1992; Sanchez-Peña 2000; Botelho, et al. 2006; Martins, 2005). *Isaria tenuipes* (= *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson) is parasitic of pupae and larvae of various lepidopterans, usually in forested habitats, forming yellowish asexual fruit bodies (synnemata) (Kana-uchi and Fukatsu, 1999). Both fungi are essentially ecologically obligate pathogens of Lepidoptera, particularly *N. rileyi* (Samson, 1974; Ignoffo 1981; Humber 1992).

Some of the main issues in the successful use of fungi for pest control include application, infectivity, and persistence of their inoculum in the environment (Moore and Prior, 1993). Application of oils in agriculture, either as active ingredients *per se* or as carriers, has clear advantages over aqueous and other formulations in specific situations (e.g. when water is scarce and low volume applications are required). Suspending entomopathogenic fungal conidia in oil frequently improves their environmental persistence and virulence against insects, compared to using water suspensions (Prior et al., 1988; Bateman et al., 1993). The conidia of other entomopathogenic fungi, such as *Beauveria* and *Metarhizium* spp. suspend easily in oils, and, in field applications, oil prevents small droplets from evaporating before reaching the target (Prior et al., 1988; Bateman et al., 1993; Lomer et al., 1993; McClatchie et al., 1994). To our knowledge, there are very few or no reports (e. g. Vimala and Prasad, 1996; Prior, C., *et al.*, 1988) on the suitability of oils as carriers for *N. rileyi* and *I. tenuipes*. Besides their proven virulence against important pests (Ignoffo 1981; Tang and Cheng, 1999), the ecological specificity of these two fungi makes them promising biological control agents. In this study we compared the virulence of oil-suspended and water-suspended conidia of several isolates of *N. rileyi* and *I. tenuipes* against *S. frugiperda*, *S. exigua*, *H. zea*, and *H. virescens*.

2. Materials and Methods

The experiments were conducted at two different locations: 1) Saltillo, Coahuila, Mexico; utilized freshly-collected and isolated *N. rileyi* strains (NrDN1, NrL1 and NrSS2) and *I. tenuipes* strains collected in Tamaulipas, Mexico and accessed in the U.S.D.A., Agricultural Research Service (USDA-ARSEF) collection (ARSEF strain 2489), were tested against fall armyworm *S. frugiperda*. 2) Stoneville, Mississippi, U.S.A., where Brazilian and Mexican strains of *N. rileyi* and *I. tenuipes* from the USDA-ARSEF collection were tested against *S. frugiperda*, *S. exigua*, *H. zea* and *H. virescens*. ARSEF strains and their origins are listed in Table 1.

2.1. First set of bioassays at Saltillo: Strains of *N. rileyi* were obtained from dead larvae of *S. frugiperda* collected on corn (*Zea mays* L.) in Saltillo on 15 September 2006, isolated in PDA with egg yolk (Sánchez-Peña, 2000) and transferred to PDA plus 2% yeast extract (PDAY). The *I. tenuipes* strain ARSEF 2489 (Table 1) was used from USDA- ARSEF isolated culture. After two subcultures from larvae, *N. rileyi* on agar plus egg yolk produced abundant aerial mycelium but low amounts of conidia. Subsequently we used PDAY for culture of both fungi, where production of infective conidia was stable and sufficient. For inoculation we used third-instar larvae from a *S. frugiperda* colony obtained also from corn in Saltillo and maintained in the laboratory for six generations on wheat-germ based diet (Blanco et al. 2009).

Two preliminary tests were conducted to confirm the virulence of our local *N. rileyi* strains against *S. frugiperda* larvae. Insects were immersed in aqueous suspensions of *N. rileyi* conidia (strains NrDN1, NrL1 and NrSS2). First, we dipped second, third and fourth instar larvae (eighty of each) for five seconds in a fungal suspension of 2.5×10^7 conidia/ml in water plus 0.05% Tween 80 (Merck, Hohenbrunn, Germany). Control larvae were dipped in 0.05% Tween 80 solution in water with no conidia. Larvae were kept in covered 37 ml plastic containers (Solo Co., Urban, IL) with bermuda grass (*Cynodon* spp.) leaves as food and a ball of moist cotton, at 25°C. For the second test, 80 third-instar larvae were immersed in fungal suspensions of the three strains as above. In both tests mortality was evaluated two, four and seven days after inoculation.

2.11. Oil and water-suspended conidia of *N. rileyi* and *I. tenuipes* against 3rd instar of *S. frugiperda*: Conidia of *N. rileyi* (strain NrDN1) were taken from petri dishes and suspended by stirring in the following oils: 1) soybean oil (Soraya, Industrial Aceitera, Naucalpan, Mexico), 2) mineral oil (Mennen, Colgate-Palmolive, Mexico, D.F.) and 3) canola oil (Maravilla, Industrial Aceitera, Naucalpan, Mexico). *I. tenuipes* conidia (ARSEF 2489) were suspended in soybean oil only. Oil suspensions (2 µl of a 2.5×10^7 conidia/ml, equivalent to 5×10^4 conidia /larva) were applied to the abdominal dorsum of larvae utilizing a micropipette; 2 µl of soybean oil were applied to control larvae. Inoculated larvae were incubated as described; larval mortality was determined daily for nine days.

2.2. Second set of bioassays at Stoneville: *Nomuraea rileyi* (ARSEF 762 and 135), and *Isaria tenuipes* (ARSEF 4096, 2488 and 2489) (Table 1) were grown on PDAY at 25°C under diffuse fluorescent light. Conidia were harvested after 7-10 days and suspended in either canola, peanut (LouAna, Ventura foods, Brea, CA); sunflower, olive (Kroger, Cincinnati, OH), or mineral oil (Johnson and Johnson, Langhorne, PA) (all commercial-grade oils). We applied 2 µl of suspensions (2.5×10^7 conidia/ml, equivalent to 5×10^4 conidia /larva) on the abdominal dorsum of *S. frugiperda*, *S. exigua*, *H. zea*, and *H. virescens* larvae. The first three insect species were obtained from Benzon, Inc. (Benzon Research, Carlisle, PA), while *H. virescens* were obtained from the USDA-ARS colony at Stoneville, MS. After inoculation larvae were kept at 25°C in 37-ml plastic cups with artificial diet.

To compare the effect of larval instar on the activity of a mineral oil formulation of strain ARSEF 762 of *N. rileyi*, second, third and fourth instars of *S. frugiperda*, *S. exigua*, *H. zea* and *H. virescens* were inoculated with 2 µl of oil suspensions, as described above. Mortality was recorded daily for eight days.

3rd instar larvae of all four species to five oil formulations (mineral, canola, sunflower, olive and peanut), and to an oil control (mineral oil without spores) and an absolute control (unexposed larvae); we registered daily mortality for eight days. Due to a

shortage of larvae of *S. exigua*, we do not have data for strains ARSEF 135 (*N. rileyi*) and strain ARSEF 2488 (*I. tenuipes*) against this species.

2.2.1. Mortality of prepupae of four noctuid species exposed to ARSEF strains ARSEF strains 135 of *N. rileyi*, and 2488, 2489 and 4096 of *I. tenuipes*. Exposure of prepupae to fungi follows the bioassay description above. Mortality was registered during eight days.

2.3. Statistical analysis: Probit analysis was used to estimate Lethal Time 50 (LT50) using StatsDirect (2008) (StatsDirect Ltd, Cheshire, UK). Mortality was not adjusted since control mortality was $\leq 2\%$.

3. Results

3.1. First set of bioassays: All of the fungal isolates were infective. Strain NrDN1 induced the following mortalities: 100 % (L2), 70% (L3) y 40% (L4) eight days after inoculation. At the second bioassay against 3rd instar only, the highest mortalities were registered with the same strain (NrDN1): 16% (2 days after inoculation), 60% (after 5 days) and 98 % (after 8 days). In both bioassays, the controls had a mortality of $\leq 1\%$.

All of the oil suspensions of the fungal isolates tested were infective to 3rd instar *S. frugiperda*. Results (mortalities) ranged between 90 to 100 %. In the aqueous suspension treatment, was 85 % of mortality. The lowest LT_{50} values were obtained with *N. rileyi* in mineral oil: 4.73 (4.11-5.34 [95% confidence interval]) days and canola oil: 5.11 (4.88 - 5.33) days. The mineral oil suspension of *N. rileyi* and soybean oil of *I. tenuipes* induced 100 % mortality, but LT_{50} was higher for *I. tenuipes* than *N. rileyi*: 6.02 (95% CI: 5.47 - 6.58 for both) (Table 2). Control mortality (soybean oil) was less than 2.0 % in all cases.

3.2. Second set of bioassays: Seven days after inoculation, the fungal suspension killed 100% (2nd instar), 92% (3rd) and 92% (4th) of *S. frugiperda* larvae; for *S. exigua* 92 % (2nd instar), 80% (3rd) and 66 % (4th). In contrast, against *H. zea* and *H. virescens*, respective mortalities of 20 and 15 % (2nd instar), 10 and 12 % (3rd), and 4 and 6 % (4th) were recorded.

The Mortality of 3rd instar larvae treated with oil mixes of ARSEF762 strain against *S. frugiperda* and *S. exigua* induced over 50 % mortality, and the highest mortalities (100 %) were observed in the mineral oil treatments. The canola oil treatment induced 93 and 86 % respectively. The LT₅₀ (and 95% CI) with mineral oil against *S. frugiperda* was 2.90 (1.82- 3.96) and for *S. exigua* 3.24 (2.57- 3.90). Canola oil suspensions produced LT₅₀ values of 4.68 (4.11- 5.24) for *S. frugiperda*, and 4.74 (3.97- 5.52) for *S. exigua*. The highest mortality against *H. zea* was recorded with canola oil (78 %) (only canola and olive oils induced over 50 %) and for *H. virescens*, with mineral oil (70%) (Table 3).

Strain ARSEF 135 of *N. rileyi* in mineral oil produced the highest mortality in *S. exigua* (97 %, all oils against this species induced over 50 %), 96% in *S. frugiperda* (only mineral, canola and olive oil were over 50%), 55% in *H. virescens*. Mineral oil produced LT₅₀ values of 2.58 (1.31- 3.82) against *S. frugiperda*, mineral oil values were 4.32 (3.64- 5.00) and canola oil, 4.81 (4.09- 5.53) for *S. exigua*, (Table 3). Canola oil suspensions produced LT₅₀ values of 4.68 (4.11- 5.24) for *S. frugiperda*, and 4.74 (3.97- 5.52) for *S. exigua*. The highest mortality against *H. zea* was recorded with canola oil (78 %) (only canola and olive oils induced over 50 %) and for *H. virescens*, with mineral oil (70%) (Table 3).

For *I. tenuipes*, strain ARSEF 4096, the mortality percents with mineral oil against *S. exigua* (91 %), *S. frugiperda* (90 %), and *H. zea* (89 %). Canola and peanut oils against *S. frugiperda* induced over 50% mortality; against *H. zea*, only canola caused the same effect. mineral oil suspensions produced low LT₅₀: 5.47 (4.99- 5.96)for *S. exigua*, 5.63 (4.91- 6.38)*S. frugiperda*, , 5.64 (5.16- 6.15)*H. zea*; canola oil against *S. frugiperda* 6.27 (6.02- 6.55): with peanut oil, 7.15 (6.80- 7.57) (Table 3).

For treatments used *I. tenuipes* strain 2488 mortality percents with mineral oil, 96 % against *S. frugiperda*, and 71 % against *H. zea*. Lowest LT₅₀ values were with mineral oil 5.12 (4.77- 5.47), and canola oil, 6.16 (5.46- 6.90)for *S. frugiperda* , for mineral oil values were 6.29 (6.04- 6.58) and for olive oil 6.35 (5.75- 6.99)against *H. zea*, mineral oil 7.29 (6.95- 7.71) against *H. virescens*, (Table 3). Against *H. virescens*, mortality was negligible for the remaining treatments (Table 3).

3.2.3. Mortality of prepupae of four species of lepidopterans exposed to ARSEF strains 135 (*N. rileyi*) and 2488, 2489, and 4096 (*I. tenuipes*) in mineral oil. For this bioassay the highest mortality percentage was 100 % with *I. tenuipes* 4096 against *S. exigua*, followed by 95 % of *N. rileyi* 135 against *S. frugiperda* , and 90 and 100% respectively *I. tenuipes* 2488 and 4096 against *S. exigua*. No mortality was observed against *H. virescens*, and lowest percentages were observed of *H. zea* and 10% of *S. frugiperda* exposed to *I. tenuipes* 2489 (Fig. 1).

4. Discussion

These laboratory bioassays demonstrated that both fungi were pathogenic to all species of larvae challenged, and that the fungi were compatible with all oils assessed; however, there were markedly different levels of virulence among fungi and among formulations.

Mineral and canola oils induced the highest mortality values in most bioassays. As mentioned, a general trend was that the percent mortality was always greater for larvae of *Spodoptera* ssp. exposed to all oil suspensions. The larvae succumbed depending on its larval instar and/or suspending agents (Tween or oils), low mortality (2 to 5 %) was observed in treatments with oils alone (controls) showing that the oils tested were not toxic to the larvae. Results in this work indicated compatibility of the oils tested to both fungal pathogens. Other authors have reported compatibility of *N. rileyi* with oils; for example Vimala and Prasad (1996) tested sunflower, safflower, peanut, rapeseed mustard, sesame, coconut, and cottonseed oils. However, the concentrations used by Vimala and Prasad were 0.5 % concentration v/v, emulsified in a 0.02 % Tween solution; in contrast, the present work tested conidia in 100% oil.

The species tested showed different susceptibilities to *N. rileyi* and *I. tenuipes*. Usually *N. rileyi* strains were the most active against larvae. Maniania and Fargues (1985), reported that the most active strain of *Isaria fumoso-rosea* (= *Paecilomyces*

fumosoroseus) had a LT_{50} value of 2.6 days; although in their work they used lower concentrations and different application method.

In a previous report, Puttler et al. (1976) exposed nine noctuid species against a *N. rileyi* strain. Their results follow the same tendency found in the report herein: *Spodoptera exigua* is more susceptible to *N. rileyi* than both *H. virescens* and *H. zea*. On the other hand, we also found that *H. virescens* and *H. zea* varied in their response to *N. rileyi* formulated in five different oils; *H. zea* was more susceptible to *N. rileyi* in three oils, less susceptible in one, and equally susceptible in one. In the work by Puttler et al (1976), the following percentages of mortality are reported: for *S. exigua*, 81.8 ± 4.0 , *H. virescens*, 45.4 ± 3.4 and *H. zea*, 45.3 ± 6.8 . These values were used to assign relative susceptibilities to the insects (Ignoffo 1981). Thus *S. exigua* had a relative susceptibility value of 0.64, more susceptible to *N. rileyi* than *H. zea* and *H. virescens* (1.15). In the present work, when averaging the mortalities of the five oils tested concomitantly, *S. exigua* and *H. virescens* had susceptibility values of 0.64 and 1.64 respectively, following the trend indicated in Puttler et al (1976).

There are few clear patterns on the susceptibility of noctuid species to *N. rileyi* regarding host or geographical source. Ignoffo and Boucias (1982) tested strains of *N. rileyi* from different hosts against two noctuids: cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *T. ni* was in general much more susceptible than *A.*

gemmatalis, except to a strain from *S. exigua* that induced similar mortalities in both insect species. The results of Puttler et al. (1976) and the present report indicate a high relative susceptibility of *Spodoptera* species towards *N. rileyi*.

Our results also indicate that *Spodoptera* are susceptible to a variety of strain; *Heliothis* and *Helicoverpa* were less susceptible to these strains including a strain from *H. zea*. However, the mortality against *H. zea* and *H. virescens* caused by *I. tenuipes* in some cases was higher than that caused by *N. rileyi*; this is a remarkable result considering that this fungus is in general found infecting pupae, not larvae.

For prepupae, the results followed the same tendency as the bioassays with larvae. *Spodoptera* spp. presented the highest mortalities. In this experiment strain ARSEF135 (*N. rileyi*) caused higher mortalities than *I. tenuipes* strains against all species with the exception of *S. exigua*. Strain 2489 of *I. tenuipes* resulted in the lowest mortality levels against all species (Fig. 1). The mechanism inducing the differences in susceptibility among *Spodoptera* spp., *Heliothis* and *Helicoverpa* larvae merits further investigation. The cuticular barrier might be involved; there are obvious cuticular differences among these insects; i.e., the cuticle of *Heliothis* and *Helicoverpa* is covered with minute spinules (Godfrey 1897); the integument of *Spodoptera* spp. is much smoother. *I. tenuipes* and *N. rileyi* isolates are an interesting system to study the interaction between fungal entomopathogens and host insects. One or more *N. rileyi* strains can be present in

the same crop and infect different or common hosts, possibly producing hybrid strains (Boucias et al. 1984).

In summary, most oil formulations of entomopathogenic fungal spores caused high mortality levels against *Spodoptera* spp. Inoculation of *Helicoverpa zea* resulted in intermediate mortalities; *Heliothis virescens* appeared to be less susceptible to both fungal species. Lethal time (LT_{50}) values were as low as 2.2 days for *Spodoptera* spp. The mechanism rendering *Heliothis virescens* less susceptible merits further investigation. Our findings suggest that further, applied studies on the delivery of these lepidopteran pathogens in oils is suggested considering the high mortalities and low lethal times observed. Further research on these entomopathogens of Lepidoptera is desirable considering the introducing multiple biological mortality factors into IPM schemes for these agroecosystems. Also, the basic infection mechanisms involved when applying spore suspensions in oils to these larvae should be investigated in detail, to clarify the differences in virulence against lepidopteran species.

Acknowledgments

We thank Richard Humber (USDA-ARSEF, Ithaca NY) for providing fungal strains, to Ma. Cristina Sanchez F. for laboratory support at UAAAN, to Jorgen Eilenberg (University of Copenhagen, DK.) for providing literature, and Craig Abel (USDA-ARS) for logistic support during the tests at Stoneville, MS.

5. References

Bateman, R.P., Carey, M., Moore, D., Prior, C., 1993. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. *Ann. Appl. Biol.* 122, 145–152.

Blanco, C. A., Portilla, M., Abel, C. A., Winters, H., Ford R., Streett D., 2009. Soybean flour and wheat germ proportions in insect artificial diet and their effect on the growth rates of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Ins. Sci.*, in press.

Botelho, P. L., da Silva, N. S. P., Gomes, M. R., 2006. *Spodoptera frugiperda* J. Smith 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) biologia, amostragem e métodos de controle. 1ª impressão. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Brasília. 199, 0102 -0110.

Boucias, D. G., Bradford, D. L., Bardfield, C. S. Susceptibility of the velvetbean caterpillar and soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) to *Nomuraea rileyi*: effects of pathotype, dosage, temperature, and host age. *J. Econ. Entomol.* 77, 247-253.

Godfrey, G. L. 1987. Noctuidae (Noctuoidea). In: Stehr, F. W. (Ed.). *Immature Insects*. Kendall/Hunt Publishing Co., Dubuque, Iowa, pp. 549-578

Hajek, A. E., St. Leger, R. J., 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39, 293–322

Humber, R. A., 1992. Collection of entomopathogenic fungal cultures: Catalog of strains. Department of Agriculture United States Agricultural Research Service. 177pp

Ignoffo, C. M., 1981. The fungus *Nomuraea rileyi* a microbial insecticide. In: Burgess, H. D. (Ed.), Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press, New York & London, pp. 513-538

Ignoffo, C. M, Boucias, D. B. 1992. Relative activity of geographical isolates of *Nomuraea* bioassayed against the cabbage looper and velvetbean caterpillar. J. Invertebr. Pathol. 59, 215- 217.

Kana-uchi, A., Fukatsu, T., 1999. Light-induced fruit body formation of an entomogenous fungus *Paecilomyces tenuipes*. Mycoscience, 40, 349-351

Lomer, C.J., Bateman, R.P., Godonou, I., Kpindou, D., Shah, P.A., Paraiso, A., Prior, C., 1993. Field infection of *Zonocerus variegates* following application of an oil-based formulation of *Metarhizium flavoviride* conidia. Biocontrol Sci. Technol 3, 337–346

Maniania, N. K, Fargues, J., 1985. Susceptibility of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, to the fungal pathogens *Paecilomyces fumosoroseus* and *Nomuraea rileyi*. Fla. Entomol. 68 (1), 178-183

Martins T., Oliveira, L., Garcia, P., 2005. Larval mortality factors of *Spodoptera littoralis* in the Azores. BioControl. 50, 761- 770

McClatchie, G.V., Moore, D., Bateman, R.P., Prior, C., 1994. Effects of temperature on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulation. Mycol. Res. 98, 749–756

Moore, D., Prior, C., 1993. The potential of mycoinsecticides. *Biocontrol News Info.* 14, 31–40.

Prior, C., Jollands, P., le Patourel, G., 1988. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Invertebr. Pathol.* 52, 66–72.

Puttler, B., Ignoffo C. M., Hostetter, D. L. 1976. Relative susceptibility of nine caterpillar species to the fungus *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 27, 269- 270.

Roy, H. E., Steinkraus, D. C., Eilenberg, J., Hajek, A. E., Pell, J. K., 2006. Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic fungi and their arthropod host. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 331-357.

Samson, R. A., 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. *Studies in Mycology.* 6, 80- 83.

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

Shah, P. A., Pell, J. K., 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 413–23.

Tang, L. C., Cheng, D. J., 1999. Virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, to various larval stages of the corn earworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Entomol. Zool.* 34 (3), 399-403.

Vimala, D. P. S., Prasad Y. G., 1996. Antifeedants of plant origin with the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. J. Invertebr. Pathol. 68, 91–93

APPENDIX

Figure 1. Mortality at day seven post-inoculation in prepupae of four species of lepidopterans with *N. rileyi* (strain ARSEF135) and *I. tenuipes* (strains ARSEF2488, ARSEF 2489 and ARSEF 4096) in mineral oil formulations.

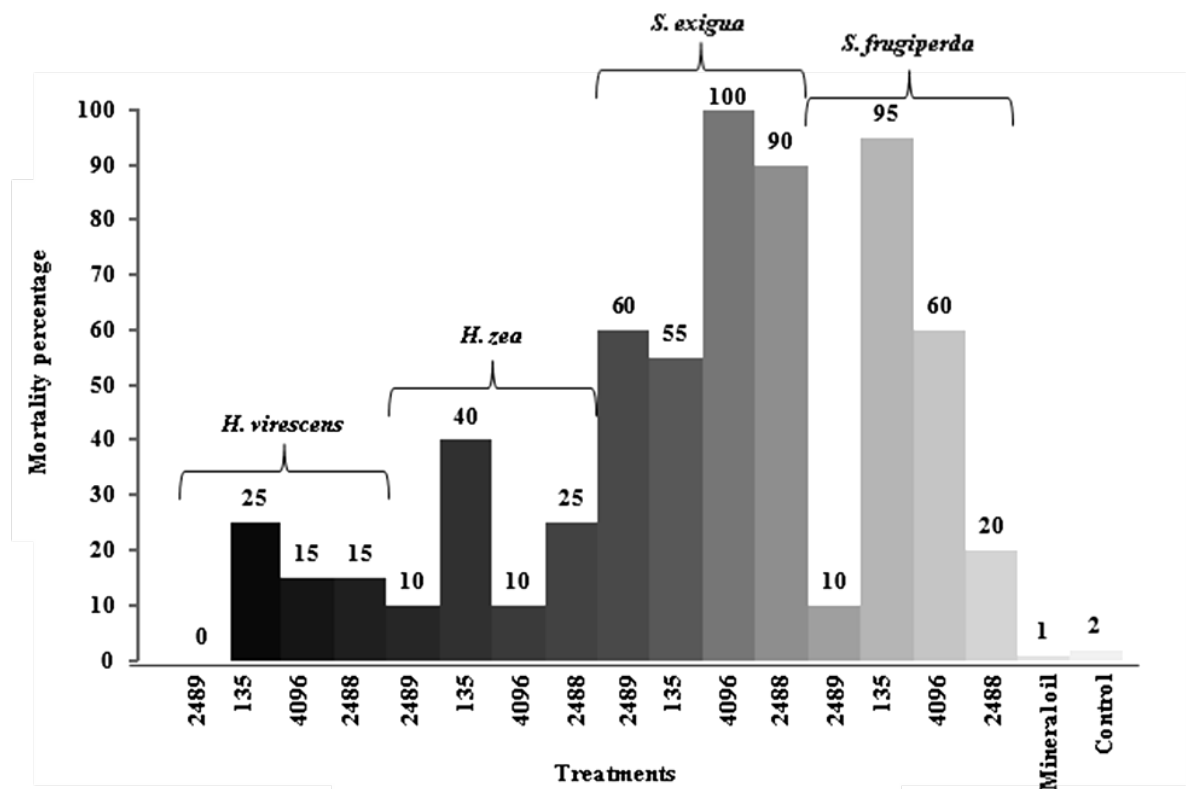


Table 1. *Nomuraea rileyi* and *Isaria tenuipes* strains from ARSEF collection used in bioassays.

Fungus	ARSEF Strain	Locality of origin and habitat	Host
<i>Nomuraea rileyi</i>	Not accesed	Saltillo, Coahuila, Mexico (corn)	<i>Spodoptera frugiperda</i>
<i>Nomuraea rileyi</i>	135	Stoneville, Mississippi, USA	Lepidoptera: Noctuidae
<i>Nomuraea rileyi</i>	762	Columbia, Missouri, USA (alfalfa)	<i>Plathypena scabra</i>
<i>Isaria tenuipes</i>	2488 and 2489	Gomez Farias, Tamaulipas, Mexico (rainforest)	Unidentified host, passed through <i>Spodoptera frugiperda</i>
<i>Isaria tenuipes</i>	4096	Brazil (no locality)	Lepidoptera: Noctuidae

Table 2. Mortality percentage, probit model parameters and 95% confidence intervals (C.I.) after inoculation of *S. frugiperda* larvae with oils and aqueous formulations of fungal conidia. Control mortality was less than 2% through experiment. First set of bioassays.

Pathogen	Formulation	Mortality (%)	LT50	C. I. (95%)
<i>N. rileyi</i>	Canola	98.8	5.11	4.88 - 5.33
<i>N. rileyi</i>	Soybean	90.00	6.02	5.47 - 6.58
<i>N. rileyi</i>	Mineral	100.0	4.73	4.11 - 5.34
<i>N. rileyi</i>	Tween	85.00	7.02	6.64 - 7.42
<i>I. tenuipes</i> (2489)	Soybean	100.0	6.02	5.47 - 6.58

Table 3. Mortality percentage and 95% confidence intervals (C.I.) eight days after inoculation of noctuid larvae, when treated with several oil formulations. Control mortality was less than 5 % through experiment. Second set of bioassays.

Fungal Strain (ARSEF)	Larval species	Mineral oil		Canola oil		Olive oil		Peanut oil		Sunflower oil	
		Mortality (%)	LT50 and CI	Mortality (%)	LT50 and CI	Mortality (%)	LT50 and CI	Mortality (%)	LT50 and CI	Mortality (%)	LT50 and CI
<i>N. rileyi</i> 762	<i>S. frugiperda</i>	100	2.90 1.82 - 3.96	93	4.68 4.11 - 5.24	74	5.85 4.97 - 6.76	71	5.43 4.41 - 6.48	67	5.96 5.17 - 6.78
	<i>H. virescens</i>	70	6.80 6.36 - 7.26	24	8.77 8.38 - 9.58	32	8.44 8.18 - 8.92	11	9.08 8.54 - 11.55	10	9.18 8.58 - 12.19
	<i>S. exigua</i>	100	3.24 2.57 - 3.90	86	4.74 3.97 - 5.52	79	5.73 5.14 - 6.33	64	6.34 5.50 - 7.22	53	7.34 6.96 - 7.82
	<i>H. zea</i>	48	7.57 6.96 - 8.25	78	11.49 10.05 - 14.47	55	7.32 6.62 - 8.09	44	7.87 7.49 - 8.37	10	11.63 10.06 - 15.51
<i>N. rileyi</i> 135	<i>S. frugiperda</i>	96	2.58 1.31 - 3.82	60	6.02 4.98 - 7.11	45	7.40 5.96 - 8.98	31	8.93 7.03 - 11.16	25	10.26 7.04 - 14.21
	<i>H. virescens</i>	55	7.26 6.38 - 8.25	15	11.52 10.09 - 14.26	10	11.88 10.17 - 16.48	6	14.25 11.48 - 22.45	6	12.09 10.16 - 18.83
	<i>S. exigua</i>	97	4.32 3.64 - 5.00	84	4.81 4.09 - 5.53	72	6.00 5.52 - 6.51	78	5.80 5.10 - 6.52	63	6.77 6.18 - 7.42
<i>I. tenuipes</i> 4096	<i>S. frugiperda</i>	90	5.63 4.91 - 6.38	70	6.27 6.02 - 6.55	43	8.10 7.70 - 8.63	55	7.15 6.80 - 7.57	22	10.65 9.46 - 12.66
	<i>H. virescens</i>	42	8.31 7.80 - 9.02	11	16.71 12.82 - 27.98	7	17.79 13.31 - 32.86	6	12.37 10.39 - 18.35	6	20.98 14.55 - 54.10
	<i>S. exigua</i>	91	5.47 4.99 - 5.96	35	8.43 6.09 - 11.07	46	7.93 7.53 - 8.44	24	9.68 8.90 - 10.93	12	11.84 10.27 - 15.06
	<i>H. zea</i>	89	5.64 5.16 - 6.15	51	8.43 6.09 - 11.07	11	11.51 10.03 - 14.82	24	9.87 9.02 - 11.25	35	8.84 7.35 - 10.60
<i>I. tenuipes</i> 2488	<i>S. frugiperda</i>	96	5.12 4.77 - 5.47	65	6.16 5.46 - 6.90	22	9.84 7.72 - 12.46	34	8.92 8.27 - 9.86	31	9.63 8.78 - 10.93
	<i>H. virescens</i>	61	7.29 6.95 - 7.71	5	16.54 12.64 - 29.81	1	-----	5	21.60 14.51 - 75.32	5	10.87 9.37 - 20.40
	<i>H. zea</i>	71	6.29 6.04 - 6.58	48	7.41 6.41 - 8.54	38	6.35 5.75 - 6.99	38	8.62 8.04 - 9.43	19	10.73 9.58 - 12.70

