



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y FORESTALES

Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas

Caracterización biológica y genética de *Metarhizium rileyi* (Farlow) aislado de poblaciones mexicanas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith): evaluación de un aislamiento en un ensayo de campo a pequeña escala

TESIS

Para Obtener el Grado de **Doctor en Ciencias Biológicas**

Opción: Ciencias Agropecuarias, Forestales y Ambientales

PRESENTA

M.C. Yordanys Ramos González

Directora:

Dra. Ana Mabel Martínez Castillo

Codirector:

Dr. Samuel Pineda Guillermo

Sinodales:

Dra. Patricia Támez Guerra. FB-UANL

Dr. José Isaac Figueroa de La Rosa. IIAF-UMSNH

Dra. Selene Ramos Ortiz. IIAF-UMSNH

Morelia, Michoacán, agosto de 2025.

Este trabajo se realizó en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) bajo la dirección de la Dra. Ana Mabel Martínez Castillo y la codirección del Dr. Samuel Pineda Guillermo. Así mismo, este trabajo se realizó con la asesoría del comité tutorial conformado por la Dra. Patricia Tamez Guerra, el Dr. José Isaac Figueroa-De la Rosa y la Dra. Selene Ramos Ortiz. Se llevó a cabo una estancia de investigación en la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) bajo la dirección del Dr. Alonso Alberto Orozco Flores. Todo el trabajo de la tesis se financió por medio de la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, el Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación del Estado de Michoacán (proyectos FCCHTI23_ME-4.1.-0064 y FCCHTI23_ME-4.1.-0065) y la beca No. 799164 otorgada por la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI). Además, se contó con el apoyo de los integrantes del laboratorio de Entomología Agrícola del IIAF. A todas estas dependencias y personas, se les agradece sinceramente por su contribución al logro y conclusión exitosa de esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
I. RESUMEN GENERAL	vi
II. ABSTRACT	ix
III. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
III. 1 Planteamiento del problema	1
III. 2 Biología e importancia de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith)	2
III. 3 Daños causados por <i>Spodoptera frugiperda</i> en maíz	6
III. 4 Principales métodos de control de <i>Spodoptera frugiperda</i>	6
- Control químico	6
- Control biológico	7
III. 5 Ciclo infectivo de los hongos entomopatógenos	8
III. 6 Empleo de hongos entomopatógenos en el control de <i>Spodoptera frugiperda</i>	9
III. 7 Biología y ecología de <i>Metarhizium rileyi</i> (Farlow) Kepler S.A. Rehner y Humber	10
IV. HIPÓTESIS.....	13
V. OBJETIVOS.....	14
V.I. Objetivo General	14
V.II. Objetivos específicos	14
VI. PREVALENCIA NATURAL, CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE <i>Metarhizium rileyi</i> (FARLOW) AISLADO DE LARVAS DE <i>Spodoptera</i> <i>frugiperda</i> (J. E. SMITH) EN MÉXICO.....	15
RESUMEN.....	15
INTRODUCCIÓN.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS	17
- Cría de insectos.....	17
- Aislamientos fúngicos	18

- Bioensayos con una única concentración.....	20
- Caracterización genética	20
- Respuesta de concentración de conidios–mortalidad y velocidad de muerte	22
- Análisis estadísticos	23
RESULTADOS	23
- Recolección de hongos en campo	23
- Bioensayos con una única concentración.....	25
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES	34
VII. CONTROL BIOLÓGICO DE LARVAS DE GUSANO COGOLLERO MEDIANTE AISLAMIENTOS DE <i>Metarhizium rileyi</i> BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO Y PEQUEÑA ESCALA DE CAMPO EN MAÍZ.....	37
RESUMEN.....	37
INTRODUCCIÓN.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS	40
- Cría de insectos	40
- Aislamientos fúngicos	40
- Experimento en condiciones de invernadero	41
- Experimento en condiciones de campo a pequeña escala	42
- Análisis estadísticos	44
RESULTADOS	44
- Experimento de invernadero	45
- Experimento de campo a pequeña escala	46
DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIONES	52
VII. DISCUSIÓN GENERAL	54
VIII. PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES	58
IX.LITERATURA CITADA.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Localidades y fecha de recolección de <i>Metarhizium rileyi</i> aislado de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	18
Tabla 2. Mortalidad y esporulación causadas por una concentración de 1×10^8 conidios/mL de 24 aislamientos de <i>Metarhizium rileyi</i> en larvas de segundo estadio de <i>Spodoptera frugiperda</i>	25
Tabla 3. Concentraciones letales medias y tiempos letales medios de <i>Metarhizium rileyi</i> en larvas de segundo instar de <i>Spodoptera frugiperda</i> inoculadas con cinco aislamientos diferentes.	28
Tabla 4 Suplementaria. Germinación de conidios de 89 aislamientos de <i>Metarhizium rileyi</i> colectados de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> en campos de maíz del norte del estado de Michoacán.	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Spodoptera frugiperda</i> .	3
Figura 2. Caracteres morfológicos típicos de <i>Spodoptera frugiperda</i> .	4
Figura 3. Adultos de <i>Spodoptera frugiperda</i> .	5
Figura 4. Ciclo infectivo de un hongo entomopatógeno en una larva de lepidóptero.	9
Figura 5. Morfología de <i>Metarhizium rileyi</i> .	11
Figura 6. Características morfológicas de cinco aislamientos mexicanos de <i>Metarhizium rileyi</i> sobre <i>Spodoptera frugiperda</i> .	24
Figura 7. Árbol filogenético inferido con el método de vecino más cercano de 13 secuencias de β - <i>tubulina</i> de aislamientos de hongos entomopatógenos.	27
Figura 8. Curvas de supervivencia de Gehan–Breslow y Kaplan–Meier de larvas de segundo instar de <i>Spodoptera frugiperda</i> después de la inoculación con una concentración de 1.0×10^8 conidios/mL de cinco aislamientos de <i>Metarhizium rileyi</i> bajo condiciones de laboratorio.	29
Figura 9. Curvas de supervivencia de Gehan Breslow y Kaplan–Meier de larvas de segundo estadio de <i>Spodoptera frugiperda</i> tras la aplicación de una concentración de 1×10^8 conidios/mL de dos aislamientos de <i>Metarhizium rileyi</i> bajo condiciones de invernadero.	45
Figura 10. Probabilidad de mortalidad ($\pm$ error estándar) inducida por <i>Metarhizium rileyi</i> T9-21, spinetoram y el tratamiento control sobre larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> en plantas de maíz bajo condiciones de campo.	46
Figura 11. Efecto de la aplicación de <i>Metarhizium rileyi</i> T9-21 y spinetoram sobre la abundancia de insectos fitófagos y enemigos naturales en plantas de maíz bajo condiciones de campo.	47
Figura 12. Efecto del tiempo de recolección sobre la abundancia de insectos fitófagos y enemigos naturales en plantas de maíz tras la aplicación de <i>Metarhizium rileyi</i> T9-21 y spinetoram bajo condiciones de campo.	48

I. RESUMEN GENERAL

El gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), es la principal plaga que afecta el cultivo de maíz en todo el mundo. El método de control más utilizado para disminuir los niveles poblacionales de este insecto es la aplicación de insecticidas químicos; sin embargo, estos compuestos generan contaminación ambiental y pueden favorecer el desarrollo de resistencia. El hongo entomopatógeno *Metarhizium rileyi* (Farlow) es altamente infectivo y prevalece de forma natural sobre las poblaciones de *S. frugiperda*. Debido a ello, este hongo se considera una alternativa ecológica para ser utilizado como un bioinsecticida para el control de este insecto. El objetivo general de este estudio fue caracterizar biológica y genéticamente aislamientos mexicanos de *M. rileyi* obtenidos a partir de larvas de *S. frugiperda* recolectadas en cultivos de maíz en cinco localidades de distintos municipios del estado de Michoacán, México. Para esto, se evaluó la eficacia de los distintos aislamientos en larvas de *S. frugiperda* en condiciones de laboratorio (primera etapa). Posteriormente, se seleccionaron los aislamientos más promisorios para determinar sus características genéticas y evaluar su eficacia en condiciones de invernadero y campo (segunda y tercera etapa, respectivamente). En la primera etapa de este estudio se recolectaron en campo 295 larvas de *S. frugiperda*, de las cuales se identificaron morfológicamente, 89 aislamientos de *M. rileyi*. Veinticuatro de estos aislamientos se seleccionaron por poseer la mayor tasa de germinación (96-98.5%). Su actividad biológica se determinó a través de bioensayos con larvas de segundo instar de *S. frugiperda*, las cuales se expusieron a una concentración de 1.0×10^8 conidios/mL. La mortalidad causada por estos aislamientos estuvo comprendida entre 70% y 98.7% y la esporulación fue entre 60.5% y 98.7%. Posteriormente, y con base en estos resultados, se determinaron las relaciones filogenéticas de cinco aislamientos (T9-21, Z30-21, PP48-21, J10-22 y L8-22) mediante el análisis del gen β -tubulina, así como la concentración letal media (CL_{50}), tiempo letal medio (TL_{50}) y supervivencia larval. Los aislamientos de *M. rileyi* T9-21, PP48-21 y J10-22 se agruparon dentro del mismo clado, mientras que los aislamientos Z30-21 y L8-22 se ubicaron en clados separados. Además, se observó que los aislamientos que pertenecían al mismo clado provenían de la misma región geográfica o de sitios de recolección cercanos. Por otro lado, los valores de la CL_{50} de los cinco aislamientos de *M. rileyi* sobre larvas de *S. frugiperda* estuvieron comprendidos entre 2.04×10^5 y 1.05×10^6 conidios/mL. Los valores del TL_{50} para los aislamientos T9-21, J10-22 y L8-22 fueron de

7.40, 7.04 y 7.49 d, respectivamente, mientras que para los aislamientos PP48-21 y Z30-21 fueron de 9.46 y 9.65 d, respectivamente. En la segunda etapa de este estudio se evaluó la patogenicidad de los aislamientos T9-21 y L8-22 sobre larvas del segundo estadio larval de *S. frugiperda* bajo condiciones de invernadero. Estos aislamientos se seleccionaron debido a la alta mortalidad causada y esporulación, así como por sus diferencias filogenéticas. Una suspensión de 1×10^8 conidios/mL se aplicó por aspersión a plantas de maíz (etapa de desarrollo V6), previamente infestadas con seis larvas de segundo instar. No se observaron diferencias significativas en la supervivencia de las larvas entre los dos aislamientos (13.33 % y 23.33 % para T9-21 y L8-22, respectivamente). Sin embargo, el aislamiento T9-21 presentó significativamente más cadáveres esporulados comparado con lo registrado en el aislamiento L8-22 (97% vs. 69%). Con base en estos resultados, se seleccionó al aislamiento T9-21 de *M. rileyi* y se evaluó en condiciones de campo a pequeña escala en un cultivo de maíz (tercera etapa), en donde se incluyeron los siguientes tratamientos: i) aislamiento T9-21 (1×10^{13} conidios/mL), ii) spinetoram, como tratamiento de referencia (75 mL ha⁻¹) y iii) agua como tratamiento testigo. El aislamiento T9-21 causó una probabilidad de mortalidad de 0.49 a los 9 d posteriores al tratamiento. Spinetoram causó una probabilidad de mortalidad de 0.72; sin embargo, no hubo diferencias significativas respecto al aislamiento T9-21. El tratamiento testigo mostró una probabilidad de mortalidad de 0.07, atribuida por la contaminación con *M. rileyi*. Por otro lado, el depredador *Doru taeniatum* y los insectos fitófagos *Diabrotica virgifera* Zae, *Diabrotica balteata*, *Euschistus heros* y áfidos fueron los más frecuentes. La presencia de enemigos naturales e insectos fitófagos fue significativamente menor en los tratamientos con spinetoram y el aislamiento T9-21 en comparación con el testigo en todos los tiempos de muestreo. A los 2 y 4 d post-aplicación, no se observaron diferencias significativas entre el aislamiento T9-21 (0.50 ± 0.1 y 0.22 ± 0.03 , respectivamente) y el testigo (0.58 ± 0.09 y 0.50 ± 0.05 , respectivamente). La mayor densidad de insectos fitófagos se observó en el testigo (0.45 ± 0.05), seguida del aislamiento T9-21 (0.30 ± 0.0) y spinetoram (0.04 ± 0.02). Durante el estudio, la temperatura y la humedad relativa oscilaron entre 19 y 21 °C y entre 70 y 84.4%, respectivamente. Se concluye que existe una alta prevalencia de *M. rileyi* en cultivos de maíz en los sitios donde se realizaron las colectas de las larvas. La mayoría de los aislamientos obtenidos poseen una elevada patogenicidad sobre de las larvas de *S. frugiperda*. Sin embargo, la efectividad del aislamiento T9-21 destacó por su capacidad infectiva y velocidad de acción, lo que lo convierte en una alternativa viable para ser considerado en la inclusión de programas de manejo integrado de plagas dirigido a *S.*

frugiperda. Se requieren más estudios para evaluar el impacto de *M. rileyi* sobre la mortalidad de este insecto bajo diferentes condiciones climáticas, así como para determinar los posibles efectos subletales que pudiera causar.

Palabras clave: Control biológico, hongos entomopatógenos, manejo integrado de plagas, Lepidoptera: Noctuidae, enemigos naturales.

II. ABSTRACT

The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), is the main pest affecting maize crops worldwide. The most commonly used control method to reduce the population levels of this insect is the application of chemical insecticides; however, these compounds cause environmental pollution and may promote the development of resistance. The entomopathogenic fungus *Metarhizium rileyi* (Farlow) is highly infective and naturally prevalent in populations of *S. frugiperda*. Therefore, this fungus is considered an ecological alternative for use as a bioinsecticide for controlling this insect. The general objective of this study was biologically and genetically to characterize Mexican isolates of *M. rileyi* obtained from *S. frugiperda* larvae collected in maize fields from five localities in different municipalities of the state of Michoacán, Mexico. For this purpose, the efficacy of the different isolates on *S. frugiperda* larvae under laboratory conditions was evaluated (First Part). Afterwards, the most promising isolates were selected to determine their genetic characteristics and evaluate their efficacy under greenhouse and field conditions (Second and Third Parts, respectively). In the first part of this study, 295 *S. frugiperda* larvae were collected in the field, from which 89 isolates of *M. rileyi* were morphologically identified. Twenty four of these isolates were selected based on their high germination rate (96–98.5%). Their biological activity was determined through bioassays with second-instar *S. frugiperda* larvae, which were exposed to a concentration of 1×10^8 conidia/mL. The mortality caused by these isolates ranged between 70% and 98.7%, and sporulation ranged between 60.5% and 98.7%. Subsequently, based on these results, the phylogenetic relationships of five isolates (T9-21, Z30-21, PP48-21, J10-22, and L8-22) were determined through β -tubulin gene analysis, as well as the median lethal concentration (LC_{50}), median lethal time (LT_{50}), and larval survival. The *M. rileyi* isolates T9-21, PP48-21, and J10-22 were grouped within the same clade, while isolates Z30-21 and L8-22 were located in separate clades. Moreover, it was observed that isolates belonging to the same clade originated from the same geographical region or nearby collection sites. On the other hand, LC_{50} values for the five *M. rileyi* isolates on *S. frugiperda* larvae ranged from 2.04×10^5 to 1.05×10^6 conidia/mL. LT_{50} values for isolates T9-21, J10-22, and L8-22 were 7.40, 7.04, and 7.49 d, respectively, while for isolates PP48-21 and Z30-21 were 9.46 and 9.65 d, respectively. In the second part of this study, the pathogenicity of isolates T9-21 and L8-22 was evaluated on second-instar *S. frugiperda* larvae under greenhouse conditions. These isolates were selected based on their high mortality and sporulation, as well as their phylogenetic differences. A suspension of 1×10^8

conidia/mL was applied by spraying onto maize plants (V6 developmental stage) previously infested with six second-instar larvae. No significant differences were observed in larval survival between the two isolates (13.33% and 23.33% for T9-21 and L8-22, respectively). However, isolate T9-21 showed significantly more sporulated cadavers compared to isolate L8-22 (97% vs. 69%). Based on these results, isolate T9-21 of *M. rileyi* was selected and evaluated under small-scale field conditions in a maize crop (Third Part), where the following treatments were included: i) isolate T9-21 (1×10^{13} conidia/mL), ii) spinetoram as the reference treatment (75 mL/ha), and iii) water as the control treatment. Isolate T9-21 caused a mortality probability of 0.49 at 9 d post-treatment. Spinetoram caused a mortality probability of 0.72; however, there were no significant differences compared to isolate T9-21. The control treatment showed a mortality probability of 0.07, attributed to contamination with *M. rileyi*. In addition, the predator *Doru taeniatum* and the phytophagous insects *Diabrotica virgifera zea*, *Diabrotica balteata*, *Euschistus heros*, and aphids were the most frequently observed. The presence of natural enemies and phytophagous insects was significantly lower in the spinetoram, and T9-21 treatments compared to the control at all sampling times. At 2 and 4 d post-application, no significant differences were observed between isolate T9-21 (0.50 ± 0.1 and 0.22 ± 0.03 , respectively) and the control (0.58 ± 0.09 and 0.50 ± 0.05 , respectively). The highest density of phytophagous insects was observed in the control (0.45 ± 0.05), followed by isolate T9-21 (0.30 ± 0.0) and spinetoram (0.04 ± 0.02). During the study, temperature and relative humidity ranged between 19 and 21 °C and 70% and 84.4%, respectively. In conclusion, there is a high prevalence of *M. rileyi* in maize crops at the sites where larval collections were carried out. Most of the isolates obtained showed high pathogenicity against *S. frugiperda* larvae. However, the effectiveness of isolate T9-21 stood out due to its infective capacity and speed of action, making it a viable alternative for inclusion in integrated pest management programs targeting *S. frugiperda*. Further studies are needed to evaluate the impact of *M. rileyi* on the mortality of this insect under different climatic conditions, as well as to determine the possible sublethal effects it may cause.

Keywords: Biological control, entomopathogenic fungi, integrated pest management, Lepidoptera, Noctuidae, natural enemies.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

III. 1 Planteamiento del problema

El maíz, *Zea mays* L., representa uno de los cereales más consumidos por la población mundial (Mattoo *et al.*, 2023). Este constituye el tercer cultivo agrícola en orden de importancia después del trigo, *Triticum aestivum* L. y el arroz, *Oryza sativa* L (Mattoo *et al.*, 2023). En México, este cultivo es la base de la alimentación de su población con un consumo medio per cápita de 319 g diarios (Odjo *et al.*, 2022) y se produce en el 35% de la superficie cultivable del país (SIAP, 2020). Para el ciclo agrícola 2022, la superficie sembrada de maíz blanco en México fue de 7,143,102 h⁻¹, con una producción de 27.2 millones de ton⁻¹, mientras que de maíz amarillo se sembró 553 000 ha⁻¹ para un rendimiento de 3 millones de ton⁻¹ (INEGI, 2022).

La principal plaga que afecta al cultivo de maíz es el gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Este insecto puede afectar a las plantas en cualquiera de sus estados fenológicos, aunque prefiere alimentarse del cogollo de esta. La incidencia de este insecto puede causar pérdidas al cultivo que oscilan entre el 45 al 100% (Gutiérrez-Moreno *et al.*, 2019). En estudios recientes realizados en 12 países productores de maíz se reportó que, si no se realiza ningún método de control, *S. frugiperda* puede reducir el rendimiento de este cultivo entre 4.1 y 17.7 millones de ton⁻¹ al año (Rwomushana *et al.*, 2018). Para el control de esta plaga, se utilizan principalmente insecticidas químicos organofosforados (e. g., monocrotofos y diclorvos) que muchas veces resultan ineficientes (Tambo *et al.*, 2020; Jepson *et al.*, 2020). Sin embargo, el uso excesivo de estos compuestos causa daños al ambiente, a la salud humana y animal y reduce las poblaciones de los enemigos naturales (Jepson *et al.*, 2020; Afza *et al.*, 2023).

Los hongos entomopatógenos constituyen una alternativa ecológica y viable para reducir las poblaciones de plagas agrícolas debido a que pueden infectar cualquiera de los estados de vida de sus hospedantes. Estos patógenos actúan principalmente por contacto y se han reconocido entre 750-1,000 especies de hongos patógenos de insectos (Gupta y Jinda, 2014). Estos microorganismos se encuentran en diversos hábitats, principalmente en la rizosfera colonizando raíces de plantas (Ahmad *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2022) y también se han encontrado colonizando el tejido endofítico de muchas plantas de interés económico, incluido el maíz (Vega, 2008; Ramos *et al.*, 2020).

La presencia de hongos entomopatógenos en distintos suelos de importancia agrícola en México ha sido ampliamente documentada (Barrón-Valle *et al.*, 2014; González-Villaseñor *et al.*, 2015; González-Cava *et al.*, 2019). González-Villaseñor *et al.* (2015) y Huerta-Ramírez *et al.* (2018) identificaron aislamientos en distintas recolectas de suelo realizadas en el estado de Michoacán. Sin embargo, existen muy pocos estudios sobre el aislamiento de estos organismos nativos en las distintas etapas de vida de *S. frugiperda* (Lezama-Gutiérrez *et al.* 2001; Molina *et al.* 2003; García *et al.* 2011). En la mayoría de estos estudios, los géneros más abundantes fueron *Beauveria* y *Metarhizium*.

Metarhizium rileyi (Farlow) Kepler S.A. Rehner y Humber (= *Nomurea rileyi*) es un hongo altamente virulento y ha sido aislado de aproximadamente 60 especies de lepidópteros de los cuales más de la mitad pertenecen a la familia Noctuidae (Fronza *et al.*, 2017). Además, se ha reportado su prevalencia y eficacia para el control natural lepidópteros en diferentes agroecosistemas, especialmente sobre poblaciones de *S. frugiperda* en maíz (Barros *et al.*, 2020; Acharya *et al.*, 2022; Yang-li *et al.*, 2022). Debido a la importancia que representa *S. frugiperda* en el cultivo de maíz, así como a su expansión a nivel mundial, actualmente se requiere un mayor conocimiento sobre las especies nativas de hongos entomopatógenos asociadas a este insecto y de la interacción insecto-planta-patógeno. Lo anterior, con la finalidad de diseñar un programa de manejo integrado para el control de esta plaga.

III. 2 Biología e importancia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)

El principal insecto plaga que afecta el cultivo de maíz es el gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (Pandi *et al.*, 2024). Es originario del continente americano y algunos registros sugieren que los brotes más extendidos y severos de este insecto posiblemente se originaron en México (Sarkowi y Mokhtar, 2021). En África, *S. frugiperda* se detectó por primera vez en 2016 en Nigeria (Goergen *et al.*, 2016) y se propagó rápidamente. Actualmente, su presencia está confirmada en más de 40 países y su expansión continúa hacia las regiones del norte del continente (Kinkar *et al.*, 2020). En 2018, este insecto se detectó en Asia, específicamente en India (Ganiger *et al.*, 2018; Kalleshwaraswamy *et al.*, 2018). Actualmente, *S. frugiperda* se está propagando rápidamente por el sudeste asiático, y su presencia se ha observado en más de 12 países. Como resultado, casi todos los países productores de maíz en Asia están en riesgo de infestaciones por *S. frugiperda* (Lamsal *et al.*, 2020). En Australia, se reportó este insecto por primera vez en enero de 2020, con una

distribución limitada a ciertas áreas (Qi *et al.*, 2021). Cabe señalar que, aunque *S. frugiperda* no está presente actualmente en Europa (Kinkar *et al.*, 2020), tiene el potencial de propagarse globalmente a nuevas áreas geográficamente similares (Edosa y Dinka, 2021).

Comprender la biología y ecología de los insectos plaga, especialmente de *S. frugiperda*, juega un papel crucial en el estudio de su distribución y dinámica poblacional. Recientemente, algunos investigadores reportaron el impacto de la precipitación y las prácticas agronómicas sobre la abundancia y distribución de *S. frugiperda* en África Oriental, sugiriendo que entender la ecología de este insecto plaga es esencial para planificar opciones adecuadas de manejo integrado (Edosa y Dinka, 2021).

Spodoptera frugiperda tiene una metamorfosis holometábola, lo que indica que su desarrollo se divide en cuatro etapas de vida: huevo, larva, pupa y adulto (Hardke *et al.*, 2015) (Figura 1). Las hembras típicamente ovipositan en el lado inferior de las hojas, en grupos o masas que van de 100 a 300 y hasta 1000 huevos. La mayor parte de la oviposición ocurre dentro de un lapso de 3.5 a 5 d, aunque se ha reportado que algunas hembras ponen huevos durante un máximo de 17 d. Después de la oviposición, la hembra cubre los huevos con una capa de escamas o pelos de su abdomen, que funciona como protección (Edosa y Dinka, 2021; Sarkowi y Mokhtar, 2021).

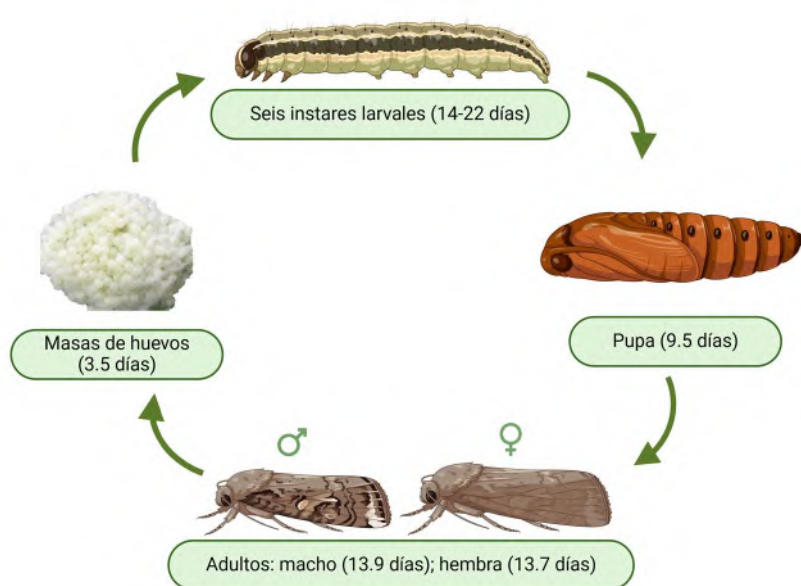


Figura 1. Ciclo de vida de *Spodoptera frugiperda*. Fuente autor.

Las larvas pasan por seis instares que se desarrollan entre 14 y 30 d, dependiendo de la temperatura. La apariencia física y el patrón de las larvas son ligeramente diferentes en cada instar. Generalmente, las larvas son de color verde claro a marrón oscuro con rayas longitudinales. La cabeza es negra y, a medida que crecen hasta el segundo instar, se vuelve ligeramente naranja (Kenis *et al.*, 2022). Cuando está próximo a llegar al tercer instar larval, la superficie dorsal se torna marrón y comienzan a aparecer líneas blancas en la superficie lateral. La cabeza adquiere un color marrón rojizo desde el cuarto hasta el sexto instar. El cuerpo está moteado con manchas y rayas blancas en la superficie subdorsal y lateral. Presenta pináculos negros aparentes con setas en la zona dorsal y cuatro manchas negras en el octavo segmento abdominal, dispuestas en forma de un cuadrado. Las larvas del sexto instar miden entre 3.8 y 5.1 cm de longitud y se distinguen por una forma de "Y" invertida de color amarillo en la frente (Figura 2) (Sarkowi y Mokhtar, 2021; Kenis *et al.*, 2022).

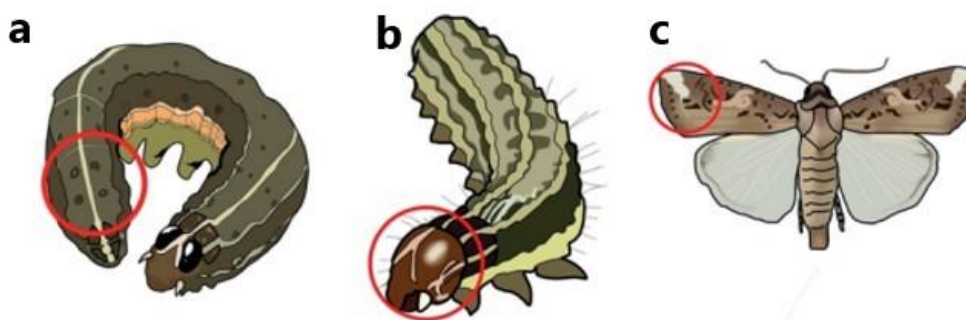


Figura 2. Caracteres morfológicos típicos de *Spodoptera frugiperda*; a: cuatro pináculos dispuestos en forma de cuadrado en el octavo segmento abdominal; b: sutura ecdisial en forma de “Y” invertida en su cabeza; c: manchas blancas en la punta de las alas anteriores de las polillas machos (adaptado de Kenis *et al.* 2022).

El estado de pupa tiene lugar en el suelo, a una profundidad de 2 a 8 cm por debajo de la superficie, aunque en altas densidades de población también puede ocurrir en distintas partes de las plantas. Aunque la pupación normalmente ocurre en el suelo, también puede tener lugar en cualquier sitio donde la larva pueda protegerse, como en material de embalaje durante el transporte de mercancías o en coberturas de invernadero. Esta fase puede durar entre 7 y 37 d a 29 °C y 15 °C, respectivamente (Baker *et al.*, 2019).

El adulto de *S. frugiperda* puede vivir entre 7 y 21 d. Las hembras adultas, como la mayoría de los noctuidos, tienen una vida relativamente corta, pero son muy fecundas. Los adultos poseen dimorfismo sexual. La longitud del cuerpo del macho es de aproximadamente 1.6 cm con una envergadura de 3.7 cm y el color de las alas anteriores está marcado con un moteado gris y marrón claro. Tiene celdas discales en tres cuartas partes del área de las alas anteriores con color pajizo, mientras que la otra cuarta parte del área es de color marrón oscuro con manchas blancas triangulares en la punta y cerca del centro de las alas anteriores. El cuerpo de la hembra es un poco más grande que el del macho con una longitud de hasta 1.7 cm y 3.8 cm de envergadura. El moteado de marrón grisáceo a gris en las alas delanteras de la hembra es menos distintivo en comparación con las del macho (Figura 3) (Sarkowi y Mokthar, 2021).

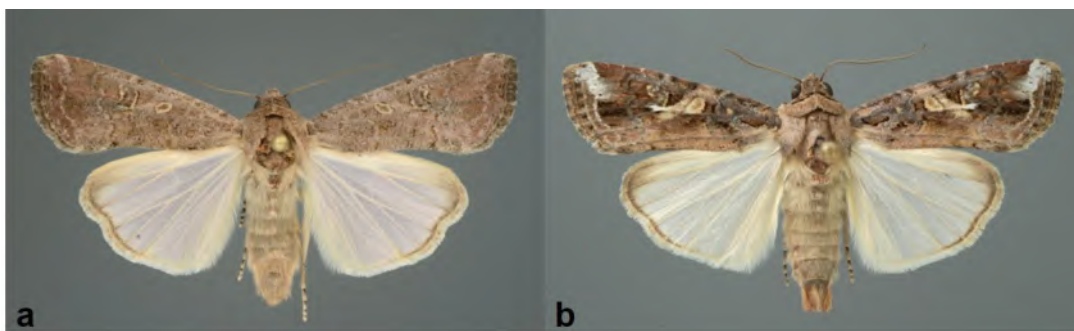


Figura 3. Adultos de *Spodoptera frugiperda*; a: hembra, b: macho (adaptado de Lyle J. Buss, 2019, Universidad de Florida).

Se conoce que la temperatura juega un papel importante en la biología de *S. frugiperda* ya que este insecto no entra en diapausa (Du Plessis *et al.*, 2020). Estudios realizados para determinar el efecto de la temperatura en la biología de *S. frugiperda* revelaron que la tasa de desarrollo aumentó linealmente con el aumento de temperaturas entre 18°C y 30 °C y la supervivencia larvaria fue más alta entre 26 °C y 30 °C. También se obtuvo como resultado que el rango óptimo para el desarrollo de huevos, larvas y de huevo a adulto fue entre 26 °C y 30 °C. La temperatura óptima con la tasa de desarrollo larvaria más rápida y la mortalidad más baja fue de 30 °C. El período de desarrollo de la pupa osciló entre 7.82 y 30.68 d (a 32°C y 18 °C, respectivamente) (Du Plessis *et al.*, 2020).

III. 3 Daños causados por *Spodoptera frugiperda* en maíz

Todos los estadios larvales de *S. frugiperda* consumen follaje. Sin embargo, también perforan las partes en crecimiento de la planta, como los brotes y las coronas, lo que dificulta su desarrollo. Las larvas de primer estadio consumen un lado de la capa epidérmica del tejido foliar, lo que deja intacta la capa opuesta. En cambio, las larvas de segundo y tercer estadio pueden consumir toda la capa de la hoja, creando agujeros. Las larvas de estadios más avanzados pueden consumir todo el follaje, dejando solo las venas y los tallos. También dañan la mazorca de maíz al perforar su cubierta y consumir los granos cuando están en la etapa de llenado (etapa fenológica R3) (Sarkowi y Mokhtar, 2021).

Este insecto puede causar daños a las plantas en cualquiera de sus estadios fenológicos, aunque prefiere alimentarse del cogollo de la planta. La incidencia de *S. frugiperda* puede causar grandes pérdidas, que oscilan entre el 45 % y el 100 % del cultivo (Gutiérrez-Moreno *et al.*, 2019); sin embargo, los niveles de daño dependen en gran medida del genotipo de maíz (Padilla-Cortes *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2024). Estudios recientes realizados en 12 países productores de maíz reportaron que, sin métodos de control, *S. frugiperda* puede reducir el rendimiento anual en entre 4.1 y 17.7 millones de toneladas (Rwomushana *et al.*, 2018).

III. 4 Principales métodos de control de *Spodoptera frugiperda*

- Control químico

Los insecticidas químicos se han utilizado desde la década de 1940 como el método más común para controlar las plagas de insectos (Paredes-Sánchez *et al.*, 2021). Sin embargo, el uso excesivo de estos compuestos provoca daños al medio ambiente, a la salud humana y animal, y reduce las poblaciones de enemigos naturales (Jepson *et al.*, 2020; Afza *et al.*, 2023). El empleo de estos insecticidas químicos también promueve el desarrollo de resistencia del insecto plaga, por lo que a veces su acción es ineficiente (Tambo *et al.*, 2020; Jepson *et al.*, 2020; Carvalho *et al.*, 2022). En el caso de *S. frugiperda*, su comportamiento alimentario provoca que las larvas estén "protegidas" por las hojas internas de la planta, generalmente cubiertas con sus excrementos, lo que dificulta la interacción con el insecticida. Por lo tanto, los agricultores deben aplicar estos productos en los primeros días de siembra, casi directamente sobre el suelo o a través de gránulos aplicados directamente al cogollo de la planta. Los principales grupos químicos de insecticidas utilizados para controlar las poblaciones de *S. frugiperda* en América Latina incluyen organofosforados, piretroides y

carbamatos (Abrahams *et al.*, 2017). En México, se aprobaron productos como cipermetrina, lambda-cihalotrina + clorpirifós etílico y lambda-cihalotrina y metomilo, entre otros, para controlar este insecto en el cultivo de maíz (COFEPRIS, 2020). De manera similar, en China se reportó el uso de lambda-cihalotrina para su control (Zhao *et al.*, 2020). En Brasil, se informó sobre el desarrollo de resistencia de *S. frugiperda* a los insecticidas organofosforados y piretroides (Carvalho *et al.*, 2013).

- **Control biológico**

Otro método que ha resultado efectivo en la disminución de los niveles poblacionales de insectos plaga es el control biológico. En las últimas cuatro décadas, el control de plagas y enfermedades de las plantas mediante agentes biológicos ha atraído cada vez más atención en la búsqueda por reducir la dependencia de productos químicos para la producción agrícola. El uso de enemigos naturales, como depredadores, parasitoides y entomopatógenos (por ejemplo, virus, bacterias y hongos), ha demostrado ser una alternativa viable y sostenible para el manejo de plagas (Bamisile *et al.*, 2021).

Para el control de *S. frugiperda*, la liberación de parasitoides de huevos es una técnica prometedora en el manejo integrado de insectos. La especie *Telenomus remus* (Nixon) destaca tanto por su efectividad como por su distribución mundial (Cingolani *et al.*, 2014). En cuanto a los entomopatógenos, la bacteria más conocida y empleada para el control de *S. frugiperda* es *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt), que actúa por ingestión, y genera la formación de poros y lisis osmótica de las células, lo que finalmente causa la muerte del insecto (Pacheco-Hernández *et al.*, 2019). Además, el uso de virus entomopatógenos es un método eficiente para el control de *S. frugiperda*. Dentro de este grupo, los baculovirus (Baculoviridae) son los más destacados. Los baculovirus son virus de ADN que se replican en el núcleo de las células y se caracterizan por ser altamente específicos y virulentos, sin afectar a los humanos, el medio ambiente ni a los insectos benéficos (Hussain *et al.*, 2021).

Los hongos entomopatógenos son alternativas particularmente prometedoras para el control de plagas. Estos microorganismos se multiplican en los cadáveres de insectos, creando una fuente de inóculo que se dispersa a través de diferentes vías e infecta nuevas poblaciones de sus huéspedes. Algunos de los géneros de hongos entomopatógenos más estudiados incluyen *Lecanicillium* (Hypocreales: Clavicipitaceae), *Pandora* (Entomophthorales; Entomophthoraceae), *Isaria* (Hypocreales: Clavicipitaceae), y los más utilizados *Beauveria*

(Hypocreales: Clavicipitaceae) y *Metarhizium* (Hypocreales: Clavicipitaceae) (Humber, 2012). Estos hongos requieren una estrategia eficaz para colonizar e infectar a sus huéspedes. Generalmente, los factores más importantes para la reproducción, supervivencia e infección exitosa de estos patógenos son condiciones de temperatura adecuadas (25-28 °C), alta humedad relativa (>75%) y la susceptibilidad del huésped (Islam *et al.*, 2021). El modo de acción de estos microorganismos se ha estudiado mediante el empleo de hongos genéticamente modificados y análisis del transcriptoma para identificar los genes involucrados en la capacidad infectiva del patógeno (Yang *et al.*, 2020).

III. 5 Ciclo infectivo de los hongos entomopatógenos

La principal vía de entrada de los hongos entomopatógenos es a través de la cutícula de sus huéspedes o mediante heridas y tráqueas. Sin embargo, antes de su entrada, es necesario la adhesión cuticular y la formación de una estructura llamada apresorio. Para penetrar en la endocutícula, los hongos entomopatógenos secretan enzimas que la degradan, como lipasas, proteasas, aminopeptidasas y quitinasas, entre otras (Skinner *et al.*, 2014). Estudios recientes han dividido el ciclo infectivo de los hongos entomopatógenos en las siguientes fases: 1. Adhesión de conidios, 2. Germinación y formación de apresorio, 3. Penetración de conidios, 4. Supresión de defensas del huésped, 5. Proliferación dentro del huésped y 6. Crecimiento externo del micelio y producción de nuevos conidios (Figura 4) (Shin *et al.*, 2020). Aunque la adherencia de los conidios no es específica, los sitios que promueven la invasión varían dependiendo del insecto huésped. La unión de los hongos al huésped está determinada por la influencia de proteínas superficiales hidrofóbicas de los conidios (Blango *et al.*, 2019).

Cuando los hongos entomopatógenos ingresan a la hemolinfa del huésped, producen hifas y propágulos semejantes a levaduras conocidos como blastosporas. Estas estructuras desempeñan un papel crucial en la virulencia de los hongos durante el desarrollo de la enfermedad. Se forman exclusivamente en la hemolinfa de los huéspedes infectados, lo que representa una estrategia fúngica para la multiplicación rápida mediante división y gemación hasta lograr una colonización completa. En la hemolinfa, los hongos producen metabolitos secundarios tóxicos involucrados en la muerte del huésped (Valero-Jiménez *et al.*, 2016).

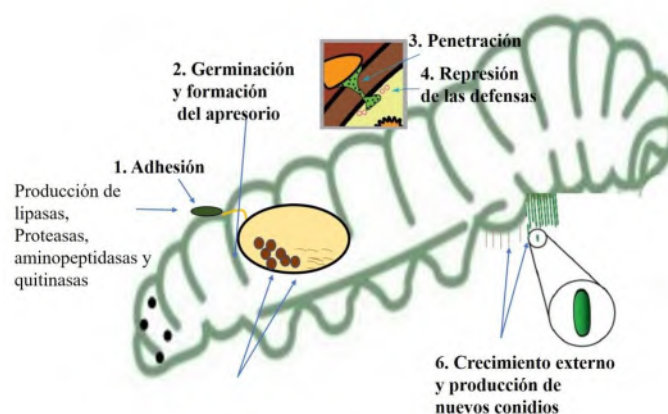


Figura 4. Ciclo infeccioso de un hongo entomopatógeno en una larva de lepidóptero (Adaptado de Keyser, 2015).

Por ejemplo, *B. bassiana* produce beauvericina y bassianólidos (péptidos cíclicos oligoméricos no ribosomales), una variedad de beauverólidos (péptidos cíclicos), oosporeína (dibenzoquinona), bassiatina (dicetomorfolina) y tenelina (2-piridona). Por otro lado, las especies del género *Metarhizium* producen principalmente destruxinas (hexadepsipéptidos cíclicos) (Pedrini, 2018).

Después de que los hongos entomopatógenos matan al insecto plaga, el micelio emerge de su cuerpo, produciendo conidios que pueden infectar a otros huéspedes (Shin *et al.*, 2020). Estos conidios tienen propiedades hidrofóbicas y se dispersan principalmente por factores abióticos como el agua y el viento y pueden volver a infectar cualquier etapa de vida de sus huéspedes (Ma *et al.*, 2024).

III. 6 Empleo de hongos entomopatógenos en el control de *Spodoptera frugiperda*

Se han reconocido aproximadamente 750-1,000 especies de hongos patógenos de insectos (Gupta y Jinda, 2014). Estos microorganismos habitan diversos ambientes, principalmente en la rizósfera, donde colonizan las raíces de las plantas (Ahmad *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2022). También se ha encontrado que colonizan el tejido endofítico de muchas plantas de importancia económica, incluido el maíz (Sui *et al.*, 2024). Además, las especies nativas de hongos entomopatógenos tienen una ventaja sobre otros enemigos naturales exóticos: están adaptadas al hábitat de las plagas y presentan menos riesgos para otros organismos dentro de

los agroecosistemas (Johny *et al.*, 2012). Esto resalta su potencial como una alternativa ecológica y sostenible para el control de plagas.

La presencia de hongos entomopatógenos ha sido ampliamente documentada en diversos suelos de importancia agrícola en México (González-Cava *et al.*, 2019; Serna-Domínguez *et al.*, 2019). Huerta-Ramírez *et al.* (2018) identificaron aislamientos de diferentes muestras de suelo recolectadas en el estado de Michoacán. Sin embargo, existen muy pocos estudios sobre el aislamiento de estos organismos nativos en diversas etapas de vida de *S. frugiperda* (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2001). En la mayoría de estos estudios, los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* fueron los más abundantes.

Las especies *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin son las más comunes y efectivas para controlar diversas especies de insectos plaga (Pacheco-Hernández *et al.*, 2019), incluyendo *S. frugiperda* (Fakeer *et al.*, 2024), y su principal modo de acción es a través del contacto de los conidios con la cutícula del insecto. Ambas especies de hongos tienen la capacidad de colonizar las plantas de manera endofítica, y como tal, se ha observado que juegan un papel significativo en la protección contra herbivoría y enfermedades causadas por hongos, virus y bacterias fitopatógenas (Mwamburi, 2021). Otra especie de hongo de gran interés debido a su alta virulencia y persistencia en el campo contra las poblaciones de *S. frugiperda* es *Metarhizium rileyi* (Farlow) Kepler S.A. Rehner y Humber (= *Nomuraea rileyi*) (Peng *et al.*, 2024).

III. 7 Biología y ecología de *Metarhizium rileyi* (Farlow) Kepler S.A. Rehner y Humber

El hongo entomopatógeno *M. rileyi* (Farlow) (Ascomycetes: Hypocreales) fue anteriormente conocido bajo otros nombres taxonómicos, como *Botrytis rileyi* (Farlow), *Spicaria rileyi* (Farlow) Charles y *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson (Dev *et al.*, 2021). No obstante, gracias a estudios morfológicos y filogenéticos realizados por Kepler *et al.* (2014), se determinó que pertenece al género *Metarhizium*. Esta especie se encuentra ampliamente distribuida y, al igual que otras del mismo género, es común en suelos (Peng *et al.*, 2024). Este hongo se ha aislado de aproximadamente 60 especies de lepidópteros, más de la mitad de las cuales pertenecen a la familia Noctuidae (Fronza *et al.*, 2017). Al ser inoculado en un medio de cultivo rico en maltosa, peptona de caseína y extracto de levadura, se observa una fase inicial caracterizada por la formación de micelio blanco. Posteriormente, se produce la formación de

conidios, lo que da lugar a una coloración verde olivácea. En larvas de *S. frugiperda* sigue este mismo patrón. Estudios microscópicos han revelado que los conidios de este hongo son ovoides y se disponen en cadenas cortas y divergentes, originadas a partir de fiálides (Figura 5). Para que complete eficazmente su ciclo de infección en un huesped, requiere condiciones ambientales favorables, como temperaturas cercanas a los 25 °C y niveles de humedad relativa superiores al 75 % (Visalakshi *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2025).

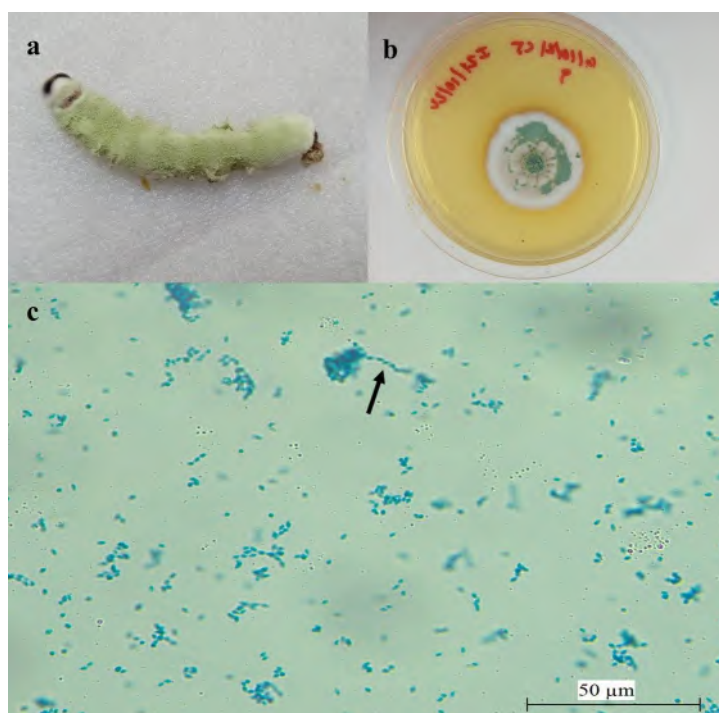


Figura 5. Morfología de *Metarhizium rileyi*; a: conidios verdes oliváceos cubriendo una larva de *Spodoptera frugiperda*, b: Micelio blanquecino producido por *M. rileyi* seguido por la formación de conidios verdes, c: conidios ovoides. La flecha destaca la formación de cadenas cortas de conidios en forma de fiálides. Fuente autor.

Dada la importancia de *S. frugiperda* en el cultivo de maíz y su expansión global, actualmente existe la necesidad de comprender más a fondo los hongos entomopatógenos nativos asociados con este insecto y la interacción insecto-planta-patógeno. Esto resulta crucial para diseñar un programa de manejo integrado de este insecto plaga.

Esta investigación pretende generar tanto conocimiento fundamental como aplicado sobre la actividad biológica de especies de hongos entomopatógenos aisladas de poblaciones de *S. frugiperda*. Esto se logrará mediante un monitoreo sistemático de las larvas de esta plaga en

zonas productoras de maíz en el norte del estado de Michoacán. Posteriormente, se seleccionarán a nivel de laboratorio los aislamientos con perspectivas biológicas prometedoras para su aplicación, llevando a cabo estudios en condiciones de invernadero y campo sobre plantas de maíz. Estas investigaciones contribuyen a los esfuerzos nacionales e internacionales en curso para establecer una estrategia de control dentro del marco de manejo integrado para *S. frugiperda*.

IV. HIPÓTESIS

H1. Los hongos entomopatógenos se encuentran asociados a poblaciones de *S. frugiperda* en cultivos de maíz en el norte del estado de Michoacán.

H2. *Metarhizium rileyi* es altamente patógeno para las larvas de *S. frugiperda* y su variabilidad genética está asociada con su distribución geográfica.

H3. *Metarhizium rileyi* es un agente potencial para controlar *S. frugiperda* en condiciones de invernadero y campo.

V. OBJETIVOS

V.I. Objetivo General

Caracterizar biológica y genéticamente los aislamientos mexicanos de *Metarhizium rileyi* obtenidos de larvas de *S. frugiperda* recolectadas en cultivos de maíz.

V.II. Objetivos específicos

1. Determinar la tasa de mortalidad y esporulación de 24 aislamientos mexicanos de *M. rileyi* en larvas de segundo instar de *S. frugiperda*.
2. Caracterizar, genética y biológicamente, a cinco aislamientos de *M. rileyi* procedentes de diferentes sitios geográficos del norte del estado de Michoacán.
3. Evaluar la eficacia de un aislamiento promisorio de *M. rileyi* para el control de *S. frugiperda* en plantas de maíz en condiciones de invernadero y campo.

VI. PREVALENCIA NATURAL, CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Metarhizium rileyi* (FARLOW) AISLADO DE LARVAS DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) EN MÉXICO

RESUMEN

Los hongos entomopatógenos son considerados agentes potenciales de control biológico contra *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), la plaga más importante del maíz a nivel mundial. En este estudio, se evaluó la infección natural, las características moleculares y la actividad biológica de *Metarhizium rileyi* (Farlow), el cual se aisló de larvas de *S. frugiperda* recolectadas en cultivos de maíz en cinco localidades de México. La infección natural varió entre el 23 % y el 90 % en las localidades analizadas. Se evaluaron 24 aislamientos sobre larvas de *S. frugiperda* de segundo estadio expuestas a una concentración de 1.0×10^8 conidios/mL. Se obtuvo una mortalidad entre 70 % y 98.7 % y un nivel de esporulación entre el 60.5 % y 98.7 %. Se seleccionaron los aislamientos, T9-21, Z30-21, PP48-21 y L8-22, para determinar sus relaciones filogenéticas mediante el análisis del gen β -tubulina y comparar la concentración letal media (CL₅₀), el tiempo letal medio (TL₅₀) y la supervivencia larval. El análisis filogenético agrupó a los aislamientos en tres clados. Los aislamientos T9-21, PP48-21 y J10-22 estuvieron estrechamente relacionados (clado A), mientras que los aislamientos Z30-21 (clado B) y L8-22 (clado C) mostraron una mayor divergencia genética. Sin embargo, estas diferencias genéticas no siempre se reflejaron en la patogenicidad, ya que no se observaron diferencias significativas en los valores de CL₅₀. Además, los aislamientos T9-21, J10-22 y L8-22 mostraron una mayor virulencia al reducir el tiempo de la supervivencia larval. Estos resultados sugieren que los aislamientos nativos de *M. rileyi* representan una alternativa prometedora para el control biológico de *S. frugiperda*.

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los tres cereales más consumidos a nivel global, junto con el arroz (*Oryza sativa* L.) y el trigo (*Triticum aestivum* L.) (Neupane *et al.*, 2022). Debido a su alto contenido proteico, representa una fuente esencial de alimento tanto para los humanos como para el ganado (Panda *et al.*, 2022). México ocupa el séptimo lugar entre los mayores productores de maíz en el mundo, con una producción anual que supera los 21 millones de toneladas y una superficie cultivada de más de seis millones de hectáreas (FAO, 2022).

Uno de los principales desafíos para la producción de maíz es la presencia del gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Este lepidóptero, originario de América, se ha expandido rápidamente desde 2016 y actualmente es considerado una plaga invasiva de gran impacto en África, Asia y Australia (Tay *et al.*, 2023). Las larvas se alimentan principalmente de las hojas en desarrollo del maíz, lo que puede provocar una reducción en la capacidad fotosintética de las plantas y el rendimiento del cultivo hasta en un 58 % (Chimweta *et al.*, 2020).

El manejo de esta plaga se basa principalmente en la aplicación frecuente de insecticidas de amplio espectro. No obstante, esta estrategia no garantiza un control efectivo, ya que *S. frugiperda* posee una alta capacidad para desarrollar resistencia a la mayoría de los compuestos químicos convencionales (Blanco *et al.*, 2014). Además, el uso de estos productos puede tener efectos adversos tanto en la salud humana, en el medio ambiente y la economía del agricultor, ya que reduce las poblaciones de artrópodos benéficos y eleva los costos de producción agrícola (Cech *et al.*, 2022). Debido a estas limitaciones, es fundamental identificar alternativas de control que sean compatibles con el manejo integrado de plagas (MIP) (Kenis *et al.*, 2022). En este sentido, el uso de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico ha cobrado especial relevancia (Fronza *et al.*, 2017).

Los hongos entomopatógenos, un grupo especializado de microorganismos que habitan en el suelo, representan una estrategia eficaz para el control de diversas plagas agrícolas (Islam *et al.*, 2021). Estos hongos pueden infectar diferentes etapas del ciclo de vida de sus hospedadores, se encuentran bien adaptados a los entornos donde habitan los insectos y presentan un menor impacto sobre organismos no objetivo dentro de los agroecosistemas (Johny *et al.*, 2012).

Entre los agentes biológicos más utilizados en el control de plagas destacan especies de los géneros *Beauveria* (Vuillemin) y *Metarhizium* (Sorokin), reconocidos por su eficacia como bioinsecticidas (Ramanujam *et al.*, 2020). *Metarhizium rileyi* (Farlow) Kepler, S.A. Rehner y Humber (anteriormente *Nomurea rileyi*) (Hypocreales: Clavicipitaceae) es un hongo patógeno de distribución global que afecta a múltiples especies de lepidópteros (Kepler *et al.*, 2014; Fronza *et al.*, 2017). Se han registrado brotes naturales de este microorganismo en diversas plagas de la familia Noctuidae (Wyckhuys y O'Neil, 2006; Dev *et al.*, 2021), incluyendo *Spodoptera frugiperda* (Bosa *et al.*, 2004; Visalakshi *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2022; Sun *et*

al., 2023). Aunque *M. rileyi* ha sido identificado como un agente de control efectivo dentro de las estrategias de manejo integrado de plagas (Fronza *et al.*, 2027), su capacidad para inducir mortalidad en los insectos varía entre los diferentes aislamientos (Tay *et al.*, 2023).

Por esta razón, es esencial identificar y caracterizar aislamientos nativos de *M. rileyi* que estén implicados en epizootias naturales de *S. frugiperda*. En este estudio, se evaluó la presencia natural de este hongo en larvas de *S. frugiperda* recolectadas en cinco regiones productoras de maíz en México. Además, se comparó la actividad biológica y la capacidad de esporulación de 24 aislamientos en larvas de segundo estadio de la plaga. Posteriormente, se seleccionaron cinco aislamientos con el objetivo de analizar sus relaciones filogenéticas, a través del gen β -*tubulina* (Kepler *et al.*, 2018), y evaluar su actividad biológica en términos de concentración letal media (CL₅₀), tiempo letal medio (TL₅₀) y supervivencia larval.

En este trabajo, se define la patogenicidad como la capacidad del hongo para invadir el hospedador, establecer la infección, reproducirse y causar la muerte, evaluada mediante parámetros de concentración-mortalidad. Por otro lado, la virulencia se refiere al tiempo medio que transcurre entre la infección y la muerte del hospedador (Thomas y Elkinton, 2004).

MATERIALES Y MÉTODOS

A menos que se especifiquen condiciones diferentes, el crecimiento fúngico (cultivos polispóricos y monospóricos), los microcultivos, la viabilidad conidial y los bioensayos se evaluaron en el laboratorio a 25 °C ± 2 °C, 75% ± 5% de humedad relativa (HR) en total oscuridad.

- Cría de insectos

Los insectos empleados en este estudio provinieron de una colonia de *S. frugiperda* mantenida en el Laboratorio de Entomología Agrícola del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), ubicado en El Trébol, Tarímbaro, Estado de Michoacán, México. Las larvas se criaron de manera individual en vasos plásticos de 30 mL, donde se les proporcionó un fragmento de dieta semisintética (Poitout *et al.*, 1974) libre de formaldehído. Las pupas se colocaron en recipientes plásticos de 0.5 L y, una vez que los adultos emergieron, se trasladaron a bolsas de

papel kraft (18 × 11 × 40 cm) en una proporción cercana a 1:1 (macho: hembra). Los adultos recibieron alimentación a base de una solución de miel al 15%. Durante la fase de oviposición, las bolsas de papel se reemplazaron diariamente. Todo el procedimiento de cría se llevó a cabo en una cámara climática bajo condiciones controladas de 25 °C ± 2 °C, 70% ± 5% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16:8 h (luz: oscuridad).

- Aislamientos fúngicos

Durante la temporada de lluvias en septiembre de 2021 y 2022, se recolectaron 295 larvas de *S. frugiperda* en cultivos de maíz ubicados en cinco localidades de los municipios de Tarímbaro, Zinapécuaro, Pátzcuaro y Chucándiro, en el estado de Michoacán, México (Tabla 1). En esta región, la temperatura máxima promedio durante el día fue de 28 °C, con valores que oscilaron entre 27 °C y 29 °C, mientras que la temperatura mínima nocturna promedio fue de 9 °C, oscilando entre 9 °C y 10 °C. La humedad relativa promedio en septiembre fue del 79%, con un rango de 76% a 84% (datos obtenidos de www.meteored.mx, consultado el 1 de marzo de 2024).

Tabla 1. Localidades y fecha de recolección de *Metarhizium rileyi* aislado de larvas de *Spodoptera frugiperda*

Sitio de colecta/municipio	Fecha de recolecta	Número de larvas recolectadas	Coordenadas
El Trébol, Tarímbaro	02/09/2021	137	N19°46'12.5076'' - W101°09'17.6724''
Peña del Panal, Tarímbaro	07/09/2021	78	N19°46'27.8976'' - W101°11'04.452''
Zinapécuaro, Zinapécuaro	15/09/2021	44	N19°50'46.2703'' - W101°01'40.2930''
Lagunillas, Pátzcuaro	07/09/2022	25	N19°36'40.554'' - W101°25'23.7''
El Jacal, Chucándiro	21/09/2022	11	N19°53'16.3644'' - W101°20'12.1632''

Las larvas se recolectaron directamente de las plantas de maíz mientras se caminaba por el campo. La recolección se realizó en diferentes etapas fenológicas del cultivo, entre V10 y V15 (Ritchie *et al.*, 1993). Tras la recolección, las larvas se colocaron en recipientes plásticos con hojas de maíz y se trasladaron al Laboratorio de Patología de Insectos-IIAF-UMSNH. Con un dispositivo GPS se registraron las coordenadas geográficas de cada sitio de recolección.

En el laboratorio, las larvas se depositaron individualmente en vasos plásticos de 30 mL con una dieta semisintética y se monitorearon a diario hasta que puparon para detectar posibles signos de infección fúngica o la presencia de otros patógenos. Se obtuvieron 89 aislamientos fúngicos, uno por cada larva infectada (como se detalla en la Sección 3). En aquellos casos en donde las larvas mostraron signos de micosis, se realizaron cultivos polispóricos. Para ello, con un asa microbiológica estéril, se tomaron conidios de las larvas infectadas y se inocularon en medio agar peptona y maltosa enriquecido con extracto de levadura (MPLY: 40 g/L de maltosa, 10 g/L de peptona de caseína, 10 g/L de extracto de levadura y 15 g/L de agar), con la adición de los antibióticos sulfato de estreptomicina (0.05%) y cloranfenicol (0.04%) (Akutse *et al.*, 2013). Todos los cultivos se incubaron durante 14 d.

Posteriormente, se realizaron microcultivos para evaluar la viabilidad de los conidios. Para esto, se tomó una muestra de conidios de cada cultivo polispórico y se suspendió en 1.0 mL de una solución estéril de Tween 80 al 0.05%. Luego, se tomó una alícuota de 100 μ L de esta suspensión y ajustó a una concentración de 1×10^8 conidios/mL, y se depositó sobre 250 μ L de medio MPLA solidificado en un portaobjetos estéril. A las 24 h de incubación, se contabilizaron los conidios germinados. Se consideró que un conidio había germinado cuando la longitud del tubo germinativo era al menos dos veces la longitud del conidio (Goettel e Inglis, 2012). El porcentaje de germinación de conidios se calculó con la siguiente fórmula: % germinación de conidios = $(V/T) \times 100$ donde V es el número total de conidios viables y T es el número total de conidios viables y no viables en la muestra (Rombach, 1989). Los aislamientos fúngicos se consideraron viables si la germinación de conidios fue $\geq 95\%$ (Sevim *et al.*, 2010; Falvo *et al.*, 2016). La identificación morfológica de los aislamientos se realizó con el uso de las claves propuestas por Humber (2012) bajo un microscopio óptico con un aumento de 400 $\times$.

De los 89 aislamientos obtenidos, se seleccionaron 24 para evaluar su actividad biológica, basándose en que su viabilidad de conidios estuviera entre 95% y 100%. A partir de estos 24 aislamientos, se realizaron cultivos monospóricos según la metodología propuesta por Goettel e Inglis (2012), con la diferencia de que los conidios se incubaron a 25 ± 2 °C en lugar de 28 °C. Los conidios se recuperaron del cultivo con una espátula estéril, siguiendo el método descrito por Ramakuwela *et al.* (2020); posteriormente, se resuspendieron en 100 mL de agua destilada estéril.

- Bioensayos con una única concentración

Se utilizaron grupos de 20 larvas de *S. frugiperda* de segundo estadio (entre 8 y 10 h después de la muda), las cuales se sumergieron durante 20 seg en 3 mL de una suspensión de conidios de cada uno de los 24 aislamientos, los cuales se ajustaron a una concentración de 1×10^8 conidios/mL. Este procedimiento se basó en el protocolo descrito por Goettel e Inglis (2012). La concentración de conidios se determinó en una cámara de Neubauer® bajo microscopía óptica y una magnificación de 400×. Para una adecuada dispersión de los conidios se utilizó Tween 80 al 0.05% (p/v). Posterior al tratamiento, las larvas se colocaron individualmente en vasos plásticos ventilados de 30 mL con un fragmento de dieta semisintética. Después de 24 h, las larvas se trasladaron a pocillos cilíndricos de 2 cm² en placas de cultivo celular de 24 pocillos, cada uno con dieta semisintética fresca. Cada conjunto de 20 larvas se consideró una réplica experimental y realizaron cuatro réplicas por aislamiento. Para el grupo control, las larvas se trataron con agua destilada estéril que contenía únicamente Tween 80 al 0.05%. Los bioensayos se revisaron cada 24 h durante un período de 13 d para realizar el registro de la mortalidad larval de cada aislamiento evaluado. Las larvas muertas se transfirieron individualmente a pocillos estériles de placas de 24 pocillos con papel filtro humedecido con 500 µL de agua destilada estéril, con el objetivo de inducir la esporulación. Posteriormente, se cuantificó la proporción de cadáveres con esporas.

A partir de los resultados obtenidos en los bioensayos y considerando los sitios de aislamiento, se seleccionaron cinco aislamientos (T9-21, Z30-21, PP48-21, J10-22 y L8-22), representativos de distintas localidades (Tabla 1), para llevar a cabo análisis de caracterización genética mediante secuencias del gen *β-tubulina*, así como evaluaciones de su actividad biológica.

- Caracterización genética

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de micelio de los aislamientos T9-21, Z30-21, PP48-21, J10-22 y L8-22. Para ello, estos aislamientos se inocularon individualmente 100 mL de medio líquido Sabouraud dextrosa (SDB) (Bioxon, Ciudad de México, México) con un disco de 10 mm de diámetro, obtenido de cultivos fúngicos de 20 d de crecimiento en MPLA. Los cultivos en SDB se incubaron a 25 °C en condiciones de oscuridad durante siete días y se

mantuvieron en agitación a 120 rpm en un agitador orbital. Posteriormente, el micelio se recolectó por filtración (Enkerli y Widmer, 2010), se lavó dos veces con agua estéril y se almacenó a -70°C hasta su procesamiento. Para la extracción, se tomaron 30 mg de micelio de cada aislamiento, los cuales se colocaron en microtubos de 2 mL y se trataron con el tampón de extracción CTAB, previamente calentado a 65°C , durante 5 min. La mezcla se trituró con un micropistilo y se dejó incubar a temperatura ambiente por otros 5 minutos. A continuación, se añadieron 600 μL de una mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y la muestra se agitó vigorosamente durante un minuto. La mezcla se centrifugó a 14,000 rpm durante 12 min a 8°C . Se recuperaron 400 μL del sobrenadante y se transfirieron a nuevos microtubos en donde se agregaron 100 μL de acetato de sodio 10 M. Tras invertir suavemente los tubos, se añadieron 500 μL de isopropanol, y la mezcla se almacenó durante 24 h a -20°C para favorecer la precipitación del ADN. Posteriormente, la muestra se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm durante 5 min a 8°C . El isopropanol se decantó y se añadió 1 mL de etanol al 70% frío, la muestra se mezcló suavemente y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Luego, se realizó una nueva centrifugación en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. El etanol se eliminó por decantación y el pellet resultante se dejó secar al aire durante una hora. Finalmente, el pellet se resuspendió en 50 μL de agua estéril. La concentración de ADN se determinó en un espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.).

Amplificación del gen β -tubulina

La amplificación del gen β -tubulina se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los siguientes oligonucleótidos: TUB-F (5'-TGG GCY AAR GGY CAC TAC ACY GA-3') y TUB-R (5'-TCA GTG AAC TCC ATC TCR TCC AT-3'). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50 μL , que contenía 25 μL de Go Taq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EE. UU.), 1.25 μL de cada oligonucleótido y 10 ng de ADN genómico. Las condiciones del ciclo térmico consistieron en una desnaturalización inicial de 2 min a 95°C , seguida de 34 ciclos de 10 seg a 95°C , 30 seg a 50°C y un minuto a 72°C , con una extensión final de 5 min a 72°C .

Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0% utilizando tampón SB (1 M ácido bórico, 0.25 M hidróxido de sodio, pH 8.5). Las bandas se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio (Thermo Fisher Scientific, Waltham,

MA, EE. UU.) y se registraron con el sistema de documentación de geles GelDoc EQ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.), utilizando el software Image Lab versión 5.2.1 (Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.). Para estimar el tamaño de las bandas, se utilizó una escalera molecular de 100 pb (Jena Bioscience, Jena, Alemania).

Los productos de PCR se purificaron empleando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), y posteriormente se realizó la secuenciación bidireccional por la técnica de Sanger en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO, Irapuato, México), utilizando los iniciadores TUB-R/TUB-F. Las secuencias directa e inversa fueron ensambladas y editadas para obtener una secuencia consenso, mediante el software Geneious versión 2013.1.2 (Biomatters, Auckland, Nueva Zelanda).

Las secuencias obtenidas para los cinco aislamientos se depositaron en la base de datos GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), bajo los números de acceso consecutivos OR589405 a OR589409. Las secuencias consenso se compararon con secuencias del gen *β -tubulina* disponibles en las bases de datos. Para esto, se utilizó la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST versión 2.15.0) del NCBI. Las secuencias con mayor similitud fueron descargadas en formato FASTA para ser utilizadas como referencia en los análisis filogenéticos.

El análisis filogenético se realizó en el software MEGA 11, versión 11.0.13, mediante el método del vecino más cercano (Neighbor-Joining), con 1000 réplicas de bootstrap. Las distancias filogenéticas se calcularon mediante el método de máxima verosimilitud compuesta (Maximum Likelihood Composite), basado en el número de sustituciones por sitio. Se excluyeron todas las posiciones con huecos o datos faltantes.

- Respuesta de concentración de conidios–mortalidad y velocidad de muerte

Los bioensayos para evaluar la mortalidad y la velocidad de acción de cada aislamiento sobre larvas de segundo estadio se realizaron conforme a lo descrito en la Sección 2.3, con la diferencia de que se utilizaron cinco concentraciones de conidios, desde 1×10^5 hasta 1×10^9 conidios/mL. La mortalidad larval se evaluó a intervalos de 24 h durante un periodo de 14 d. Para determinar el valor de LT_{50} y la mortalidad acumulada hasta los 14 d de incubación, se utilizó una concentración fija de 1×10^8 conidios/mL.

- Análisis estadísticos

La mortalidad larval y el número de larvas micosadas causadas por los 24 aislamientos fúngicos en los bioensayos con una única concentración se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba de comparación de medias de Tukey HSD ($p < 0.05$), previa verificación de la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Antes del análisis, los datos se transformaron mediante la fórmula arco seno de la raíz cuadrada ($\arcsin \sqrt{x}$).

Las pruebas estadísticas se realizaron en el software R versión 4.0 (<https://www.r-project.org/>, consultado el 1 de marzo de 2024). Para evaluar la correlación entre la mortalidad larval (basada en el número total de insectos tratados) y la esporulación (considerando la esporulación de los insectos muertos) provocadas por los 24 aislamientos fúngicos, se aplicó la prueba de correlación por rangos de Spearman en el software SPSS versión 21 para Windows.

Los valores de CL_{50} y TL_{50} se calcularon con el software Polo Plus© versión 1.0 (LeOra Software, Berkeley, CA, EE. UU.) y se realizaron pruebas de bondad de ajuste χ^2 para cada aislamiento. Las diferencias entre los valores de CL_{50} y TL_{50} entre aislamientos se determinaron en función de la no superposición de los intervalos de confianza al 95%. El TL_{50} se calculó considerando la concentración requerida para causar la muerte de aproximadamente el 90% de los insectos tratados.

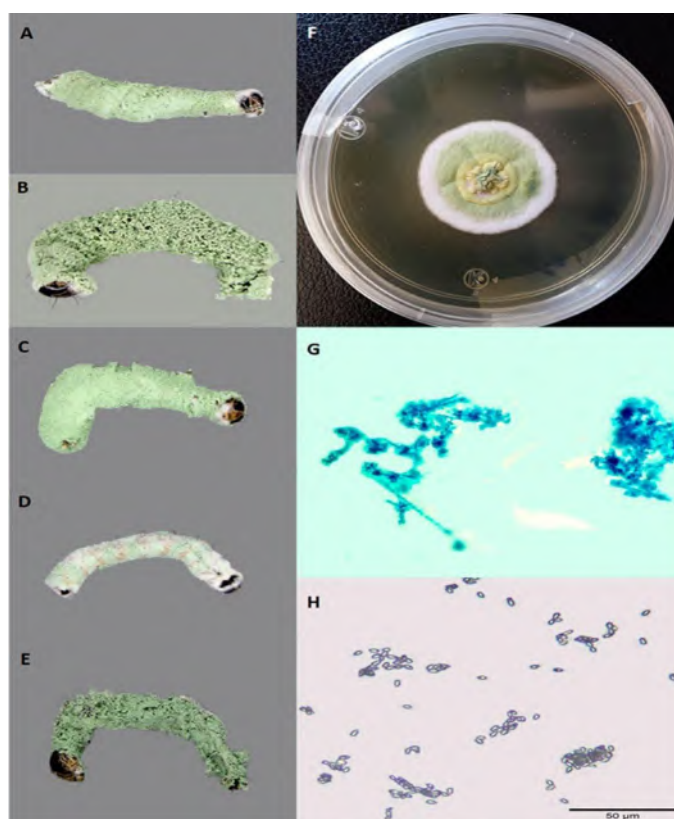
Para comparar el efecto de cinco aislamientos sobre la supervivencia de larvas de *S. frugiperda*, se utilizaron tanto el análisis de supervivencia de Kaplan–Meier y Gehan–Breslow, como el procedimiento no paramétrico LIFETEST. Además, se aplicó una prueba de comparación múltiple por pares (Long-Rank test, $p < 0.05$) para detectar diferencias significativas entre tratamientos (SAS/STAT®, SAS Institute, Cary, NC, EE. UU.).

RESULTADOS

- Recolección de hongos en campo

De un total de 295 larvas recolectadas, 89 presentaron infección por hongos entomopatógenos. Con base en sus características morfológicas, todos los aislamientos se identificaron como *M. rileyi*. Inicialmente, estos aislamientos formaron una cubierta blanca

En la primera recolección en campo (septiembre de 2021), el porcentaje de larvas de *S. frugiperda* infectadas por *M. rileyi* fue de 23%, 30% y 30% en las localidades de El Trébol, Peña del Panal y Zinapécuaro, respectivamente. En la segunda recolección (septiembre de 2022), el porcentaje de infección fue de 48% y 90% para las larvas recolectadas en El Jacal y Lagunillas, respectivamente. No se observaron larvas con signos de infección por virus, bacterias u otras especies de hongos entomopatógenos en ninguna de las localidades de muestreo. La germinación de conidios de los 89 aislamientos mencionados anteriormente varió entre 3.3% y 98.5% (Tabla 4 Suplementaria). Del total de larvas recolectadas, el 1.96% (n = 5) fueron parasitadas por taquínidos (Diptera: Tachinidae).



24

observa una cubierta densa de color blanco que posteriormente se torna verde claro. (G) Fiálides dispuestas en verticilos y conidióforos. (H) Conidios ovoides dispersos, algunos formando cadenas cortas.

- Bioensayos con una única concentración

A una concentración de 1×10^8 conidios/mL, se observaron diferencias significativas entre los aislamientos en la mortalidad de larvas de segundo estadio de *S. frugiperda* ($F_{23,72} = 4.88$, $p < 0.0001$), así como en la proporción de cadáveres que presentaron esporulación ($F_{23,72} = 6.87$, $p < 0.0001$), a los 13 d posteriores a la inoculación (Tabla 2). La mortalidad causada por el aislamiento T1-21 (70%) fue significativamente menor en comparación con el resto de los aislamientos, los cuales produjeron mortalidades entre 89% y 99%, sin observarse diferencias significativas entre ellos.

Con respecto a la esporulación, no se observaron diferencias significativas en la mayoría de los aislamientos (que variaron entre 85% y 98%) con las siguientes excepciones: (i) el aislamiento T1-21 (60.5%) fue significativamente inferior en comparación con los demás aislamientos (que variaron entre 82% y 98%), con la excepción del aislamiento PP1-21 (80%); (ii) el aislamiento T69-21 (82%) fue significativamente inferior en comparación con el aislamiento J10-22 (97%). Se observó una correlación positiva y significativa entre la esporulación del hongo y la mortalidad las larvas 15 d después de la inoculación (Spearman $Rho = 0.55$, $p < 0.0001$) (Tabla 2).

Tabla 2. Mortalidad y esporulación causadas por una concentración de 1×10^8 conidios/mL de 24 aislamientos de *M. rileyi* en larvas de segundo estadio de *S. frugiperda*.

Aislamientos	Mortalidad (%) $\pm$ EEM	Esporulación (%) $\pm$ EEM
T1-21	70.0 $\pm$ 4.1 a	60.5 $\pm$ 1.7 a
T69-21	90.0 $\pm$ 2.0 b	82.0 $\pm$ 1.0 bcd
T70-21	90.0 $\pm$ 2.0 b	82.0 $\pm$ 1.0 bcd
T72-21	95.0 $\pm$ 2.0 b	88.0 $\pm$ 3.6 bcdef
T5-21	93.7 $\pm$ 2.4 b	87.6 $\pm$ 4.7 bcdef
T9-21	97.5 $\pm$ 3.2 b	94.6 $\pm$ 2.3 bcdef
T8-21	95.0 $\pm$ 3.5 b	81.3 $\pm$ 2.2 bc
T2-21	97.5 $\pm$ 1.4 b	91.1 $\pm$ 1.3 bcdef
PP1-21	93.7 $\pm$ 3.7 b	80.2 $\pm$ 3.4 ab
PP12-21	95.0 $\pm$ 2.0 b	81.5 $\pm$ 1.8 bc

PP18-21	88.7 ± 4.3 b	88.4 ± 4.5 bcdef
PP48-21	97.5 ± 1.4 b	94.9 ± 3.0 bcdef
Z2-21	93.7 ± 1.2 b	84.0 ± 2.1 bcdef
Z30-21	97.5 ± 1.4 b	96.1 ± 2.5 cdef
Z32-21	95.0 ± 2.0 b	88.0 ± 2.7 bcdef
Z33-21	90.0 ± 2.0 b	93.3 ± 3.4 bcdef
J5-22	96.2 ± 2.4 b	94.7 ± 2.1 bcdef
J6-22	93.7 ± 1.2 b	92.0 ± 1.5 bcdef
J9-22	92.5 ± 3.2 b	90.5 ± 2.7 bcdef
J10-22	97.5 ± 1.4 b	97.4 ± 1.5 ef
L8-22	98.7 ± 1.2 b	98.7 ± 1.2 bcdef
L9-22	96.2 ± 1.2 b	90.8 ± 2.5 bcdef
L11-22	97.5 ± 1.4 b	96.2 ± 1.3 def
L12-22	92.5 ± 1.4 b	89.1 ± 2.3 bcdef

En negritas, los cinco aislamientos seleccionados para determinar sus relaciones filogenéticas mediante el análisis del gen *β-tubulina* y para comparar su actividad biológica en términos de concentración letal media, tiempo letal media y supervivencia larval. Los datos representan medias ± error estándar de la media (EEM). Dentro de la misma columna, los datos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (separación de medias por prueba Tukey HSD; $p > 0.05$).

Los cinco hongos entomopatógenos mexicanos seleccionados de diferentes puntos geográficos se agruparon con las secuencias de *M. rileyi*, basándose en su estructura molecular mediante las secuencias del gen *β-tubulina*. El análisis BLASTN mostró que las cinco secuencias compartieron una similitud del 99.32%. Además, al alinearlas para la determinación de vacíos, mostraron una similitud del 99.08% y 98.47% con las secuencias de *M. rileyi* del GenBank (KX641195 y KJ398566, respectivamente). El análisis filogenético reveló tres ramas fuertemente soportadas, una de ellas respaldada por los aislamientos de *M. rileyi* (Figura 7).

Los hongos entomopatógenos mexicanos se agruparon con un 100% de soporte de rama con la secuencia de *M. rileyi* reportada por Kepler *et al.* (2014). Las secuencias de los cinco aislamientos mexicanos fueron clasificadas en tres clados, denominados A, B y C. Los aislamientos PP48-21, J10-22 y T9-21 mostraron un clado respaldado con un 53% (clado A). En este clado, los aislamientos PP48-21 y J10-22 estuvieron estrechamente relacionados

(75%). El aislamiento Z30-21 (clado B) mostró una relación modesta (40%) con el aislamiento L8-22 y uno utilizado como referencia (KX641195) (clado C). Los aislamientos L8-22 y KX641195 estuvieron estrechamente relacionados (89%).

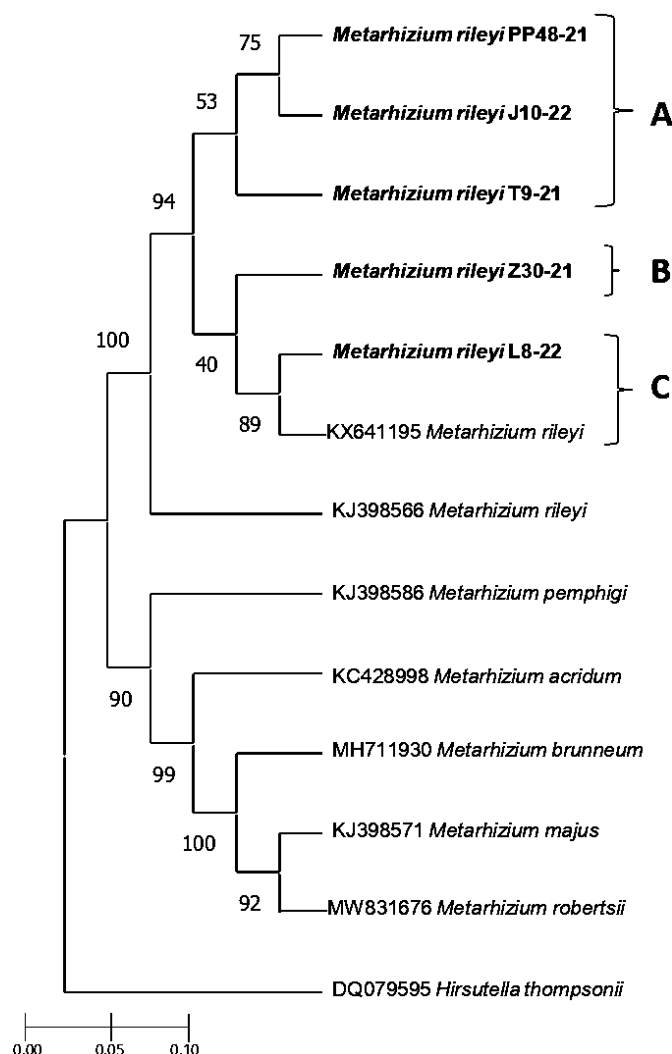


Figura 7. Árbol filogenético inferido con el método de vecino más cercano de 13 secuencias de β -tubulina de aislamientos de hongos entomopatógenos. Cinco secuencias de *M. rileyi* (aislamientos T9-21, Z30-21, PP48-21, J10-22 y L8-22) obtenidas de larvas de *S. frugiperda* en cinco localidades del norte del estado de Michoacán, México, se agruparon mediante el modelo de Tamura 3. La longitud de las ramas se presenta como el número de sustituciones de bases por sitio. Las secuencias de *M. rileyi* se agruparon en tres clados (A, B y C).

Los valores de CL₅₀ para las larvas de segundo instar de *S. frugiperda* no mostraron diferencias significativas entre los cinco aislamientos de *M. rileyi*, basado en la superposición de los intervalos de confianza del 95% (Tabla 3). Los valores de CL₅₀ variaron de 2.04×10^5 a 1.05×10^6 conidios/mL. A una concentración de 1.0×10^8 conidios/mL, los aislamientos T9-21, J10-22 y L8-22 fueron los más virulentos, con valores de TL₅₀ de 7.40, 7.04 y 7.5 d, respectivamente, y no se observaron diferencias significativas entre ellos (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones letales medias y tiempos letales medios de *Metarhizium rileyi* en larvas de segundo instar de *Spodoptera frugiperda* inoculadas con cinco aislamientos diferentes.

Aislamientos	Días Pos- inoculación	Pendiente $\pm$ EEM	CL ₅₀ (conidio mL ⁻¹)	Límites inferiores- superiores	χ^2 ^a	TL ₅₀ (días post- inoculación)	Límites inferiores- superiores
T9-21	13	0.61 ± 0.07	1.05×10^6	$1.9 \times 10^5 - 3.49 \times 10^6$	4.05	7.40	7.01-7.76
Z30-21	13	0.41 ± 0.05	2.15×10^5	$5.9 \times 10^4 - 7.3 \times 10^5$	3.94	9.46	9.04-9.90
PP48-21	13	0.48 ± 0.06	4.18×10^5	$1.3 \times 10^5 - 2.7 \times 10^6$	4.87	9.65	9.30-10.0
J10-22	12	0.56 ± 0.06	2.04×10^5	$7.7 \times 10^4 - 4.2 \times 10^5$	2.20	7.04	6.59-7.47
L8-22	10	0.39 ± 0.05	7.85×10^5	$2.5 \times 10^5 - 1.8 \times 10^6$	2.36	7.49	7.04-7.92

El análisis de supervivencia de Gehan–Breslow y Kaplan–Meier reveló diferencias significativas entre los aislamientos de *M. rileyi* (prueba log-rank, $\chi^2 = 76.04$, $p < 0.0001$, Figura 8). Los aislamientos T9-21, J10-22 y L8-22 causaron menor supervivencia que los demás aislamientos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre el aislamiento L8-22 y PP48-21 (Figura 8).

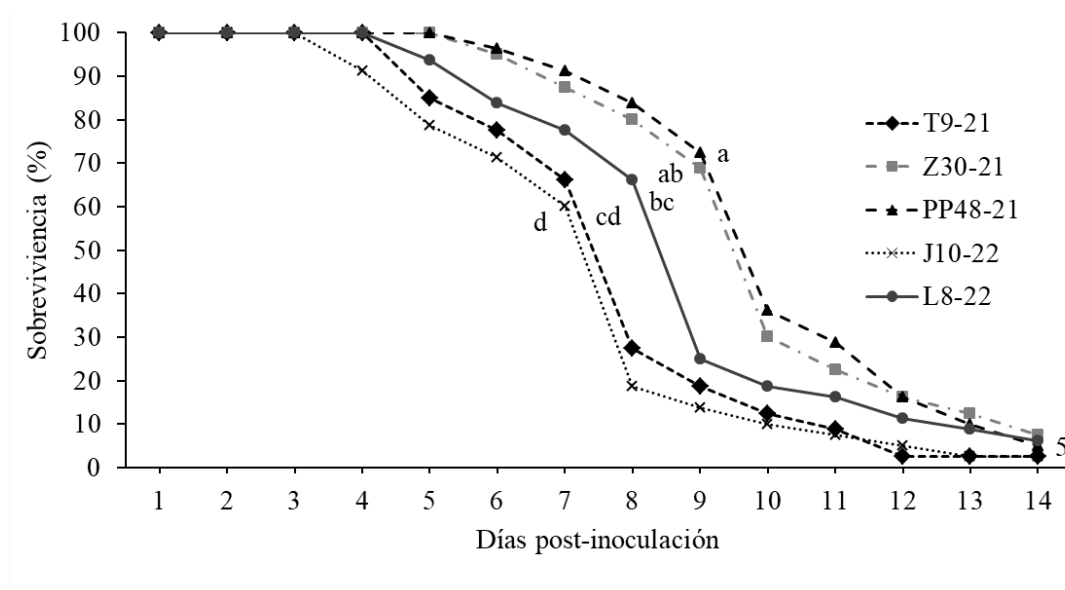


Figura 8. Curvas de supervivencia de Gehan–Breslow y Kaplan–Meier de larvas de segundo instar de *S. frugiperda* después de la inoculación con una concentración de 1.0×10^8 conidios/mL de cinco aislamientos de *M. rileyi* bajo condiciones de laboratorio. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los aislamientos (prueba log-rank, $p < 0.05$).

DISCUSIÓN

Varios estudios han informado que las larvas de *S. frugiperda* pueden ser naturalmente infectadas por *M. rileyi*, lo que sugiere que este hongo entomopatógeno podría ser un factor importante en la regulación de las poblaciones de este insecto plaga (Bosa *et al.*, 2004; Visalakshi *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2023). Además, se ha reportado una alta incidencia de epizootias causadas por *M. rileyi* sobre diferentes estadios larvales de este insecto en cultivos de maíz (Bosa *et al.*, 2004). En México, se han registrado porcentajes variables de infección natural de este hongo en *S. frugiperda* en varios estados de México, con valores de 8.6% en Chihuahua (Ordóñez-García *et al.*, 2015), 16% en Coahuila (Ríos-Velasco *et al.*, 2011), 8.9% en Nayarit (Estrada-Virgen *et al.*, 2013), 0.3–17% en Jalisco, 3.5–7.5% en Colima, 0.9–8% en Michoacán (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2001) y 3.05% en Chiapas (Ruíz-Nájera *et al.*, 2013).

En nuestro estudio, la prevalencia de infecciones por *M. rileyi* en *S. frugiperda* en campos de maíz fue más alta en todos los sitios de recolección (rango de 23% a 90%) en comparación con los estudios previos. Sin embargo, nuestros hallazgos son consistentes con las infecciones

naturales observadas fuera de América. Por ejemplo, Visalakshi *et al.* (2020) observaron micosis en un rango de 5.6% a 38% en larvas de *S. frugiperda* en maíz y otros cultivos en India. Ginting *et al.* (2020) reportaron una incidencia del 79% de este hongo sobre este mismo insecto plaga en Indonesia. En contraste, recientemente se reportó que las frecuencias de infección fúngica de *M. rileyi* en larvas de *S. frugiperda* en cultivos de maíz en China fueron muy bajas (0.32%), con solo dos larvas infectadas, una por *B. bassiana* y otra por *M. rileyi* (Sun *et al.*, 2023). Esta baja prevalencia de infección se atribuyó a la reciente invasión de este insecto en ese país. En general, las diferencias en los porcentajes de infección natural pueden deberse a diversos factores, como el número de larvas recolectadas, las condiciones de incubación en laboratorio y las variaciones en la susceptibilidad del insecto hospedador (Zhang *et al.*, 2022; Pang *et al.*, 2023). Además, en condiciones de campo, la alta humedad, precipitaciones y las temperaturas cálidas fueron factores muy favorables para el desarrollo y prevalencia del hongo en India (Visalakshi *et al.*, 2020).

Previos estudios han demostrado una alta prevalencia y diversidad de hongos entomopatógenos en poblaciones mexicanas de *S. frugiperda* (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2001; Ríos-Velasco *et al.*, 2011; Estrada-Virgen *et al.* 2013; Ordóñez-García *et al.*, 2015). Sin embargo, en nuestro estudio, *M. rileyi* fue la única especie de hongo entomopatógeno aislada a partir de larvas de este insecto recolectadas en cultivos de maíz a lo largo de los sitios muestreados. De manera similar, en otros estudios, este hongo ha sido el más abundante o el único que infecta larvas de *S. frugiperda* (por ejemplo, en Michoacán, Colima, Jalisco, Tamaulipas y Chiapas (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2001; Ruíz-Nájera *et al.*, 2013). Esto podría indicar una alta adaptabilidad y prevalencia de *M. rileyi* sobre este hospedero en condiciones ambientales específicas. No obstante, no se descarta la presencia de otras especies de hongos entomopatógenos establecidas en los campos de maíz del estado de Michoacán, como fue reportado por Lezama-Gutiérrez *et al.* (2001) en larvas de *S. frugiperda* y por Huerta-Ramírez *et al.* (2018) en muestras de suelo.

Aunque la mayoría de los estudios mencionados no incluyen datos ambientales de campo, estos se han realizado durante la temporada de lluvias, lo cual coincide con el periodo de muestreo de nuestro estudio. Sin embargo, en concordancia con Fronza *et al.* (2017), la escasez de estudios de campo que incluyan información detallada sobre la adaptabilidad de diferentes aislamientos de *M. rileyi* en diversas condiciones ambientales representa un aspecto que debe ser aún atendido.

Un paso importante para el desarrollo de un bioinsecticida fúngico consiste en la selección de aislamientos patogénicos y virulentos (Pang *et al.*, 2023). Además, la selección de un patógeno como agente de control biológico requiere que los aislamientos sean evaluados frente a una población del insecto proveniente de la localidad donde se implementará el programa (Cottrell y Shapiro-Ilan, 2008). En nuestro estudio, 23 de los 24 aislamientos de *M. rileyi*, recolectados en campo y evaluados en condiciones de laboratorio, causaron altas tasas de mortalidad larval (entre 80% y 98.7%), estos resultados son similares a los obtenidos en estudios realizados en Colombia (Bosa *et al.*, 2004), India (Visalakshi *et al.*, 2020) y China (Zhang *et al.*, 2022; Pang *et al.*, 2023).

En el presente estudio, se observó una correlación positiva entre la mortalidad y la proporción de cadáveres que presentaron esporulación a los 15 d después de la inoculación. De manera similar, Visalakshi *et al.* (2020) observaron que todas las larvas de *S. frugiperda* que murieron debido a un aislamiento indio de *M. rileyi* presentaron esporulación. Sin embargo, en otros sistemas hospedero-hongo entomopatígeno, la proporción de cadáveres con esporulación fue baja en relación con la mortalidad del hospedero (por ejemplo, *Beauveria bassiana* vs. *Helicoverpa armigera* Hübner (Nguyen *et al.*, 2007) y *B. bassiana* vs. *Diaphorina citri* Kuwayama (Ausique *et al.*, 2017). La emergencia y esporulación de hongos entomopatógenos sobre los cadáveres constituye una fuente clave para la transmisión de esporas hacia hospederos susceptibles, lo que contribuye al desempeño general del control microbiano en los cultivos (Ausique *et al.*, 2017).

Las especies del género *Metarhizium* presentan una importante variación genotípica, e incluso, los aislamientos de una misma especie muestran variabilidad genética, potencialmente relacionada con su adaptación a diferentes hábitats (Couceiro *et al.*, 2022). *Metarhizium rileyi* ha sido ampliamente estudiado mediante la amplificación de diferentes genes, incluidos el factor de elongación 1- α (Wang *et al.*, 2022), ITS (Pang *et al.*, 2023) y β -*tubulina* (Kepler *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2021), entre otros. El gen de la β -*tubulina* puede utilizarse para determinar relaciones evolutivas entre secuencias de hongos pertenecientes al orden Hypocreales (Kepler *et al.*, 2014) y también en hongos basidiomicetos (Begerow *et al.*, 2004), entre otros. En este estudio, el análisis filogenético basado en este gen mostró que las secuencias de *M. rileyi* formaron un grupo distintivo dentro de las distintas secuencias de *Metarhizium* analizadas. Esto concuerda con un estudio detallado realizado por Kepler *et al.* (2014), donde dos secuencias de *M. rileyi* formaron un grupo diferenciado respecto a 56

secuencias de *Metarhizium*, mediante el uso de los genes β -tubulina, RPB1, RPB2 y TEF, en un análisis filogenético de máxima verosimilitud basado en un conjunto concatenado de datos.

La identificación molecular basada en el gen β -tubulina demostró que los cinco aislamientos correspondieron a esta especie, previamente identificada mediante características morfológicas. El análisis filogenético mostró que los cinco aislamientos mexicanos se relacionaron estrechamente (99% y 98%) con el aislamiento KX641195, obtenido de *Spodoptera depravata* (Butler) y con el aislamiento KJ398566, aislado de larvas de lepidópteros en Brasil (Kepler *et al.*, 2014), respectivamente. La agrupación de tres de los cinco aislamientos de *M. rileyi* (PP48-21, J10-22 y T9-21) sugiere que éstos podrían haber evolucionado a partir de un mismo nicho ecológico, lo cual coincide con su proximidad geográfica. En contraste, los aislamientos recolectados a mayores distancias geográficas (L8-22 y Z30-21) se agruparon en dos clados diferentes. En este sentido, se requieren estudios futuros que respalden estos resultados mediante el uso de genes codificantes de proteínas alternativos (por ejemplo, RPB1, RPB2 y TEF), como se describe en Kepler *et al.* (2014) para resolver las relaciones filogenéticas entre los aislamientos mexicanos de *M. rileyi*. De manera similar, se necesitan métodos moleculares como la amplificación del gen del factor de elongación 1- α , los microsatélites (ISSR) y el polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) para determinar las especies de *Metarhizium*, su diversidad genética y la estructura poblacional, en función de su distribución geográfica. Boucias *et al.* (2000) determinaron que dos aislamientos de *M. rileyi* obtenidos de larvas de *S. frugiperda* recolectadas en una misma localidad en Brasil se asociaron con clados diferentes. En contraste, un análisis genético con secuencias ITS mostró que un aislamiento cubano de *N. rileyi* estaba estrechamente relacionado con un aislamiento recolectado en China. Estas diferencias o similitudes genéticas entre aislamientos de *M. rileyi*, independientemente de la región o del hospedante del cual fueron obtenidos, se relacionan con el alto grado de polimorfismo de este patógeno (Devi *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2016).

Por otro lado, la patogenicidad de *M. rileyi* es una característica multifacética que depende de factores genéticos y biológicos (Wang *et al.*, 2021). Las diferencias genéticas observadas entre los cinco aislamientos de *M. rileyi* en este estudio no siempre se reflejaron en diferencias en su patogenicidad, ya que no se observaron diferencias significativas entre sus valores de CL₅₀. En contraste, los aislamientos T9-21, J10-22 y L8-22 fueron los más rápidos

en causar la muerte al provocar menores tasas de supervivencia. Estos resultados coinciden parcialmente con los obtenidos por Pang *et al.* (2023), quienes reportaron que la patogenicidad y la velocidad de acción de dos aislamientos genéticamente similares de *M. rileyi* (XSBN200920 y HN-QLZ200714), recolectados de larvas de *S. frugiperda* en cultivos de maíz en diferentes localidades de China, variaron significativamente en larvas de tercer y quinto estadio. Además, estos autores relacionaron la actividad biológica del aislamiento más patógeno (XSBN200920) con su alto potencial antioxidante y su mayor tasa de crecimiento. Aún se requieren estudios para identificar los factores asociados con la actividad insecticida de los aislamientos mexicanos de *M. rileyi* estudiados, particularmente aquellos relacionados con la velocidad de acción.

Algunos de los valores de CL₅₀ obtenidos en el presente estudio fueron similares a los determinados en otros estudios realizados en Colombia mediante el método de aspersión sobre plantas infestadas con larvas de segundo estadio de *S. frugiperda* (concentraciones entre 9.8×10^3 y 2.2×10^5 conidios/mL, Bosa *et al.*, 2004). Una concentración de 1×10^6 ó 1×10^7 conidios/mL de dos aislamientos de *M. rileyi* procedentes de China causó una mortalidad del 50% en larvas de tercer estadio de la misma especie estudiada (Bosa *et al.*, 2004; Pang *et al.*, 2023). De manera similar, se han reportado valores de TL₅₀ de 5–7 d (Bosa *et al.*, 2004) y de 12 d (Zhang *et al.*, 2022) para aislamientos procedentes de Colombia y China, respectivamente, en larvas de segundo estadio de *S. frugiperda*.

En general, varios factores pueden influir en la susceptibilidad de los insectos a la infección por hongos entomopatógenos, incluyendo el estadio de desarrollo del hospedero (Nguyen *et al.*, 2007), la esclerotización de la cutícula y el sistema inmune del insecto (Wang *et al.*, 2022). Además, la expresión de una diversidad de enzimas es crucial en el proceso de penetración del hongo, tales como proteasas, quitinasas, actinas e hidrofobinas, así como genes como *mad1* y *mad2*, que codifican adhesinas (Zhang *et al.*, 2011). En este sentido, la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo, como *SOD* y *CAT* y enzimas antioxidantes fueron identificados como factores clave responsables de la variación en virulencia entre dos aislamientos de *M. rileyi* recolectados en China (Pang *et al.*, 2023). Por su parte, Cruz-Ávalos *et al.* (2018) también identificaron los genes de virulencia *mad1* y *mad2* en *M. anisopliae*, así como los genes *hyd1* y *hyd2* en *B. bassiana* aislados de muestras de suelo de campos de cultivo de maíz. Sin embargo, no se observó una correlación entre la presencia de genes de virulencia y la actividad biológica.

Aunque se detectó una alta actividad insecticida en los cinco aislamientos mexicanos de *M. rileyi* estudiados, se requieren más investigaciones para identificar los factores asociados con esta actividad biológica y determinar cuáles de estos factores son los más importantes durante el proceso de infección, en particular aquellos relacionados con la velocidad de acción.

CONCLUSIONES

Nuestro estudio proporciona información valiosa sobre la filogenia y la patogenicidad de cinco aislamientos mexicanos de *M. rileyi* en larvas de segundo estadio de *S. frugiperda*. Los aislamientos mexicanos fueron identificados morfológicamente como *M. rileyi* y genéticamente relacionados con otros aislamientos de esta especie fúngica. Aunque todos los aislamientos mexicanos presentaron una patogenicidad similar, los aislamientos T9-21, J10-22 y L8-22 se destacaron como los candidatos más prometedores para su uso como insecticidas biológicos, ya que fueron los más virulentos. Se requieren estudios adicionales para determinar la diversidad genética de estos aislamientos y los factores asociados a su virulencia.

Tabla 4 Suplementaria. Germinación de conidios de 89 aislamientos de *M. rileyi* colectados de larvas de *S. frugiperda* en campos de maíz del norte del estado de Michoacán.

Aislamientos	Germinación de conidios (% $\pm$ ES)
J1-22	71.3 $\pm$ 1.3
J10-22	98.5 $\pm$ 0.3
J11-22	67.8 $\pm$ 2.7
J2-22	44.0 $\pm$ 3.7
J3-22	8.0 $\pm$ 2.7
J4-22	61.5 $\pm$ 1.6
J5-22	98.0 $\pm$ 0.4
J6-22	95.5 $\pm$ 0.3
J7-22	82.3 $\pm$ 1.3
J9-22	96.5 $\pm$ 0.3
L11-22	97.3 $\pm$ 0.5
L12-22	96.0 $\pm$ 0.4
L18-22	65.5 $\pm$ 2.1
L20-22	61.0 $\pm$ 3.7
L21-22	86.3 $\pm$ 2.3
L22-22	80.3 $\pm$ 1.7
L23-22	69.8 $\pm$ 2.7
L24-22	77.8 $\pm$ 3.1
L25-22	49.3 $\pm$ 1.7
L4-22	81.8 $\pm$ 1.2
L8-22	98.5 $\pm$ 0.3
L9-22	97.3 $\pm$ 0.3
P70-21	15.3 $\pm$ 3.7
P73-21	2.5 $\pm$ 1.4
P74-21	75.8 $\pm$ 5.3
P75-21	68.8 $\pm$ 1.3
P77-21	3.3 $\pm$ 2.6
P78-21	50.0 $\pm$ 1.2
PP1-21	97.3 $\pm$ 1.1
PP12-21	97.0 $\pm$ 0.4
PP15-21	36.3 $\pm$ 2.4
PP18-21	97.3 $\pm$ 0.6
PP23-21	68.3 $\pm$ 1.4
PP29-21	51.8 $\pm$ 1.2
PP35-21	60.8 $\pm$ 2.7
PP40-21	80.0 $\pm$ 2.0
PP42-21	73.8 $\pm$ 2.4
PP48-21	98.0 $\pm$ 0.4
PP5-21	82.0 $\pm$ 1.1
PP53-21	30.0 $\pm$ 2.0
PP56-21	65.8 $\pm$ 3.3
PP60-21	66.3 $\pm$ 6.3
PP63-21	14.5 $\pm$ 5.4
PP66-21	13.8 $\pm$ 8.0
PP7-21	74.3 $\pm$ 1.9

T1-21	96.0± 0.4
T110-21	45.0± 2.0
T119-21	81.3 ± 1.3
T12-21	54.3 ± 7.1
T15-21	29.3 ± 3.9
T19-21	79.3± 1.5
T2-21	97.0± 0.4
T22-21	49.0± 3.3
T23-21	77.0± 1.8
T25-21	34.3 ± 1.5
T28-21	75.8 ± 3.4
T31-21	78.8 ±1.3
T35-21	60.8 ±2.2
T42-21	37.0±2.1
T46-21	49.5± 4.2
T48-21	82.5± 1.4
T5-21	95.8± 0.3
T50-21	51.8 ± 4.3
T52-21	80.5 ± 2.1
T6-21	80.8 ± 2.5
T60-21	58.8 ± 3.1
T64-21	82.5±1.4
T69-21	95.8± 0.5
T70-21	96.5± 0.3
T71-21	44.5 ± 2.1
T72-21	98.3 ± 0.8
T8-21	96.5 ± 0.6
T80-21	80.0 ±2.0
T88-21	38.8 ± 1.3
T9-21	98.5 ± 0.3
T95-21	66.3 ± 2.4
Z10-21	66.8 ± 2.0
Z14-21	48.0 ± 2.0
Z18-21	61.0 ±6.7
Z2-21	96.8 ±0.8
Z21-21	76.3 ± 2.4
Z26-21	8.0 ± 4.9
Z30-21	98.0 ± 0.4
Z32-21	96.8 ± 0.8
Z33-21	96.5 ± 0.3
Z37-21	4.5 ± 2.6
Z40-21	5.0 ± 1.8
Z41-21	62.0 ± 5.8
Z43-21	71.8 ± 4.2

En negrita, los 24 aislamientos que se evaluaron contra *S. frugiperda* a una concentración de 1×10^8 conidios/mL.

VII. CONTROL BIOLÓGICO DE LARVAS DE GUSANO COGOLLERO MEDIANTE AISLAMIENTOS DE *Metarhizium rileyi* BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO Y PEQUEÑA ESCALA DE CAMPO EN MAÍZ

RESUMEN

En este estudio, se evaluó la eficacia de dos aislamientos mexicanos de *Metarhizium rileyi* (T9-21 y L8-22) en contra *Spodoptera frugiperda* bajo condiciones de invernadero. Para ello, una suspensión (1×10^8 conidios/mL) de estos aislamientos se asperjó sobre plantas de maíz previamente infestadas con seis larvas de segundo instar. No se observaron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de los aislamientos T9-21 y L8-22. La esporulación en los cadáveres fue significativamente mayor y el tiempo letal medio significativamente menor en el aislamiento T9-21, en comparación con L8-22 (97% y 8 días vs. 70% y 10 días, respectivamente). Con base en estos resultados, se realizó una prueba de campo a pequeña escala en un cultivo de maíz para evaluar el grado de control de la plaga alcanzado por el aislamiento T9-21 y compararlo con el insecticida spinetoram, los cuales se aplicaron a una dosis de 1×10^{13} conidios/ha y 75 mL/ha, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en la proporción de mortalidad de larvas entre el aislamiento T9-21 (0.49) y spinetoram (0.72). Sin embargo, spinetoram redujo significativamente las poblaciones de enemigos naturales e insectos fitófagos, en comparación con el hongo y el tratamiento testigo. En conclusión, el aislamiento T9-21 de *M. rileyi* podría ser una alternativa prometedora para el control de larvas de *S. frugiperda*.

INTRODUCCIÓN

El gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), una especie originaria de las regiones tropicales y subtropicales de las Américas es considerada la plaga de mayor importancia económica del maíz (*Zea mays* L.) a nivel mundial (FAO, 2022). Este insecto prefiere alimentarse de esta especie de la familia Poaceae; sin embargo, debido a su comportamiento altamente polífago, también puede alimentarse de más de 350 especies pertenecientes a 42 familias de plantas (Abbas *et al.*, 2022). En el de maíz, las larvas de *S. frugiperda* se alimentan del cogollo de la planta, las espigas y las mazorcas, causando pérdidas de hasta el 60 % de este cereal (Bedasa y Degaga, 2025). Además, los daños causados por las larvas de este insecto son más graves conforme aumenta su edad (Liu *et al.*, 2023).

El control químico mediante el uso de insecticidas de los grupos de neonicotinoides, organofosforados, carbamatos, piretroides, espinosinas y avermectinas es el método más práctico para el manejo de *S. frugiperda* en el campo (Nascimento *et al.*, 2023). Sin embargo, esta táctica de control tiene un impacto limitado debido a la capacidad del insecto de desarrollar resistencia (Lu *et al.*, 2024), el efecto negativo sobre las poblaciones de enemigos naturales en cultivos tratados frecuentemente y la aparición de plagas secundarias, entre otros factores (Panwar y Szczepaniec, 2024). Ante este escenario, se requieren alternativas efectivas y ambientalmente seguras para el control de *S. frugiperda*, las cuales deben incluirse en los programas de manejo integrado de plagas (MIP). Una táctica prometedora para el control de las larvas de esta plaga es el control biológico mediante el uso de hongos entomopatógenos, una herramienta altamente confiable que ha sido implementada con éxito contra muchas especies de plagas agrícolas (Rajput *et al.*, 2024).

Aunque los hongos entomopatógenos dependen de las condiciones ambientales para completar con éxito su ciclo infectivo y, por lo general, requieren más tiempo para eliminar a sus hospederos, una de sus ventajas más destacadas es su presencia natural en el ambiente (Rajput *et al.*, 2024). Esta característica les confiere una afinidad específica para infectar a los organismos plaga y minimizar el impacto sobre organismos no objetivo, lo cual les permite adaptarse y coevolucionar con las poblaciones hospedantes. En consecuencia, se reduce el riesgo de que sus hospederos desarrollen resistencia (Naranjo-Ortiz y Gabaldón, 2019). A diferencia de otros microorganismos utilizados en el control biológico, los hongos entomopatógenos no necesitan ser ingeridos debido a que ejercen su acción por contacto. Pueden permanecer en el suelo durante el invierno e infectar a la nueva generación de insectos huéspedes (Wanjiru y Sunday, 2019). Además, poseen la capacidad de establecerse como endófitos en las plantas, lo que proporciona protección contra la herbivoría por parte de insectos plaga (Wallis y Sisterson, 2024). Asimismo, su mínimo potencial de generar efectos negativos en el medio ambiente, los cultivos o la salud humana, les convierte en una alternativa sostenible y ecológicamente viable para el manejo de plagas (Yasin *et al.*, 2019).

El hongo entomopatógeno *Metarhizium rileyi* (Farlow) Kepler S.A. Rehner & Humber (Ascomycetes: Hypocreales) fue previamente descrito como *Botrytis rileyi* (Farlow), *Spicaria rileyi* (Farlow) Charles y *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson (Dev *et al.*, 2021). Sin embargo, estudios morfológicos y filogenéticos realizados por Kepler *et al.* (2014) lo ubicaron dentro del género *Metarhizium*. *Metarhizium rileyi* está ampliamente distribuido y, como otras

especies del mismo género, habita comúnmente en el suelo (Peng *et al.*, 2024). Además, su rango de hospedadores se restringe principalmente a lepidópteros (Fronza *et al.*, 2017). Condiciones ambientales adecuadas, como una temperatura cercana a los 25°C y niveles de humedad relativa (HR) superiores al 75 %, son muy importantes para promover su ciclo completo de infección (Visalakshi *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2025). El proceso de infección de este hongo entomopatógeno inicia cuando sus conidios entran en contacto con la cutícula del insecto hospedero; en ese momento, secretan sustancias mucilaginosas y proteínas que permiten su adherencia (Xu *et al.*, 2025). Una vez que *M. rileyi* penetra en el hemocele larval, sus células se transforman en blastosporas, lo que permite su multiplicación dentro de la larva de *S. frugiperda*. Finalmente, tras la muerte de la larva hospedera, el micelio prolifera a través de todas las aberturas naturales del cuerpo y, posteriormente, se produce la formación de nuevos conidios infectivos (Wang *et al.*, 2021).

Metarhizium rileyi es altamente infectivo en varias especies de noctuidos bajo condiciones de laboratorio. Recientemente, se identificaron 24 aislamientos de este hongo, los cuales causaron alta mortalidad (70-99 %) en larvas de segundo instar de *S. frugiperda* a los 13 d post-inoculación (Ramos *et al.*, 2024). Otros aislamientos de este hongo también causaron mortalidades similares (70 -98 %) en diferentes estadios de este insecto cuando fueron tratados con diferentes métodos de inoculación a una concentración de 1×10^8 conidios/mL (Gu *et al.*, 2023; Pang *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2024). Otros estudios también han reportado la efectividad de este hongo contra *Spodoptera exigua* Hübner (Roy y Kim, 2021), *Spodoptera litura* Fabricius (Duraimurugan *et al.*, 2025), *Helicoverpa armigera* Hübner (Dev *et al.*, 2021) y *Helicoverpa zea* Boddie (Mejía *et al.*, 2024). Además, *M. rileyi* es capaz de infectar a varios coleópteros, entre ellos *Hypera punctata* (Fabricius), *Leptinotarsa decemlineata* (Say) y *Popillia japonica* Newman (Gu *et al.*, 2023). Sin embargo, la respuesta de las larvas de estos insectos a la infección causada por *M. rileyi* puede variar bajo condiciones no controladas. Estudios realizados en condiciones de invernadero y campo indicaron que el efecto de *M. rileyi* sobre las larvas de *S. frugiperda* puede prevalecer incluso cuando se expone a diferentes factores climáticos (Grijalba *et al.*, 2018; Faria *et al.*, 2021; Barros *et al.*, 2021). Además, los aislamientos nativos de hongos entomopatógenos pueden presentar una actividad biológica distinta en comparación con las cepas comerciales, en función de su origen geográfico y su adaptación al ambiente. Por esta razón, la selección de un aislamiento como agente de control biológico requiere la evaluación de aislamientos

nativos frente a una población de insectos proveniente de la misma zona en la que se implementará el programa (Johny *et al.*, 2012).

Con el fin de ampliar el conocimiento sobre *M. rileyi*, en este estudio investigamos: (i) la eficacia de dos aislamientos nativos de este hongo contra larvas de *S. frugiperda* en condiciones de invernadero y (ii) el impacto del aislamiento más efectivo de este hongo sobre las larvas de esta plaga, así como sobre otros insectos fitófagos y enemigos naturales en condiciones de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

A menos que se indique lo contrario, la germinación de conidios, microcultivos, cultivos polispóricos y monosporicos, así como los procesos de incubación de larvas, se realizaron a 25 ± 2 °C, $75 \pm 5\%$ humedad relativa, en completa oscuridad.

- Cría de insectos

Los especímenes utilizados en estos experimentos fueron obtenidos de una población de *S. frugiperda* mantenida en el laboratorio de Entomología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF), Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), México. Las larvas se criaron individualmente en una dieta artificial sin formaldehído (Poitout y Bues, 1974) en vasos de plástico de 30 mL. Los adultos se colocaron en bolsas de papel estraza ($18 \times 11 \times 40$ cm) y se alimentaron con una solución de miel al 15%. Las bolsas de papel se reemplazaron diariamente después del inicio de la puesta de huevos. La colonia se mantuvo en una cámara climática a 25 ± 2 °C, $65 \pm 5\%$ HR y un fotoperíodo de 16:8 h (luz: oscuridad).

- Aislamientos fúngicos

Se utilizaron dos aislamientos de *M. rileyi*, T9-21 y L8-22, obtenidos de larvas de *S. frugiperda* en El Trébol, Tarímbaro ($19^{\circ} 46' 12.50''$ N, $101^{\circ} 09' 17.67''$ W) y Lagunillas, Pátzcuaro ($19^{\circ} 36' 40.55''$ N, $101^{\circ} 25' 23.7''$ W), respectivamente, en el estado de Michoacán, México. Estos aislamientos, que pertenecen a la colección de Hongos Entomopatógenos del laboratorio de Patología de Insectos (IIAF, UMSNH), se conservan en glicerol a 4°C (hasta que los aislamientos fúngicos fueron utilizados en los experimentos posteriores) y fueron caracterizados molecular y biológicamente por Ramos *et al.* (2024).

Para reproducir los aislamientos T9-21 y L8-22, se realizaron cultivos polispóricos en medio de cultivo MPLA (maltosa 40 g L⁻¹, peptona de caseína 10 g L⁻¹, extracto de levadura 10 g L⁻¹ y agar 15 g L⁻¹). Estos aislamientos se utilizaron solo si la germinación de los conidios era $\geq 95\%$ (Falvo *et al.* 2016). Para esto, se realizaron microcultivos con conidios de 14 d de edad provenientes de los cultivos polispóricos, de acuerdo con la técnica descrita por Ramos *et al.* (2024). El número de conidios germinados se cuantificó a las 24 h después de la incubación y el porcentaje de germinación de conidios se calculó según Rombach (1989) a través de la siguiente fórmula: % de germinación de conidios = $(V/T) \times 100$, donde V es el número total de conidios viables y T es el número total de conidios viables y no viables en la muestra. Se consideró que los conidios estaban germinados cuando la longitud de su tubo germinativo era al menos dos veces la longitud de los conidios.

Se obtuvieron cultivos monospóricos a partir de los dos aislamientos de *M. rileyi* de acuerdo al procedimiento descrito por Goettel e Inglis (2012), con la excepción de que los conidios se incubaron a 25 °C en lugar de 28 °C. Posteriormente, los conidios (de 20 d de edad) de cada cultivo monospórico se obtuvieron raspándolos en 100 mL de agua destilada estéril con 0.05% de Tween® 80 y se mezclaron durante 1 minuto con el uso de un vórtex. Para lograr la concentración deseada de los aislamientos para los ensayos, se realizó el conteo de conidios en una cámara de Neubauer (Hausser, EE. UU.).

- Experimento en condiciones de invernadero

Las semillas de maíz (variedad híbrida Cb-hs-55®, Bayer, México) se pregerminaron en una charola forrada con papel toalla humedecido con agua destilada estéril. Siete días después, se sembraron dos semillas pre-germinadas en bolsas de polietileno (15 cm de diámetro $\times$ 30 cm de altura) que contenían una mezcla de suelo rico en humus y arena (3:1). Las plantas de maíz, se cultivaron en un invernadero cubierto con polietileno y malla antiáfidos y se regaron tres veces por semana con 150 mL de agua ajustada a pH neutro. Este indicador se midió a través de un potenciómetro de laboratorio (Ohaus, Aquasearcher AB23PH, EE. UU.). Cada planta se fertilizó una vez por semana con tres gramos de fertilizante granulado que contenía nitrógeno, fósforo y potasio (17-17-17).

Las plantas de maíz se cultivaron hasta alcanzar el estadio de crecimiento V6 (~50 cm de altura) (Ritchie *et al.*, 1993). Las plantas se sometieron a uno de los siguientes tratamientos: i) aislamiento T9-21 de *M. rileyi*, ii) aislamiento L8-22 de *M. rileyi*, y iii) testigo con agua. Los

tratamientos se asignaron aleatoriamente y se establecieron cinco repeticiones por tratamiento (una planta por repetición) (Gómez-García *et al.*, 2020). Ambos aislamientos de *M. rileyi* se aplicaron a una concentración de 1×10^8 conidios/mL. Previamente, las plantas se infestaron con seis larvas de *S. frugiperda* recién mudadas de segundo instar, las cuales se colocaron en el cogollo de la planta con la ayuda de un pincel fino. Estas larvas se seleccionaron al azar a partir de diferentes lotes de cría establecida en el laboratorio. Dos horas después de la infestación, se aplicó a cada planta una suspensión de 5 mL del respectivo aislamiento fúngico mediante un atomizador manual. Cada repetición recibió una suspensión nueva del hongo. Para favorecer la adherencia de los tratamientos sobre las hojas, se utilizó Tween 80 al 0.05 %. Las plantas del tratamiento testigo se asperjaron solamente con Tween 80 al 0.05 % disuelto en agua destilada.

Después del tratamiento, las plantas de maíz se cubrieron con una malla para insectos (200 μ m) para confinar a las larvas de *S. frugiperda*. Dos días después, las plantas se trasladaron al laboratorio para la recuperación de estas. Las larvas recuperadas se colocaron individualmente en vasos plásticos (30 mL) que contenían un papel filtro humedecido con agua destilada estéril y una sección (~ 1 cm²) de dieta semisintética para su alimentación. Las larvas se incubaron y se observaron cada 24 h hasta su muerte. Para promover la esporulación, las larvas muertas se colocaron individualmente en placas de cultivo celular de 24 pocillos, las cuales contenían papel filtro con 500 μ L de agua destilada estéril. Luego se registró la proporción de cadáveres que presentaron esporulación. Además, se determinó el tiempo letal medio (LT₅₀) utilizando los datos de mortalidad en función del tiempo.

- Experimento en condiciones de campo a pequeña escala

Para este experimento, se seleccionó el aislamiento T9-21 de *M. rileyi* debido a su alta tasa de esporulación y bajo TL₅₀ sobre larvas de *S. frugiperda* obtenidos en el bioensayo de invernadero, como se detalla en los Resultados. El estudio se llevó a cabo en un cultivo de maíz de la variedad mencionada anteriormente, ubicado en el campus La Posta, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UMSNH (Tarímbaro, Michoacán, México; 19° 46'5.5776'' N, 101° 09'1.7028'' W) a 1860 m.s.n.m (www.inegi.mx). El área utilizada para este experimento se destina exclusivamente a la producción de maíz y no se intercala, ni está adyacente a otros cultivos.

Se establecieron parcelas experimentales de 10 m², separadas entre sí por 1.30 m. Cada parcela consistió en seis hileras, espaciadas cada 0.8 m, con aproximadamente 33 plantas de maíz. Cuando las plantas alcanzaron el estadio de crecimiento V6 (Ritchie *et al.*, 1993), las parcelas se sometieron a uno de los siguientes tratamientos: i) aislamiento T9-21 de *M. rileyi* a 1×10^{13} conidios/ha, (2) spinetoram (PalgusTM, Corteva, Ciudad de México, México), a la dosis recomendada en la etiqueta del producto de 75 mL/ha, y (3) testigo con agua. El spinetoram es una mezcla de las espinosinas J y L producida durante la fermentación del actinomiceto del suelo *Saccharopolyspora spinosa* (Sparks *et al.* 1998). Los tratamientos se asignaron aleatoriamente a las parcelas, con cinco repeticiones por tratamiento. En todas las parcelas experimentales, cada planta de maíz se infestó con tres larvas de *S. frugiperda* de segundo estadio a las 8:00 AM. Se evitó el uso de las hileras externas. Posteriormente, se aplicaron los tratamientos en un volumen equivalente a 27 mL por planta, dirigidos al cogollo, utilizando una mochila manual de 15 L (Modelo 189030, LoLasafe, Ciudad de México, México) equipada con una boquilla de cono completo calibrada para liberar 9 mL de solución por segundo. Todos los tratamientos se prepararon con el adherente agrícola Inex-A® (Cosmocel, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México) a una tasa de 1 mL L⁻¹. La aplicación de los tratamientos se realizó a las 6:00 PM para evitar la radiación solar intensa y aumentar el tiempo de contacto del inóculo con las larvas. El porcentaje de germinación de conidios, la dilución, el conteo de conidios y el ajuste de concentración del aislamiento T9-21 de *M. rileyi*, así como la medición del pH del agua, se realizaron como se describió anteriormente.

Antes de la aplicación de los tratamientos (considerado como el día 0) y a los 2, 4 y 6 d posteriores a la aplicación, se seleccionaron aleatoriamente 10 plantas por parcela y se examinaron cuidadosamente. Posteriormente, se registró el número de larvas de *S. frugiperda* y otros artrópodos (fitófagos y enemigos naturales) observados en cada planta. Las larvas presentes en cada planta de maíz en todos los momentos de muestreo, excepto en el día 0, se recolectaron y colocaron en vasos plásticos de 30 mL. Las plantas de muestreo se marcaron para evitar ser revisadas en observaciones posteriores. y trasladadas al laboratorio.

Las larvas recuperadas se trasladaron al laboratorio en donde se alimentaron con dieta semisintética y se incubaron en una cámara climática. Para promover la proliferación de cualquier hongo, se colocó papel filtro humedecido con agua destilada en el fondo de los vasos plásticos. Las larvas se observaron cada 24 h para determinar su mortalidad o la

emergencia de parasitoides bajo cualquiera de los tratamientos aplicados. La temperatura y la humedad relativa (HR) se registraron utilizando una data logger Hobo (Onset UX100-003, EE. UU.), el cual se colocó entre las plantas de maíz sobre una caja de madera de 30 cm de altura.

- **Análisis estadísticos**

Se utilizó un análisis de supervivencia Gehan-Breslow y Kaplan-Meier y el procedimiento no paramétrico LIFETEST para comparar los efectos de los dos aislamientos fúngicos sobre la supervivencia de larvas de *S. frugiperda* en el experimento de invernadero. Para detectar diferencias significativas entre tratamientos se aplicó un procedimiento de comparaciones múltiples por pares (prueba de rango logarítmico, $p < 0.05$). Para la comparación de las tasas de esporulación entre los aislamientos fúngicos, se utilizó un modelo lineal generalizado (PROC GLM) con distribución binomial. La separación de medias se realizó mediante la prueba LSMEANS ($p < 0.05$) (SAS/STAT®, versión 8.1, SAS Institute, Gary, NC, EE. UU.). Los valores de TL_{50} se calcularon utilizando el software Polo Plus© (2002-2003, LeOra Software), y se realizaron pruebas de bondad de ajuste χ^2 para cada aislamiento. Las diferencias entre los valores de TL_{50} de los aislamientos se determinaron en función de la no superposición de los intervalos de confianza al 95%.

Para el ensayo de campo, se realizó un análisis considerando tratamientos, parcelas y tiempos de colecta. Se aplicó un modelo lineal generalizado (GLM) con distribución binomial y la separación de medias se efectuó mediante la prueba de Tukey HSD. También se realizó un análisis de biplot canónico para determinar las diferencias en las proporciones de enemigos naturales e insectos fitófagos entre tratamientos, seguido de un análisis multivariado de varianza (MANOVA). Además, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para analizar el número promedio de enemigos naturales e insectos fitófagos. Los factores ‘tratamiento’ y ‘tiempo de colecta’ se incluyeron en cada diseño para evaluar los efectos significativos de los factores individuales y sus posibles interacciones. La comparación entre tratamientos o factores también se realizó mediante la prueba de Tukey HSD. Todos los análisis del experimento a pequeña escala en campo se realizaron utilizando el programa R, versión 4.4.2 (www.r-project.org), con un nivel de significancia de 0.05.

RESULTADOS

- Experimento de invernadero

A una concentración de 1×10^8 conidios/mL, los aislamientos T9-21 y L8-22 de *M. rileyi* resultaron en un 13.33% y 23.33% de supervivencia larval a los 12 d post-aplicación, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de estos dos aislamientos, pero ambos fueron significativamente diferentes en comparación con el testigo (prueba Log-rank, $\chi^2 = 50.23$, $p < 0.0001$; Figura 9).

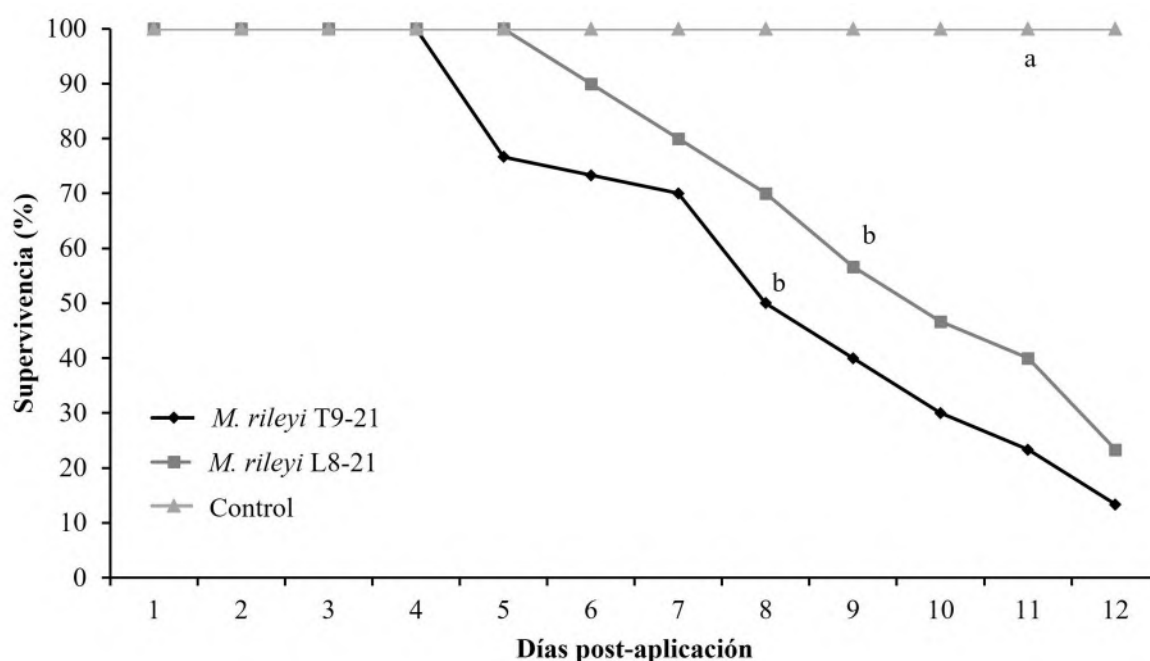


Figura 9. Curvas de supervivencia de Gehan Breslow y Kaplan-Meier de larvas de segundo estadio de *S. frugiperda* tras la aplicación de una concentración de 1×10^8 conidios/mL de dos aislamientos de *M. rileyi* bajo condiciones de invernadero.

La proporción de cadáveres que presentaron esporulación fue significativamente mayor ($F = 67.61$; $gl = 2$; $p < 0.001$) en el aislamiento T9-21 ($97 \pm 0.05\%$) en comparación con el aislamiento L8-22 ($70 \pm 0.06\%$). El valor de TL_{50} para el aislamiento T9-21 fue significativamente menor (8.17 d, límites inferior-superior de 7.50-8.50) que el obtenido para el aislamiento L8-22 (9.79 d, límites de 9.20-10.50). El tratamiento control no causó mortalidad larval.

- Experimento de campo a pequeña escala

La proporción de mortalidad causada por spinetoram (0.72 ± 0.07) y por el aislamiento T9-21 de *M. rileyi* (0.49 ± 0.068) fue significativamente mayor ($\chi^2 = 46.77$, gl = 2, $p < 0.0001$) que la observada en el control (0.07 ± 0.03 ; Figura 10). La mortalidad larval no fue significativamente influenciada por el tiempo (días post-aplicación) ($\chi^2 = 0.39$, gl = 2, $p = 0.98$).

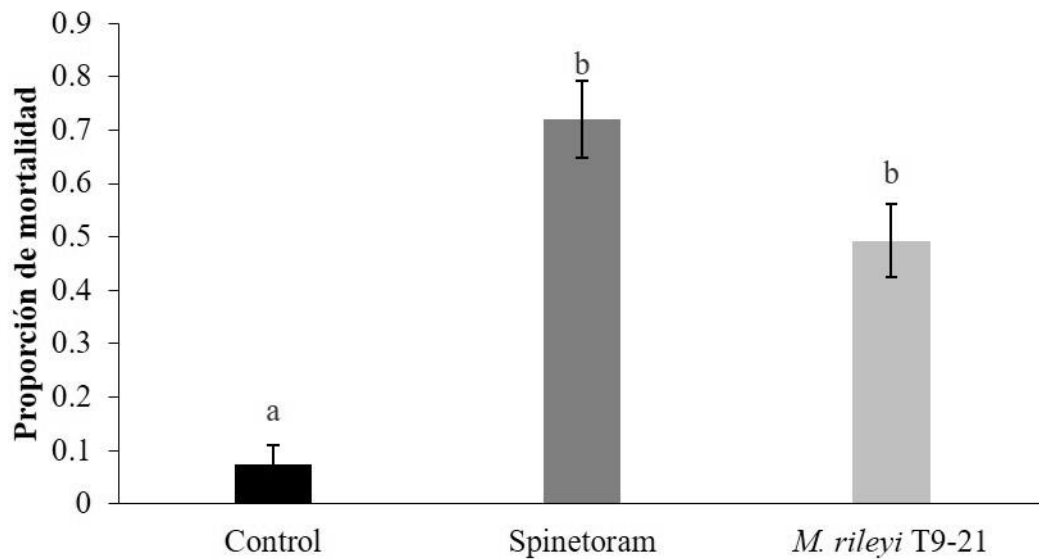


Figura 10. Probabilidad de mortalidad ($\pm$ error estándar) inducida por *M. rileyi* T9-21, spinetoram y el tratamiento control sobre larvas de *S. frugiperda* en plantas de maíz bajo condiciones de campo. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

El análisis de biplot canónico mostró que la presencia de enemigos naturales e insectos fitófagos fue significativamente menor en los tratamientos con spinetoram y el aislamiento T9-21 de *M. rileyi* en comparación con el control en todos los tiempos de muestreo ($F = 10.95$; gl = 4,72; $p < 0.00001$; Figura 11). El enemigo natural más comúnmente registrado fue la tijereta *Doru taeniatum* (Dohrn) (Dermaptera: Forficulidae), el cual representó el 71.6% del total de enemigos naturales observados. Otros enemigos naturales registrados fueron *Orius* sp. (Hemiptera: Anthocoridae), *Collops* sp. (Coleoptera: Melyridae), coccinélidos y arañas. Los insectos fitófagos registrados incluyeron *Diabrotica virgifera zea* Krysan & Smith, *Diabrotica balteata* Leconte, *Euschistus heros* Fabricius y áfidos.

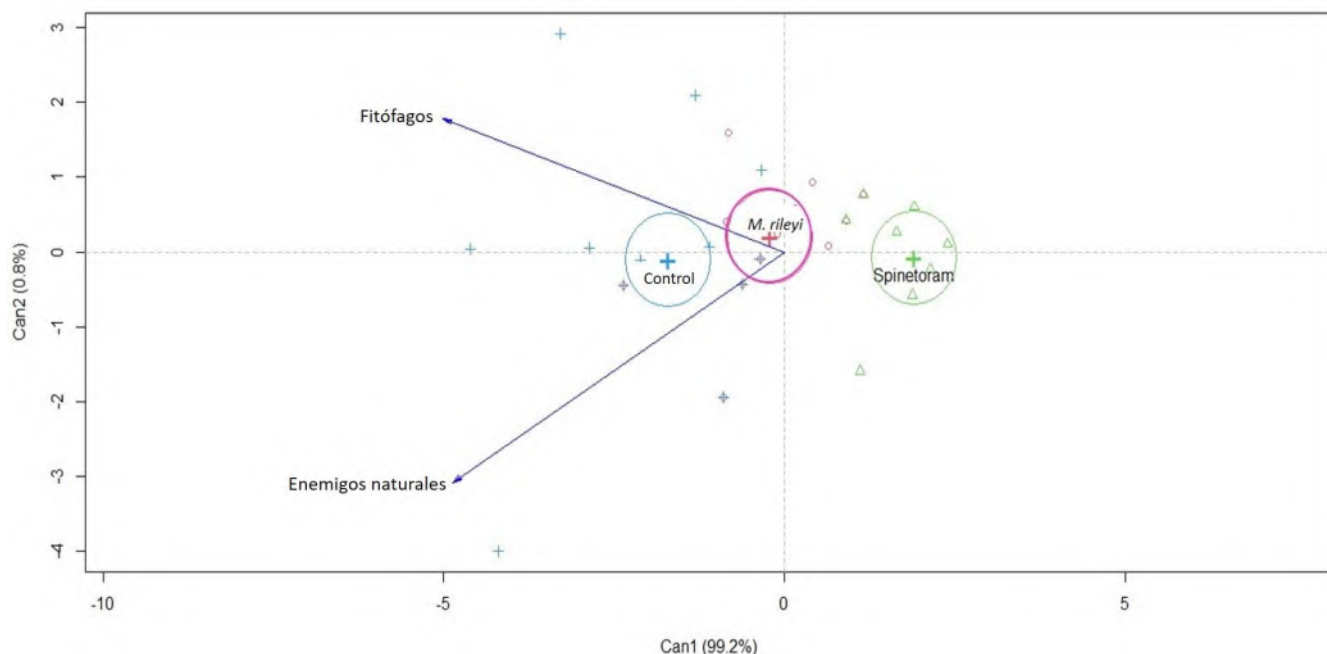


Figura 11. Efecto de la aplicación de *Metarhizium rileyi* T9-21 y spinetoram sobre la abundancia de insectos fitófagos y enemigos naturales en plantas de maíz bajo condiciones de campo.

En el caso de los enemigos naturales, no se observaron diferencias significativas entre parcelas ($p = 0.51$). Sin embargo, se observaron diferencias significativas para el factor ‘tratamiento’ ($F = 31.91$; $gl = 2$; $p < 0.0001$) y ‘tiempo de colecta’ ($F = 8.89$; $gl = 2$; $p < 0.0008$). También se encontró una interacción significativa entre ambos factores ($F = 3.76$; $gl = 4$; $p < 0.0124$). La densidad de enemigos naturales fue significativamente menor en el tratamiento con spinetoram que en el aislamiento T9-21 de *M. rileyi* y en el control en cada día post-aplicación, con una sola excepción (Figura 12A). A los 4 d post-aplicación, no se observaron diferencias significativas entre *M. rileyi* (0.21 ± 0.03) y spinetoram (0.07 ± 0.04). Además, a los 2 y 4 d post-aplicación, no se observaron diferencias significativas entre el aislamiento T9-21 de *M. rileyi* (0.50 ± 0.1 y 0.22 ± 0.03 , respectivamente) y el control (0.58 ± 0.09 y 0.50 ± 0.05 , respectivamente; Figura 12A).

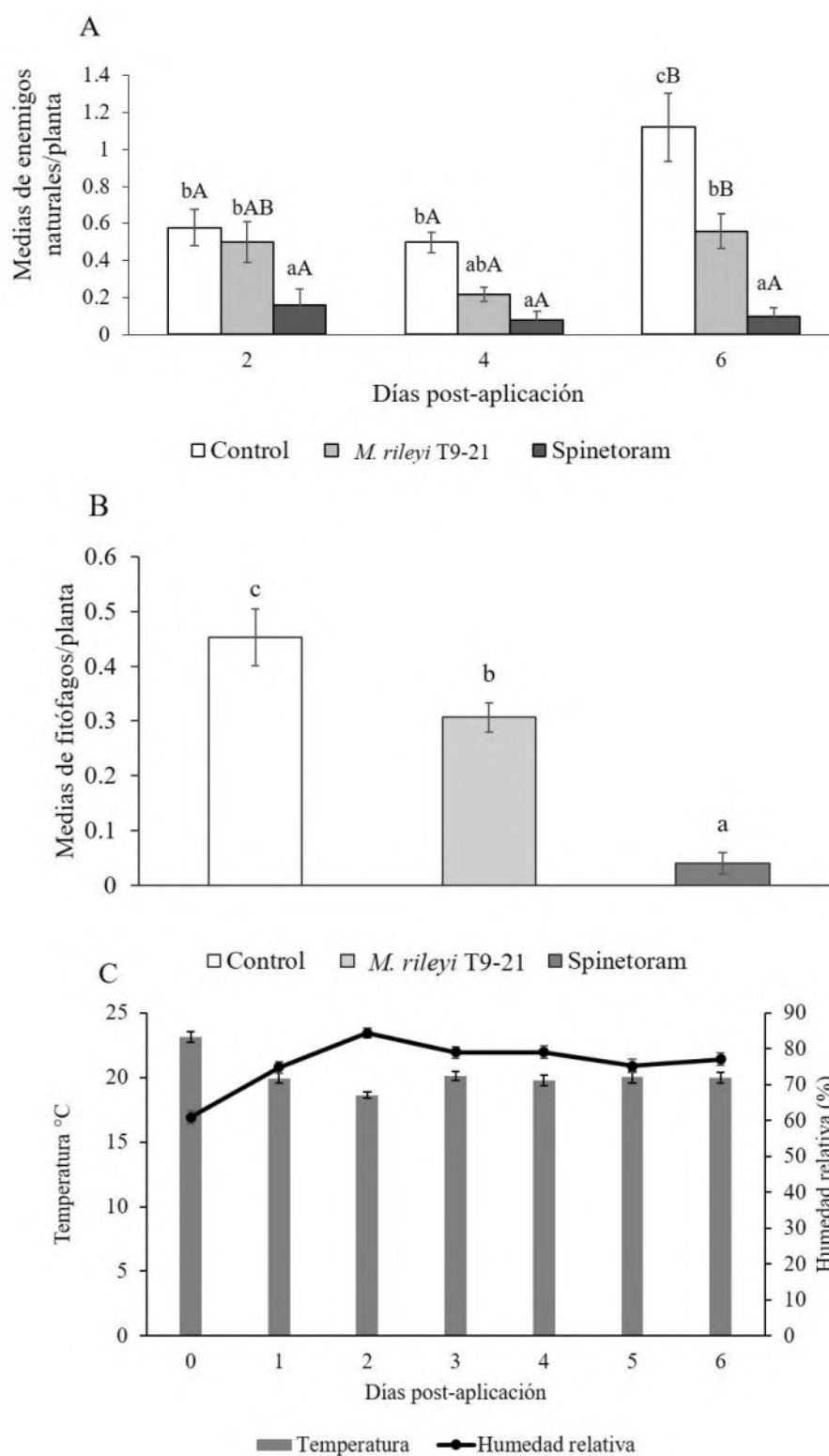


Figura 12. Efecto del tiempo de recolección sobre la abundancia de insectos fitófagos y enemigos naturales en plantas de maíz tras la aplicación de *M. rileyi* T9-21 y spinetoram bajo condiciones de campo.

A los 6 d post-aplicación, la densidad de enemigos naturales fue significativamente mayor en el control (1.12 ± 0.18) que en el aislamiento T9-21 de *M. rileyi* (0.56 ± 0.09). En el aislamiento T9-21 de *M. rileyi* y en el control, el promedio de enemigos naturales aumentó significativamente a los 6 d post-aplicación en comparación con los días anteriores; mientras que en el tratamiento con spinetoram, la densidad se mantuvo similar en los tres días de observación (Figura 12A).

La densidad de insectos fitófagos por planta solo fue influenciada por el factor ‘tratamiento’ ($F = 32.24$; $gl = 2$; $p < 0.0001$). La mayor densidad se observó en el control (0.45 ± 0.05), seguida del aislamiento T9-21 de *M. rileyi* (0.30 ± 0.0) y spinetoram (0.04 ± 0.02 ; Figura 12B). No se observaron diferencias significativas entre parcelas ($p = 0.84$).

Durante el estudio, la temperatura y la humedad relativa oscilaron entre 19 y 21 °C y entre 70 y 84.4%, respectivamente. Cabe destacar que se observó una ligera disminución de la temperatura y un aumento de la humedad relativa a los 2 d post-aplicación (Figura 12C).

DISCUSIÓN

Metarhizium rileyi es un hongo entomopatógeno cosmopolita con gran potencial para el control de *S. frugiperda* y otras plagas de la familia Noctuidae (Visalakshi *et al.*, 2020). La mayoría de los estudios que evalúan la efectividad de este hongo como bioinsecticida contra este insecto se han realizado bajo condiciones de laboratorio (Yang *et al.*, 2024). En el presente estudio, se evaluó la actividad de dos aislamientos mexicanos de *M. rileyi* sobre larvas de *S. frugiperda* bajo condiciones de invernadero. Posteriormente, se llevó a cabo un ensayo a pequeña escala en un campo de maíz para evaluar el grado de control alcanzado por el aislamiento más eficaz que se determinó en el experimento de invernadero.

Nuestros estudios demostraron que los aislamientos L8-22 y T9-21 de *M. rileyi* fueron altamente efectivos para el control de *S. frugiperda* bajo condiciones de invernadero, pero el aislamiento T9-21 destacó por ser el más rápido en causar la mortalidad de las larvas. Estos resultados son consistentes con estudios previos, en los cuales se determinó que los mismos aislamientos monospóricos analizados en este estudio presentaron una patogenicidad similar frente a larvas de segundo estadio de *S. frugiperda* en bioensayos de laboratorio (Ramos *et al.*, 2024). Las tasas de supervivencia obtenidas para los aislamientos L8-22 (23%) y T9-21 (13%) en condiciones de invernadero concuerdan con otros estudios realizados con la misma

especie de insecto y planta hospedante. Concentraciones de 4.03×10^6 conidios/mL y 6.3×10^6 conidios/mL de un aislado colombiano (Nm06) de *M. rileyi* (Grijalba *et al.*, 2018) y un aislado brasileño (CG381) (Faria *et al.*, 2021), aplicados a plantas infestadas previamente con larvas de segundo y tercer estadio, ocasionaron tasas de supervivencia de 21% y 12% a los 11 y 8 d post-aplicación, respectivamente. Aunque en nuestro estudio se aplicó una concentración de conidios (1.0×10^8 conidios/mL) mayor que en los estudios anteriores, las diferencias en la susceptibilidad del insecto hospedero podrían atribuirse a diferencias genéticas entre los aislados de *M. rileyi* y/o a las condiciones experimentales utilizadas.

La patogenicidad de los aislamientos de *M. rileyi* utilizados en este estudio fue superior a la reportada para otros hongos entomopatógenos contra larvas de *S. frugiperda*. Dos aislamientos de *Beauveria bassiana* provenientes de Tailandia, aplicados en condiciones de invernadero a concentraciones de 1×10^8 , 1×10^9 y 1×10^{10} conidios/mL sobre plantas de maíz, causaron tasas de mortalidad de 19–21%, 20–25% y 32–35%, respectivamente, a los 10 d post-aplicación en larvas de segundo estadio de este insecto (Lepcha *et al.*, 2020). Idrees *et al.* (2021) determinaron que un aislamiento chino de *B. bassiana* pulverizado sobre hojas de maíz, a una concentración de 1×10^8 conidios/mL, provocó un 16% de mortalidad en larvas de segundo estadio de *S. frugiperda* a los 7 d post-tratamiento. Estos resultados sugieren que los aislamientos de *M. rileyi* utilizados en el presente estudio son altamente patógenos para *S. frugiperda* y tienen potencial para su uso como bioinsecticidas. Sin embargo, es evidente que las diferencias en la actividad biológica pueden estar fuertemente influenciadas por la susceptibilidad del insecto hospedero y, nuevamente, por las diferencias genéticas entre aislamientos.

La esporulación de los hongos entomopatógenos sobre cadáveres constituye una fuente esencial para la transmisión de esporas a hospedadores susceptibles (Ausique *et al.*, 2017). En nuestro estudio, el aislamiento T9-21, que mostró ser más infectivo y el más rápido en matar a las larvas de *S. frugiperda*, presentó una mayor tasa de esporulación (97%) en comparación con el aislamiento L8-22 (69%). Este resultado es consistente con otros estudios en los que se observó una correlación positiva entre la mortalidad y la proporción de cadáveres con esporulación entre aislamientos de *M. rileyi* (Visalakshi *et al.*, 2020; Ramos *et al.*, 2024). Se requieren otros estudios para determinar posibles diferencias en el proceso de infección, así como en los efectos fisiológicos y bioquímicos entre los aislamientos ensayados en este

estudio, con el fin de identificar los factores clave que pueden influir en la susceptibilidad del huésped.

Nuestro experimento de campo demostró que una concentración de 1×10^{13} conidios/mL del aislamiento T9-21 provocó un 50% de mortalidad en larvas de *S. frugiperda* a lo largo de todos los tiempos de recolecta. En otros experimentos en campos de maíz, Lopes *et al.* (2024) determinaron que la aplicación convencional y mediante el uso de un “dron” de un aislamiento brasileño de *M. rileyi* (CG381), a una concentración de 5×10^{12} conidios/ha, causó mortalidades larvales de *S. frugiperda* del 48% y 35%, respectivamente. Estudios realizados con el mismo aislamiento brasileño demostraron que aplicaciones mediante aspersión a concentraciones de 0.6 and 1.2×10^{12} conidios/ha o 2×10^7 y 2×10^8 conidios/mL, resultaron en mortalidades larvales de 27% y 31% (Faria *et al.*, 2021) o de 13% y 38% (Barros *et al.*, 2021), respectivamente.

Las diferencias en la mortalidad causada por *M. rileyi* entre los experimentos de campo mencionados y el nuestro pueden atribuirse a las concentraciones de hongos utilizadas, a la susceptibilidad del huésped y/o a la edad de este al momento de la aplicación fúngica. Además, la susceptibilidad de *S. frugiperda* a diferentes aislamientos de *M. rileyi* depende en gran medida de su capacidad para superar las defensas inducidas por el insecto plaga (Lemaitre y Hoffmann, 2007) y de la presencia de condiciones ambientales adecuadas para conservar la viabilidad de los conidios y completar el ciclo infectivo (Barros *et al.*, 2021). En nuestro estudio, prevalecieron condiciones favorables y estables de temperatura (19-21°C) y humedad relativa (70-84%), que coinciden con los valores óptimos para promover el ciclo de infección de *M. rileyi* (temperatura: 18-26°C y HR >75%; Visalakshi *et al.*, 2020). Adicionalmente, dado que los hongos entomopatógenos pueden ser degradados por la luz ultravioleta (Hernández-Campos *et al.*, 2025), realizamos la aplicación de los tratamientos al final de la tarde (6:00 PM) para evitar la radiación solar intensa y aumentar el tiempo de contacto de los conidios con las larvas durante el resto del día y la noche.

Aunque en este estudio no se observaron diferencias en la mortalidad larval entre los tratamientos con spinetoram (72%) y el aislamiento T9-21 de *M. rileyi* (50%), la densidad de enemigos naturales y otros insectos fitófagos fue significativamente menor en el tratamiento con insecticida en comparación con los tratamientos con *M. rileyi* y el control. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Méndez *et al.* (2002), quienes reportaron

que el spinosad (un insecticida de la misma familia que el spinetoram, producido por la fermentación del actinomiceto del suelo *Saccharopolyspora spinosa* Mertz y Yao) redujo significativamente la densidad de enemigos naturales y otros insectos en un cultivo de maíz. Además, estos autores determinaron que este efecto podría variar entre las especies de insectos y ser dependiente de la dosis de manera positiva. En nuestro estudio, los depredadores *D. taeniatum* y *Orius* spp. fueron los enemigos naturales más prevalentes. Esto es consistente con los estudios de Méndez *et al.* (2002), quienes también reportaron que estos depredadores fueron los más abundantes y los más sensibles al insecticida aplicado, lo cual podría haber ocurrido igualmente en nuestro estudio.

Es ampliamente conocido que *M. rileyi* presenta especificidad hacia larvas de la familia Noctuidae, lo que minimiza el riesgo para organismos no blanco (Fronza *et al.*, 2017). De manera interesante, observamos que la presencia de enemigos naturales y otros insectos fitófagos tendió a disminuir en el tratamiento con *M. rileyi* en comparación con el control a los 4 d después de la aplicación, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, en el último tiempo de colecta (6 d post-aplicación), se observó una diferencia marcada entre estos dos tratamientos. No tenemos una explicación clara para este resultado. Sin embargo, suponemos que podría deberse a algún efecto de disuasión causado por el hongo. Esta hipótesis podría ser respaldada por los estudios de Meyling *et al.* (2006), quienes encontraron que el depredador generalista *Anthocoris nemorum* L. (Heteroptera: Anthocoridae) fue capaz de detectar y evitar el contacto con hojas de *Urtica dioica* L. tratadas con el hongo entomopatógeno *B. bassiana*. Estos autores atribuyeron este efecto a la detección de señales específicas del hongo, aparentemente asociadas con compuestos presentes en las superficies de los conidios. Además, Myles (2002) demostró que *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) provocó reacciones de alarma, agregación y defensa en termitas expuestas a este hongo. Sin embargo, esta respuesta parece ser específica y adaptativa (Myles, 2002). Actualmente se están llevando a cabo estudios para confirmar nuestra observación e identificar los factores relacionados con el posible impacto de *M. rileyi* sobre los insectos no objetivo asociados al cultivo de maíz.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio demuestran que ambos aislamientos mexicanos de *M. rileyi* fueron efectivos para el control de larvas de *S. frugiperda* en condiciones de

invernadero. El aislamiento T9-21 de *M. rileyi* podría considerarse para su inclusión en programas de manejo integrado de plagas contra *S. frugiperda*, ya que alcanzó niveles de control comparables a los logrados con spinetoram en condiciones de campo. Finalmente, estos hallazgos ofrecen una base científica para futuros ensayos en campo a gran escala.

VII. DISCUSIÓN GENERAL

La estrategia principal para el control de *S. frugiperda* se basa en el uso de insecticidas químicos (Carvalho *et al.*, 2022). Sin embargo, se ha documentado que esta plaga ha desarrollado resistencia a los ingredientes activos de estos productos (Gutiérrez-Moreno *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2024). Además, los insecticidas químicos representan riesgos para la salud humana y animal y contribuyen a la contaminación ambiental (Tang *et al.*, 2025). Por lo tanto, es importante explorar alternativas más sostenibles y ambientalmente seguras para el control de *S. frugiperda*.

Está ampliamente establecido que los hongos entomopatógenos, principalmente de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium*, regulan biológicamente las poblaciones de *S. frugiperda* sin causar daño al medio ambiente ni a la salud humana (Peng *et al.*, 2023). Dentro del género *Metarhizium*, la especie *Metarhizium rileyi* (Farlow) destaca por su alta prevalencia y potencial para el control de *S. frugiperda* (Wang *et al.*, 2022; Gotti *et al.*, 2023; Pang *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2024). Sin embargo, la caracterización molecular y los estudios filogenéticos de estos hongos son necesarios para su identificación precisa, la comprensión de su diversidad genética, el análisis de sus relaciones evolutivas y la selección de cepas con alto potencial de control biológico, lo que contribuye al desarrollo de estrategias más efectivas y sostenibles dentro del manejo integrado de plagas.

En nuestro estudio, se caracterizaron morfológica, molecular y biológicamente varios aislamientos nativos de *M. rileyi* obtenidos de larvas de *S. frugiperda* en diferentes regiones productoras de maíz de la región norte de Michoacán. Las principales características morfológicas observadas en estos hongos son consistentes con las descritas por diversos autores (Visalakshi *et al.*, 2020; Pang *et al.*, 2023; Peng *et al.*, 2024). Por otro lado, los análisis moleculares mediante la amplificación del gen de β -tubulina mostraron que todos los aislamientos obtenidos de este hongo se agruparon filogenéticamente con *M. rileyi*. Sin embargo, los aislamientos Z30-21 y L8-22 presentaron diferencias filogenéticas en comparación con T9-21, PP48-21 y J10-22, lo que indica que provienen de subpoblaciones distintas que han evolucionado y se han adaptado a condiciones geográficas específicas. Estudios similares en diferentes regiones de Asia también han demostrado que los aislamientos de *M. rileyi* pueden variar filogenéticamente dependiendo del área geográfica de los mismos (Kepler *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2023), lo que a su vez influye en su crecimiento,

tasa de producción de conidios y virulencia (Pang *et al.*, 2023). El gen de β -tubulina ha sido amplificado por diversos autores para la caracterización molecular de especies dentro del género *Metarhizium* (Kepler *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2021), ya que permite determinar las relaciones evolutivas entre especies del orden Hypocreales (Kepler *et al.*, 2014).

Los principales atributos biológicos de un hongo entomopatógeno incluyen altas tasas de germinación y esporulación, concentración letal, tiempo letal medio y patogenicidad (Zhang *et al.*, 2011; Islam *et al.*, 2021). En este estudio, se determinó que los aislamientos nativos obtenidos de larvas micosadas de *S. frugiperda* provocaron bajas tasas de supervivencia y alta esporulación cuando fueron inoculados en larvas de segundo instar bajo condiciones de laboratorio. Los aislamientos T9-21, J10-22 y L8-22 presentaron las tasas de mortalidad más elevadas. Además, estos aislamientos lograron las concentraciones letales medias (CL₅₀) más bajas (entre 2.04×10^5 y 1.05×10^6 conidios/mL), así como los tiempos letales medios (TL₅₀) más cortos (entre 7.04 y 7.49 d). Estudios similares han resaltado la patogenicidad de *M. rileyi* contra *S. frugiperda*, demostrando que causa mortalidad entre 5 y 12 d después de la inoculación, con valores de CL₅₀ de 9.8×10^3 - 5.20×10^5 conidios/mL (Bosa *et al.*, 2004; Montecalvo *et al.*, 2022). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han realizado bajo condiciones de laboratorio. Según Fronza *et al.* (2017), la escasez de estudios en campo con información detallada sobre la adaptabilidad de diferentes aislamientos de *M. rileyi* en diversas condiciones ambientales representa una brecha crítica que debe abordarse.

En el presente estudio, también se evaluó la eficacia de los aislamientos T9-21 y L8-22 de *M. rileyi* en larvas del segundo instar de *S. frugiperda* bajo condiciones de invernadero. Aunque no se observaron diferencias significativas en las tasas de supervivencia causadas por cada aislamiento de este hongo, el aislamiento T9-21 logró la mayor tasa de esporulación y, por lo tanto, se seleccionó para su evaluación en campo en cultivos de maíz. Aunque se han realizado pocos estudios sobre los efectos de *M. rileyi* en condiciones de invernadero, se conoce que bajo estas condiciones y con concentraciones de conidios similares, este hongo puede causar una mortalidad acumulada entre 79 y 96% (Grijalba *et al.* 2018; Faria *et al.* 2021).

En condiciones de campo, el aislamiento T9-21 de *M. rileyi*, aplicado en plantas de maíz a una concentración de 1×10^{13} conidios/mL⁻¹, causó una probabilidad de mortalidad de larvas de *S. frugiperda* de 0.5 (=50%) a los 9 d post-aplicación. No se observaron diferencias

significativas en comparación con el spinetoram, que se utilizó como tratamiento de comparación. En otros experimentos, el porcentaje de muerte causado por *M. rileyi* sobre *S. frugiperda* en cultivos de maíz ha sido variable (rango de 13% a 48%; Faria *et al.*, 2021, Barros *et al.*, 2021, Lopes *et al.* 2024). Sin embargo, estas diferencias pueden atribuirse al genotipo del hongo, las condiciones ambientales bajo las cuales se aplicaron los aislamientos y a la concentración de conidios utilizada. Además, diversos estudios han demostrado que *M. rileyi* presenta una considerable diversidad genética, lo que resulta en distintos niveles de eficacia contra *S. frugiperda* (Zhang *et al.*, 2016; Peng *et al.*, 2024). La patogenicidad de los hongos entomopatógenos está influenciada por diversos factores, incluida la capacidad del hongo para crecer, desarrollarse y resistir el estrés. En el caso de *M. rileyi*, su virulencia no solo está determinada por la interacción con las enzimas protectoras y desintoxicantes de *S. frugiperda*, sino también por su propio crecimiento, desarrollo y capacidad para combatir el estrés oxidativo (Nazrul *et al.*, 2010; Pang *et al.*, 2023).

Además de la mortalidad provocada por los insecticidas biológicos, la presencia de enemigos naturales es fundamental, ya que estos forman parte importante en la regulación de una plaga. En el estudio de campo, los depredadores *D. taeniatum* y *Orius* spp. fueron los enemigos naturales más abundantes. Estos resultados coinciden con otros autores donde confirman que *D. taeniatum* es, generalmente, el enemigo natural más abundante asociado al cultivo de maíz (Wyckhuys y O'Neil, 2006). Sin embargo, un resultado del presente estudio y, que amerita futuras investigaciones, fue un menor registro de los enemigos naturales y otros insectos fitófagos en las plantas de maíz tratadas con *M. rileyi* comparado con el testigo. Aunque no existe una explicación clara sobre este resultado debido a que *M. rileyi* tiene preferencia sobre la familia Noctuidae (Islam *et al.*, 2021; Peng *et al.*, 2024), se hipotetiza que los conidios pudieron haber ejercido un efecto repelente sobre estos insectos. Al respecto, se conoce que los insectos pueden detectar señales de alarma o metabolitos secundarios emitidos por los conidios de los hongos entomopatógenos cuando estos se aplican a los cultivos, lo que puede provocar que los insectos exploren otros lugares para alimentarse y/o completar su ciclo de vida (Myles, 2002; Meyling *et al.*, 2006).

Se concluye que este estudio proporciona información relevante sobre las características morfológicas, moleculares y biológicas de los aislamientos nativos de *M. rileyi* obtenidos de larvas de *S. frugiperda* colectadas en campos de maíz. La comprensión de las relaciones filogenéticas entre estos aislamientos es importante para identificar variaciones genéticas que

puedan influir en su actividad y adaptabilidad ambiental. Los hallazgos destacan la alta prevalencia y patogenicidad de *M. rileyi* contra *S. frugiperda*, así como la efectividad del aislamiento T9-21 bajo condiciones de laboratorio, invernadero y campo. Además, esta investigación amplía nuestro entendimiento sobre las interacciones entre *M. rileyi* y los componentes bióticos y abióticos en los agroecosistemas de maíz.

VIII. PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES

Los resultados del presente estudio son de amplia perspectiva para el control de la principal plaga del maíz. Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar la adaptabilidad de los aislamientos de *M. rileyi* bajo diversas condiciones agroecológicas y prácticas agrícolas. Aunado a ello, se recomienda continuar con estudios genómicos y transcriptómicos que permitan identificar los genes relacionados con su virulencia, resistencia a estrés y adaptación ambiental. Esto podría facilitar la selección y mejora de cepas más eficientes. Por otro lado, para facilitar la adopción práctica de *M. rileyi* como agente de biocontrol, se recomienda profundizar en el desarrollo de métodos de producción masiva y formulaciones eficientes que permitan conservar una alta capacidad de germinación, estabilidad de almacenaje y facilidad de aplicación en campo. Debido a la alta sensibilidad de los entomopatógenos a la luz solar, se recomienda identificar sustancias fotoprotectoras que permitan una mayor persistencia de los conidios sobre la superficie foliar. Con lo anterior, se podrían establecer ciclos óptimos de aplicación para mantener una eficacia a lo largo del ciclo del cultivo. Finalmente, para facilitar su implementación en programas de manejo integrado de plagas (MIP), es fundamental realizar estudios costo-beneficio que incluyan factores como reducción de pérdidas por la plaga, costos de producción del bioinsecticida y percepción de los agricultores sobre el uso de hongos entomopatógenos.

IX. LITERATURA CITADA

- Abbas, A., Ullah, F., Hafeez, M., Han, X., Dara, M.Z.N., Gul, H., Zhao, C.R. (2022). Biological control of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Agronomy*, 12: 2704. <https://doi.org/10.3390/agronomy12112704>.
- Abrahams, P., Bateman, M., Beale, T., Clottey, V., Cock, M., Colmenarez, Y., Corniani, N., Day, R., Early, R., Godwin, J.L. (2017). Fall Armyworm: Impacts and implications for Africa; evidence note (2). CABI, Oxfordshire, UK.
- Afza, R., Afzal, A., Riaz, M.A., Majeed, M.Z., Idrees, A., Qadir, Z., Afzal, M., Hassan, B., Li, J. (2023). Sublethal and transgenerational effects of synthetic insecticides on the biological parameters and functional response of *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) under laboratory conditions. *Frontiers in Physiology*, 14: 1088712. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1088712>.
- Ahmad, I., Jiménez-Gasco, M.M., Luthe, D.S., Shakeel, S.N., Barbercheck, M.E. (2019). Endophytic *Metarhizium robertsii* promotes maize growth, suppresses insect growth, and alters plant defense gene expression. *Biological Control*, 144:104167. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104167>.
- Akutse, K.S., Maniania, N.K., Fiaboe, K.K., Van Den Berg, M.J., Ekesi, S. (2013). Endophytic colonization of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) by fungal pathogens and their effects on the life history parameters of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Fungal Ecology*, 6: 293-301. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.01.003>.
- Ausique, J. J., D'Alessandro, C. P., Conceschi, M. R., Mascarín, G. M., Delalibera Júnior, I. (2017). Efficacy of entomopathogenic fungi against adult *Diaphorina citri* from laboratory to field applications. *Journal of Pest Science*, 90: 947-960. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0846-z>.
- Baker, R., Gilioli, G., Behring, C., Candiani, D., Gogin, A., Kaluski, T., Kinkar, M., Mosbach-Schylz, O., Neri, F.M., Preti, S., Rosace, M.C., Siligato, R., Stancanelli, G., Tramontini, S. (2019). *Spodoptera frugiperda* – Pest report and datasheet to support ranking of EU candidate priority pest. *EFSA Journal*, 17:5731-8761. <http://doi.org/10.5281/zenodo.2789779>.
- Bamisile, B.S., Akutse, K.S., Siddiqui, J.A., Xu, Y. (2021). Model application of entomopathogenic fungi as alternatives to chemical pesticides: prospects, challenges, and

- insights for next-generation sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 12: 741804. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.741084>.
- Barros, S.K.A., de Almeida, E.G., Ferreira, F.T.R. *et al.* (2021). Field efficacy of *Metarhizium rileyi* applications against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *Neotropical Entomology*, 50: 976-988. <https://doi.org/10.1007/s13744-021-00903-0>.
- Bedasa, A.A., Degaga, E.G. (2025). Predictors affecting the severity of irrigated maize due to fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*, Smith) and its natural enemies in Bako-Tibe district, central Ethiopia. *Scientific African*, 27: e02614. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2025.e02614>.
- Blanco, C.A., Pellegaud, J.G., Nava-Camberos, U., Lugo-Barrera, D., Vega-Aquino, P., Coello, J., Terán-Vargas, A.P and Vargas-Camplis, J. (2014). Maize pests in Mexico and challenges for the adoption of integrated pest management programs. *Journal of Integrated Pest Management*, 5: 1-9. <https://doi.org/10.1603/IPM14006>.
- Blango, M.G., Kniemeyer, O., Brakhage, A.A. (2019). Conidial surface proteins at the interface of fungal infections. *PLoS Pathogens*, 15: e1007939. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007939>.
- Bosa, C.F., Chávez, D., Torres, L., Paríz, A., Villamizar, L., Cotes, A.M. (2004). Evaluación de aislamientos nativos de *Nomuraea rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 30: 93-97. <https://doi.org/10.25100/socolen.v30il.9535>.
- Carvalho, I., Machado, L., Neitzke, C., Erdmann, L., Oliveira, L., Carvalho, I., Zotti, M., da Rosa, A.P. (2022). Geographic origin and host dependent metabolic responses affect *Spodoptera frugiperda* susceptibility to insecticides. *Journal of Agricultural Science*, 14: 177-187. <https://doi.org/10.5539/jas.v14n4p177>.
- Carvalho, R.A., Omoto, C., Field, L.M., Williamson, M.S., Bass, C. (2013). Investigating the molecular mechanisms of organo-phosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *PLoS ONE*, 8: 6e2268. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062268>.
- Cech, R.M., Jovanovic, S., Kegley, S., Koen Hertoge, K., Leisch, F., Zaller, J.G. (2022). Reducing overall herbicide use may reduce risks to humans but increase toxic loads to honeybees, earthworms, and birds. *Environmental Sciences Europe*, 34: 44. <https://doi.org/10.1186/s12302-022-00622-2>.

- Chaires-Grijalva, M.P., Serrano-Domínguez, A.K., Coronado-Blanco, J.M. (2021). Ácaros asociados al maíz en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12: 1497-1510. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i8.2718>.
- Chimweta, M., Nyakudya, I.W., Jimu, L., and Mashingaidze, A.B. (2020). Fall armyworm [*Spodoptera frugiperda* (JE Smith)] damage in maize: management options for flood-recession cropping smallholder farmers. *International Journal of Pest Management*, 66: 142-154. <https://doi.org/10.1080/09670874.2019.1577514>.
- Cingolani, M. F., Greco, N.M., Liljesthröm, G.G. (2014). Effect of *Telenomus podisi*, *Trissolcus urichi*, and *Trissolcus basal* (Hymenoptera: Platygasteridae) age on attack of *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) eggs. *Environmental Entomology*, 43: 377-383. <https://doi.org/10.1603/EN13250>.
- COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección de Riesgos Sanitarios). (2020). Consulta de Retsitros Sanitarios de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y LMR. <https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/registro-sanitario-de-plaguicidas-y-nutrientes-vegetales>. Consultado el 6 de enero de 2022.
- Cottrell, T.E., Shapiro-Ilan, I. (2008). Susceptibility of endemic and exotic North American ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae) to endemic fungal entomopathogens. *European Journal of Entomology*, 105: 455–460. <https://doi.org/10.14411/eje.2008.058>.
- Couceiro, J.C., De Fine Licht, H.H., Delalibera Jr, I., Meyling, N.V. (2022). Comparative gene expression and genomics reflect geographical divergence in the plant symbiotic and entomopathogenic fungal genus *Metarhizium*. *Fungal Ecology*, 60: 101190. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2022.101190>.
- Cruz-Ávalos, A.M., Bibián-Hernández, M.A., Ibarra, J.E., Del Rincón-Castro, M.C., (2018). High virulence of Mexican entomopathogenic fungi against Fall Armyworm, (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 12: 99-107. <https://doi.org/10.1093/jee/toy343>.
- Dev, B., Verma, S., Sharma, P.L., Chandel, R.S., Gaikwad, M.B., Banshtu, T., Sharma, P. (2021). Evaluation of *Metarhizium rileyi* Farlow (Samson) impregnated with azadirachtin and indoxacarb against *Helicoverpa armigera*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31: 142. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00487-2>.
- Devi, U.K., Reineke, A., Rao, U.C.M., Reddy, N.R., Khan, A.P. (2007). AFLP and single-strand conformation polymorphism studies of recombination in the entomopathogenic

- fungus *Nomuraea rileyi*. *Mycological Research*, 111: 716–725.
<https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.003>.
- Duraimurugan, P., Meena, K.S., Roy, D.N., Bharathi, E., Devi, T. M., Chowdappa, A., Chandrika, K.S.V.P. (2025). Biocontrol efficacy of native *Metarhizium rileyi* (Hypocreales: Clavicipitaceae) isolates against *Spodoptera litura* (F) (Lepidoptera: Noctuidae) and in silico effect of the secondary metabolites against the virulent proteins of the insect. *3 Biotech*, 15: 57. <https://doi.org/10.1007/s13205-025-04226-4>.
- Du Plessis, H., Schlemmer, M.L., Van den Berg, J. (2020). The effect of temperature on the development of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insects*, 11: 228. <https://doi.org/10.3390/insects11040228>.
- Edosa, T.T., Dinka, T.D. (2021). Current and future potential distribution, risk and management of *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Innovative Agriculture*, 8: 14-23. <https://doi.org/10.37446/jinagri/ra/8.3.2021.14-23>.
- Enkerli, J., Widmer, F. (2010). Molecular ecology of fungal entomopathogens: molecular genetic tools and their applications in population and fate studies. *BioControl* 55: 17-37. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9251-8>.
- Estrada-Virgen, O., Campos, J. C., Bermudez, A. R., Velasco, C. R., Cazola, C. C., Aquino, N. I., Cancino, E. R. (2013). Parasitoids and entomopathogens of the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Nayarit, Mexico. *Southwestern Entomology*, 38: 339–344. <https://doi.org/10.3958/059.038.0216>.
- Fakeer, M., Hammam, G.H., Joo, J.H., Hussein, K. (2024). Applicability of entomopathogenic fungi and essential oils against the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 44: 53-61. <https://doi.org/10.1007/s42690-023-01134-z>.
- Falvo, M.L., Pereira-Junior, R.A., Rodrigues, J., López Lastra, C.C., García, J.J., Fernandes, É.K.K., Luz, C. (2016). UV-B radiation reduces *in vitro* germination of *Metarhizium anisopliae* s.l. but does not affect virulence in fungus-treated *Aedes aegypti* adults and development on dead mosquitoes. *Journal of Applied Microbiology*, 121: 1710-1717. <https://doi.org/10.1111/jam.13309>
- FAO. (2022). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Disponible en línea: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Consulted on January 6, 2023.

- Faria, M., Souza, D.A., Sanches, M., Schmidt, F.G., Oliveira, C., Benito, N., Lopez, R. (2021). Evaluation of key parameters for developing a *Metarhizium rileyi*-based biopesticides against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize: laboratory, greenhouse and field trials. *Pest Management Science*. <https://doi.org/10.1002/ps.6729>.
- Fronza, E., Specht, A., Heinzen, H., de Barros, N. (2017). *Metarhizium* (Nomuraea) *rileyi* as biological control agent. *Biocontrol Science and Technology*. <https://doi.org/10.1080/09583157.2017.1391175>.
- Ganiger, P.C., Yeshwanth, H.M., Muralimohan, K., Vinay, N., Kumar, A.R.V., Chandrashekara, K. (2018). Occurrence of the invasive pest, fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), in the maize fields of Karnataka, India. *Current Science*, 115: 621. <https://doi.org/10.18520/cs/v115/i4/621-623>.
- Ginting, S., Nadrawati, Zarkani, A., Sumarni, T. (2020). Natural incidence of entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* on *Spodoptera frugiperda* infesting corn in Bengkulu. *JHPT Tropika*, 20: 85-91. <https://doi.org/10.23960/j.hptt.22085-91>.
- Goergen, G., Kumar, P., Sankung, S.B., Togola, A., Tamò, M. (2016). First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. *PLoS ONE*, 11: e0165632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165632>.
- Goettel, M.S., Inglis G.D. (1997). Fungi: hyphomycetes, in: Lacey L.A. (Ed.) *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press, London, pp. 213–249.
- Gómez-García, G., Real-Santillan, R.A., Larsen, J., López, L., Figueroa, J.I., Pineda, S., Martínez-Castillo, S. (2020). Maize mycorrhizas decrease the susceptibility of the foliar insect herbivore *Spodoptera frugiperda* to its homologous nucleopolyhedrovirus. *Pest Management Science*, 77, 4701-4708. <https://doi.org/10.1002/ps.6511>.
- González-Cava, G., Venegas-Barrera, C.S., González-Gaona, O.J., Vargas-Madrid, M.A., Pérez-Arriaga, E., Azuara-Domínguez, A.A. (2019). Abundance and distribution of entomopathogenic fungi in different locations and environments of southern Tamaulipas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10: 669-681. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i3.1550>.
- Gounou, S., Jiang, N., Schulthess, F. (2009). Long-term seasonal fluctuations of lepidopteran cereal stemborers and their natural enemies on maize and wild host plants in southern Benin. *Insect Sciences*, 16: 329-341. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2009.01264.x>.

- Grijalba, E.P., Espinel, C., Cuartas, P.E., Chaparro, M., Villamizar, L.F. (2018). *Metarhizium rileyi* biopesticide to control *Spodoptera frugiperda*: stability and insecticidal activity under glasshouse conditions. *Fungal Biology*, 122: 1069-1076. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.08.010>.
- Gu, M., Tian, J., Lou, Y., Ran, J., Mohamed, A., Keyhani, N.O., Jaronski, S., Wang, G., Chen, X., Zang, L., Zhang, W. (2023). Efficacy of *Metarhizium rileyi* granules for the control of *Spodoptera frugiperda* and its synergistic effects with chemical pesticide, sex pheromone and parasitoid. *Entomologia Generalis*, 43: 1211-1219. <https://doi.org/10.1127/entomologia/2023/2079>.
- Gupta, V.K., Jinda, V. (2014). Biotechnological approaches for insect pest management. In: Abrol, D.P. (Ed.), Integrated Pest Management, current concept and ecological perspective. *Academic Press*, London, pp. 301-335.
- Gutiérrez-Moreno, R., Mota-Sanchez, D., Blanco, C.A., Whalon, M.E., Terán-Santofimio, D., Rodríguez-Maciel, J.C., DiFonzo, C. (2019). Field-evolved resistance of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to synthetic insecticides in Puerto Rico and Mexico. *Journal of Economic Entomology*, 112: 792-802. <https://doi.org/10.1093/jee/toy372>.
- Hardke, J.T., Lorenz, I.I.I.G.M., Leonard, B.R. (2015). Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) ecology in Southeastern cotton. *Journal of Integrated Pest Management*, 6: 10. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmv009>.
- Hernández-Campos, R., Montesinos-Matías, R., Sánchez-González, J.A., Loera, O. (2025). Natural anti-UV formulation increases the survival of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium rileyi* conidia and enhances the biological control of *Spodoptera frugiperda* in corn plants. *Mexican Journal of Biotechnology*, 10: 36-60. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2025.10.1.36>.
- Huerta-Ramírez, A., Enríquez-Vara, J.N., Guizar-González, C., Lobit, P., Gómez-Dorantes, N., Rincón-Enríquez, G., Quiñones-Aguilar, E.E., López-Pérez, L. (2018). Presencia de hongos entomopatógenos nativos en suelos cultivados con maíz del municipio de Epitacio Huerta, Michoacán. *Biotecnología y Sustentabilidad*, 3: 68-76. <https://doi.org/10.57737/biotecnologiaysust.v3i2.498>.
- Humber, R.A. (2012). Identification of entomopathogenic fungi, in: Lacey, L.A. (Ed.), Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, second ed. Academic Press, London, pp. 151-187.

- Hussain, A.G., Wennmann, J.T., Georgen, G., Bryon, A., Ros, V.I.D. (2021). Viruses of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: a review with prospects for biological control. *Viruses*, 13: 2220. <https://doi.org/103390/v13112220>.
- Idrees, A., Qadir, Z.A., Akutse, K.S., Afzal A., Hussain, M., Islam, W., Waqas, M.S., Bamisile, B.S., Li, J. (2021). Effectiveness of entomopathogenic fungi on immature stages and feeding performance of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Insects*, 12: 1044. <https://doi.org/10.3390/insects12111044>.
- INEGI (2022). Censo Agropecuario 2017. Panorama General. https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/cagf/2022/doc/CA2022_RONAL.pdf.
- Islam, W., Adnan, M., Shabbir, A., Naveed, H., *et al.* (2021). Insect-fungal-interactions: a detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests. *Microbial Pathogenesis*, 159: 105122. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105122>.
- Jepson, P.C., Murray, K., Bach, O., Bonilla, M.A., Neumeister, L. (2020). Selection of pesticides to reduce human and environmental health risks: a global guideline and minimum pesticides list. *Lancet Planet Health*, 4: e56-63. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(19\)30266-9](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(19)30266-9).
- Johny, S., Kyei-Poky, G., Gauthier, D., Van Frankenhuyzen, K., Krell, P.J. (2012). Characterization and virulence of *Beauveria* spp. recovered from emerald ash borer in southwestern Ontario, Canada. *Journal of Invertebrate Pathology*, 11: 41-49. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.05.008>.
- Kalleshwaraswamy, C.M., Asokan, R., Mahadeva, S.H.M., Maruthi, M.S., Pavithra, H.B., Hedge, K., Navi, S., Prabhu, S.T., Goergen, G. (2018). First report of the Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), an alien invasive pest on maize in India. *Pest Management in Horticultural Ecosystems*, 24: 23–29.
- Kenis, M., Benelli, G., Biondi, A., Calatayud, P.A., Day, R., Desneux, N., Harrison, R., *et al.* (2022). Invasiveness, biology, ecology, and management of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Entomologia Generalis*, 43: 187-241. <https://doi.org/10.1127/entomologia/2022/1659>.
- Kepler, R.M., Humber, R.A., Bischoff, J.F., Rehner, S.A. (2014). Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia*, 106: 811-829. <https://doi.org/10.3852/13-319>.

- Keyser, C. (2015). Protecting plants against pests and pathogens with entomopathogenic fungi: the biocontrol agent *Metarhizium*, its distribution, application, and interaction with other beneficial fungi. PhD Thesis. University of Copenhagen, 109p.
- Kinkar, M., Delbianco, A., Vos, S. (2020). Pest survey card on *Spodoptera frugiperda*. European Food Safety Authority. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2020.EN-1895>.
- Lacey, L.A. (2012). Manual of techniques in invertebrate pathology, second ed. Academic Press, London, pp. 470.
- Lamsal, S., Sibi, S., Yadav, S. (2020). Fall Armyworm in South Asia: Threats and management. *Asian Journal of Advances in Agricultural Research*, 13: 21-34. <https://doi.org/10.9734/ajaar/2020/v11i330106>.
- Lemaitre, B., Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25: 697-743. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>.
- Lepcha, O. (2020). Use of entomopathogenic fungus and nematodes indigenous to Thailand for controlling of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)). Thesis submitted to obtain the Master degree in Agricultural Sciences. Naresuan University, p.88.
- Lezama-Gutiérrez, R., Hamm, J.J., Molina-Ochoa, J., López-Edwards, M., Pescador-Rubio, A., González-Ramírez, M., Styer, E.L. (2001). Occurrence of entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican states of Michoacán, Colima, Jalisco, and Tamaulipas. *Florida Entomologist*, 84: 23-30.
- Liu, J., Lin, Y., Huang, Y., Liu, L., Cai, X., Lin, J., Shu, B. (2023). The effects of carvacrol on development and gene expression profiles in *Spodoptera frugiperda*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 195: 105539. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105539>.
- Liu, Y., Yang, Y., Wan B. (2022). Entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* play roles of maize (*Zea mays*) growth promoter. *Scientific Reports*, 12: 15706. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19899-7>.
- Lopes, R., Nicodemos, F., Zacaroni, A.B., de Sousa, H., Faria, M. (2024). Dusting *Metarhizium rileyi* conidia with a drone for controlling fall armyworm and soybean looper in maize and soybean fields. *BioControl*, 69: 675-685. <https://doi.org/10.1007/s10526-024-10276-z>.
- Lu, Z., Lu, K., Li, Y., Xiao, T., Zhou, Z., Chen, Y., Liu, J., Sun, Z., Gui, F. (2024). Screening and functional validation of the core detoxification genes conferring broad-spectrum

- response to insecticides in *Spodoptera frugiperda*. *Pest Management Science*, 80: 3491-3503. <https://doi.org/10.1002/ps8054>.
- Lu, Z., Yahong, L., Xiao, T., Zhou, Z., Chen, Y., Liu, J., Sun, Z., Gui, F. (2024). Screening and functional validation of the core detoxification genes conferring broad-spectrum response to insecticides in *Spodoptera frugiperda*. *Pest Management Science*, 80: 3491-3503. <https://doi.org/10.1002/ps.8054>.
- Ma, M., Luo, J., Li, C., Eleftherianos, I., Zhang, W., Xu, L. (2024). A life-and-death struggle: interaction of insects with entomopathogenic fungi across various infection stages. *Frontiers in Immunology*, 14: 1329843. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1329843>.
- Mattoo., A.K., Cavigelli, M.A., Mišić, D.M., Gašić, U., Makisimović, V.M., Kramer, M., Kaur, B., Matekalo, D., Živković, J.N., Roberts, D.P. (2023). Maize metabolomics in relation to cropping system and growing year. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1130089>.
- Medina-Hernández, J., Caamal-Cauich, I., Pat-Fernández, V.G., Ávila-Dorantes, J.A. (2024). Current challenges and forecasts in maize grain production and consumption in Mexico. *Agro Productividad*, 17: 165-172. <https://doi.org/10.32854/agrop.v17i5.2741>.
- Mejía, C., Rocha, J., Sanabria, J., Gómez-Álvarez, M.I., Quiroga-Cubides, G. (2024). Performance of *Metarhizium rileyi* Nm017: nutritional supplementation to improve production and quality conidia. *3 Biotech*, 14: 89. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03911-6>.
- Méndez, W.A., Valle, J., Ibarra, J.E., Cisneros, J., Penagos, D.I., Williams, T. (2002). Spinosad and nucleopolyhedrovirus mixtures for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *Biological Control*, 25: 195-206. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(02\)00058-0](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00058-0).
- Meyling, N.V., Pell, J.K. (2006). Detection and avoidance of an entomopathogenic fungus by a generalist insect predator. *Ecological Entomology*, 31: 162-171. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6946.2006.00781.x>
- Montecalvo, M.P., Macaraig, J.S.T., Navasero, M.M., Navasero, M.V. (2022). Biocontrol efficacy of native *Metarhizium rileyi* to various life stages of *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*, 28: 1-11.
- Mwamburi, L.A. (2021). Endophytic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, confer control of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera:

- Noctuidae), in two tomato varieties. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31: 7. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00357-3>.
- Myles, T.G. (2002) Alarm, aggregation, and defense by *Reticulitermes flavipes* in response to a naturally occurring isolate of *Metarhizium anisopliae*. *Sociobiology*, 40: 243–255.
- Naranjo-Ortiz, M.A., Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: Major ecological adaptations and evolutionary transitions. *Biological Reviews*, 94: 1443–1476. <https://doi.org/10.1111/brv.12510>.
- Nascimento, A.R.B., Rodrigues, J.G., Kanno, R.H., Amaral, F.S.A., Malaquias, J.B., Silva-Brandão, K.L., Cônsoli, F.L., Omoto, C. (2023). Susceptibility monitoring and comparative gene expression of susceptible and resistant strains of *Spodoptera frugiperda* to lambda-cyhalothrin and chlorpyrifos. *Pest Management Science*, 79: 2206–2219. <https://doi.org/10.1002/ps.7399>.
- Nazrul, M.I., Yin-Bing, B. (2010). ISSR as new markers for identification of homokaryotic protoclones of *Agaricus bisporus*. *Current Microbiology*, 60: 92–98. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9506-8>.
- Nguyen, N. T. H., Borgemeister, C., Poehling, H.-M., Zimmermann, G. (2007). Laboratory investigations on the potential of entomopathogenic fungi for biocontrol of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and pupae. *Biocontrol Science and Technology*, 17: 853–864. <https://doi.org/10.1080/09583150701546375>.
- Odjo, S., Alakonya, A.E., Rosales-Nolasco, A., Molina, A., Muñoz, C., Palacios-Rojas, N. (2022). Occurrence and postharvest strategies to help mitigate aflatoxins and fumonisins in maize and their co-exposure to consumers in Mexico and Central America. *Food Control*, 138:108968. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108968>.
- Ordóñez-García, M., Rios-Velasco, C., Berlanga-Reyes, D.I., Acosta-Muñiz, C.H., Salas-Marina, M.A., Cambero-Campos, J. (2015). Occurrence of natural enemies of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Chihuahua, Mexico. *Florida Entomologist*, 98: 843–847. <https://doi.org/10.1653/024.098.0305>.
- Pacheco-Hernández, M.L., Reséndiz-Martínez, F., Arriola-Padilla, V.J. (2019). Organismos entomopatógenos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México: una revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 10: 5–32. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i56.496>.
- Padilla-Cortes, E., Martínez-Martínez, L. Diego-Flores, P., Chávez-Servia, J.L. (2024). Damage and entomophagy in natural infestation of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:

- Noctuidae) in maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Journal of Entomological Science*, 60. <https://doi.org/10.18474/JES24-03>.
- Panda, S.K., Sairam, M., Sahoo, U., Shankar, T., Maitra, S. (2022). Growth, productivity and economics of maize as influenced by maize-legume intercropping system. *Farming and Management*, 7: 61-62. <https://doi.org/10.3180/2456-8724.2022.fm-115>.
- Pandi, R., Gopalsamy, S., Onkarappa, D., Thiruvengadam, V., Muthugounder, M., Nand, S. (2024). Characterization and bioassay of indigenous isolates of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus in India. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 34: 15. <https://doi.org/10.1186/s41938-024-00779-3>.
- Pang, J., Peng, Y., Di, T., Du, G., Chen, B. (2023). Virulence of *Metarhizium rileyi* is determined by its growth and antioxidant stress and the protective and detoxifying enzymes of *Spodoptera frugiperda*. *Insects*, 14: 260. <https://doi.org/10.3390/insects14030260>.
- Panwar, N., Szczepaniec, A. (2024). Endophytic entomopathogenic fungi as biological control agents of insect pest. *Pest Management Science*, 80: 6033-6040. <https://doi.org/10.1002/ps.8322>.
- Paredes-Sánchez, F.A., Rivera, G., Bocanegra-García, V., Martínez-Padrón, H.Y., Berrones-Morales, M., Niño-García, N., Herrera-Mayorga, V. (2021). Advances in control strategies against *Spodoptera frugiperda*. A review. *Molecules*, 26: 5587. <https://doi.org/10.3390/molecules26185587>.
- Pedrini, N. (2018). Molecular interactions between entomopathogenic fungi (Hypocreales) and their insect host: Perspectives from stressful cuticle and hemolymph battlefields and the potential of dual RNA sequencing for future studies. *Fungal Biology*, 122: 538–545. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.10.003>.
- Peng, Y., Wen, S., Wang, G., Zhang, X., Di, T., Du, G., Chen, B., Zhang, L. (2023). Reconstruction of gut bacteria in *Spodoptera frugiperda* infected by *Beauveria bassiana* affects the survival of host pest. *Journal of Fungi*, 9: 906. <https://doi.org/10.3390/jof9090906>.
- Peng, Y., Yao, Y., Pang, J., Di, T., Du, G., Chen, B. (2024). Genetic diversity and virulence variation of *Metarhizium rileyi* from infected *Spodoptera frugiperda* in corn fields. *Microorganisms*, 12: 264. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12020264>.

- Poitout, S., Blues, R. (1974). *Elevage de chenilles de vingt-huit especes de Lepidopteres Noctuidae et de deux especes d'Arctiidae sur milieu artificiel simple. Particularites de l'elevage selon les especes. Annales de Zoolgie Ecolgie Animale*, 6: 431–441.
- Qi, G-J., Ma, J., Wan, J., Ren, Y-L., McKirdy, S., Hu, G., Zhang, Z-F. (2021). Source regions of the first immigration of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) invading Australia. *Insects*, 12:1104. <https://doi.org/10.3390/insects12121104>.
- Rajput, M., Sajid, M.S., Rajput, N.A., George, D.R., Usman, M., Zeeshan, M., Iqbal, O., Bhutto, B., Atiq, M., Muhammad R., Daniel, I.K., Sparagano, O.A. (2024). Entomopathogenic fungi as alternatives to chemical acaricides: challenges, opportunities and prospects for sustainable tick control. *Insects*, 15: 1017. <https://doi.org/10.3390/insects15121017>.
- Ramakuwela, T., Hatting, J., Bock, C., Vega, F.E., Wells, L., Mbata, G.N., Shapiro-Ilan, D. (2020). Establishment of *Beauveria bassiana* as a fungal endophyte in pecan (*Carya illinoensis*) seedlings and its virulence against pecan insect pests. *Biological Control*, 140. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104102>.
- Ramanujam, B., Poornesha, B., Shylesha, A.N. (2020). Effect of entomopathogenic fungi against invasive pest *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30: 100. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00291-4>.
- Ramos, Y., Pineda-Guillermo, S., Tamez-Guerra, P., Orozco-Flores, A.A., Figueroa de la Rosa, J.J., Ramos-Ortiz, S., Chavarrieta-Yáñez, J.M., Martínez-Castillo, A.M. (2024). Natural prevalence, molecular characteristics, and biological activity of *Metarhizium rileyi* (Farlow) isolated from *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) larvae in Mexico. *Journal of Fungi*, 10: 416. <https://doi.org/10.3390/jof10060416>.
- Rios-Velasco, C., Gallegos-Morales, G., Cambero-Campos, J., Cerna-Chávez, E., Del Rincón-Castro, M. C., Valenzuela-García, R. (2011). Natural enemies of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Coahuila, México. *Florida Entomologist*, 94: 723-726. <https://doi.org/10.1653/024.094.0349>.
- Ritchie, S.W., Hanway, J.J. and Benson, G.O. (1993). How a Corn Plant Develops. Special Report No. 48. Iowa State University of Science and Technology Cooperative Extension Service Ames, Iowa.

- Rombach, M.C. (1989). Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) sympoduloconidia in- submerged culture. *Entomophaga*, 34: 45-52. <https://doi.org/10.1007/BF02372586>.
- Roy, M.C., Kim, Y. (2021). Toll signal pathway activating eicosanoid biosynthesis shares its conserved upstream recognition components in a lepidopteran *Spodoptera exigua* upon infection by *Metarhizium rileyi*, an entomopathogenic fungus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 188: 107707. <https://doi.org/j.jip.2021.107707>.
- Ruiz-Nájera, R.E., Ruiz-Estudillo, R.A., Sánchez-Yañez, J.M., Molina-Ochoa, J., Skoda, S.R., Coutiño-Ruiz, R., Pinto-Ruiz, R., Guevara-Hernández, F., Foster, J.E. (2013). Occurrence of entomopathogenic fungi and parasitic nematodes on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae collected in central Chiapas, México. *Florida Entomologist*, 96: 498-503. <https://doi.org/10.1653/024.096.0215>.
- Rwomushana, I., Bateman, M., Beale, T., Beseh, P., Cameron, K., Chiluba, M., Clottey, V., Davis, T., Day, R., Early, R. (2018). Fall armyworm: Impacts and implications for Africa. Evidence Note Update. CABI, Oxfordshire, UK.
- Sarkowi, F.N., Mokhtar, A.S. (2021). The fall armyworm (FAW) *Spodoptera frugiperda*: A review on biology, life history, invasion, dispersion and control. *Outlooks on Pest Management*, 32: 27-32. https://doi.org/10.1564/v32_feb_07.
- Serna-Domínguez, M.G., Andrade-Michel, G.Y., Rosas-Valdez, R., Castro-Félix, P., Arredondo-Bernal, H.C., Gallou, A. (2019). High genetic diversity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in Colima, Mexico. *Journal of Invertebrate Pathology*, 163: 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.03.007>.
- Sevim, A., Demir, I., Demirbağ, Z. (2010). Molecular characterization and virulence of *Beauveria* spp. from the pine processionari moth, *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera: Thaumetopoeidae). *Mycopathologia*, 170: 269-277. <https://doi.org/10.1007/s11046-010-9321-6>.
- Shin, T.Y., Lee, M.R., Park, S.E., Lee, S.J., Kim, W.J., Kim, J.S. (2020). Pathogenesis-related genes of entomopathogenic fungi. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, e21747. <https://doi.org/10.1002/arch.21747>.
- Shrestha, S. (2019). Effects of climate change in agricultural insect pest. *Acta Scientific Agriculture*, 3: 74-80. <https://doi.org/10.31080/ASAG.2019.03.0727>.
- SIAP. (2020). <https://www.gob.mx/siap>

- Skendžić, S., Zovko, M., Živković, I., Lešić, V., Lemić, D. (2021). The impact of climate change on agricultural insect pest. *Insects*, 12: 440. <https://doi.org/10.3390/insects12050440>.
- Skinner, M., Parker, B.L., Kim, J.S. (2014). Role of entomopathogenic fungi in Integrated Pest Management. In: Abrol, D.P (Ed) (2014). Integrated Pest Management. Current concepts and ecological perspective. pp. 169-191.
- Sui, L., Zhu, H., Wang, D., Zhang, Z., Bidochka, M.J., Barelli, L., Lu, Y., Li, Q. (2024). Tripartite interactions of an endophytic entomopathogenic fungus, Asian corn borer, and host maize under elevated carbon dioxide. *Pest Management Science*, 80: 4575- 4584. <https://doi.org/10.1002/ps.8163>.
- Sun, S., Zhang, Z., Niu, H., Zhao, D., Liu, X., Guo, H. (2023). Characterization of entomopathogenic fungi from invasive fall armyworm in China and their risk to native pests. *Journal of Applied Entomology*. <https://doi.org/10.1111/jen.13142>.
- Tambo, J., Kansime, M.K., Mugambi, I., Rwomushana, I., Kenis, M., Day, R.K., Lamontagne-Godwin, J. (2020). Understanding smallholders' responses to fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) invasion: evidence from five African countries. *Science of the Total Environment*, 740: 140015. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140015>.
- Tang, S., Zeng, Z., Kang, R., Wei, Y., Tan, G., Chen, M., Wang, B., Tang, Z. (2025). Residue analysis and dietary risk assessment of 10 neonicotinoid insecticides in *Oenanth javanica* from Hainan province of China. *Foods*, 14:78. <https://doi.org/10.3390/foods14010078>.
- Tay, W.T., Meagher Jr RL., Czapak C., Groot AT. (2023). *Spodoptera frugiperda*: ecology, evolution, and management options of an invasive species. *Annual Review of Entomology*, 68: 299-317. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120220-102548>.
- Tejeda-Rico, G.E., Barrios-Trilleras, C.E., Diaz-Castro, R.J., Floirán-Martínez, L.V., Contreras-Arias, L.J., Padilla-Agudelo, J.L., Morales-Rodríguez, A. (2023). Biology, population fluctuation, and foliar consumption rate of *Durrantia arcanella* Busk, 1992 (Lepidoptera: Depressariidae) a defoliator of oil palm in the Colombian Caribbean. *Insects*, 14: 900. <https://doi.org/10.3390/insects14120900>.
- Thomas, S.R., Elkinton, J. (2004). Pathogenicity and virulence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85: 146-151. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.01.006>.

- Valero-Jiménez, C.A., Wiegers, H., Zwaan, B.J., Koenraadt, C.J., van Kan, J.A. (2016). Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 133: 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.11.011>.
- Visalakshi, M., Kishore, P., Chandra, V., Bharathalaxmi, M., Manisha, B.L., Upendhar, S. (2020). Studies on mycosis of *Metarhizium (Nomuraea) rileyi* on *Spodoptera frugiperda* infesting maize in Andhra Pradesh, India. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30: 135. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00335-9>.
- Wallis, C.M., Sisterson, M.S. (2024). Opportunities for optimizing fungal biological control agents for long-term and effective management of insect pests of orchards and vineyards: a review. *Frontiers in Fungal Biology*, 5: 1443343. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2024.1443343>.
- Wang, J.L., Yang, K.H., Li, X.L., Liu, J., Yu, Y.X., Liu, X.S. (2022). Infection of the entomopathogenic fungus *Metarhizium rileyi* suppresses cellular immunity and activates humoral antibacterial immunity of the host *Spodoptera frugiperda*. *Pest Management Science*, 78: 2828–2837. <https://doi.org/10.1002/ps.6907>.
- Wang, L., Wang, J., Zhang, X., Yin, Y., Li, R., Lin, Y., Deng, C., Yang, K., Liu, X., Wang, Z. (2021). Pathogenicity of *Metarhizium rileyi* against *Spodoptera litura* larvae: appressorium differentiation, proliferation in hemolymph, immune interaction, and reemergence of mycelium. *Fungal Genetics and Biology*, 150: 103508. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103508>.
- Wanjiru, J., Sunday, K. (2019). Ovicidal effects of entomopathogenic fungal isolates on the invasive fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Applied Entomology*, 143: 626–634. <https://doi.org/10.1111/jen.12634>.
- Wyckhuys, K. A. G., O’Neil, R. J. (2006). Population dynamics of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) and associated arthropod natural enemies in Honduran subsistence maize. *Crop Protection*, 25: 1180–1190. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.03.003>.
- Xu, P., He, Z., Gao, X., Zeng, X., Wei, D., Long, X., Yu, Y. (2025). Research on the expression of immune-related genes at different stages in the third-instar larvae of *Spodoptera frugiperda* infected by *Metarhizium rileyi*. *Insects*, 16: 199. <https://doi.org/10.3390/insects16020199>.
- Yang, X., Zhang, Y., Zhou, J., Dong, H., Bai, X., Liu, W., Gu, Z. (2024). Pathogenicity, infection process, physiological and biochemical effects on *Metarhizium rileyi* against

- Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 34:19. <https://doi.org/10.1186/s41938-024-00781-9>.
- Yang, Y.T., Lee, S.J., Nai, Y.S., Kim, J.S. (2020). Complete genome sequence of a novel putative RNA virus, RiPV-2, from the Bean Bug *Riptortus pedestris*. *Microbiology Resource Announcements*, 9: e01584-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.01584-19>.
- Yan-li, Zhang., Hui, D., Li-sheng, Z., Zu-min, G., Jin-cheng, Z. (2022). High virulence of naturally occurring entomopathogenic fungal isolates, *Metarhizium* (*Nomuraea*) *rileyi*, against *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Applied Entomology*. <https://doi.org/10.1111/jen.13007>.
- Yasin, M., Wakil, W., Ghazanfar, M.U., Qayyum, M.A., Tahir, M., Bedford, G.O. (2019). Virulence of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier). *Entomological Research*, 49: 3–12. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12260>.
- Zhang, L., Liu, Y., Yao, J., Wang, B., Huang, B., Li, Z., Fan, M., Sun, J. (2011). Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) isolates as potential agents for control of *Dendroctonus valens*. *Insect Science*, 18: 209-216. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2010.01361.x>
- Zhang, S., Chen, X., Luan, F., He, L., Pu, S., Li, Z. (2016). Genetic diversity and population structure of the Chinese fungus *Metarhizium rileyi* causing green muscardine in silkworm. *Journal of Invertebrate Pathology*, 140: 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.08.005>.
- Zhang, W., Li, H., Zhang, C., Hou, J., Guo, X., Dong, D., Li, X. (2024). Impact of maize nutrient composition on the developmental defects of *Spodoptera frugiperda*. *Agronomy*, 14: 1690. <https://doi.org/10.3390/agronomy14081690>.
- Zhang, Y., Dong, H., Zhang, L., Gu, Z., Zhou, J. (2022). High virulence of a naturally occurring entomopathogenic fungal isolate, *Metarhizium* (*Nomurea*) *rileyi*, against *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Applied Entomology*. <https://doi.org/10.1111/jen.13007>.
- Zhao, Y.X., Huang, J.M., Ni, H., Guo, D., Yang, F.X., Wang, X., Wu S.F., Gao, C.F. (2020). Susceptibility of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smmith), to eight insecticides in China, with special reference to *lambda-cyhalothrin*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 168: 104623. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104623>.

Yordanys Ramos González

Caracterización biológica y genética de *Metarhizium rileyi* (Farlow) aislado de poblaciones mexicanas

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::3117:472727772

Fecha de entrega

9 jul 2025, 8:04 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

9 jul 2025, 8:07 a.m. GMT-6

Nombre de archivo

Caracterización biológica y genética de *Metarhizium rileyi* (Farlow) aislado de poblaciones mexic....pdf

Tamaño de archivo

8.3 MB

85 Páginas

21.509 Palabras

119.560 Caracteres

17% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Fuentes principales

- 16%  Fuentes de Internet
- 9%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

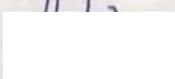
Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas	
Título del trabajo	Caracterización biológica y genética de <i>Metarhizium rileyi</i> (Farlow) aislado de poblaciones mexicanas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith): evaluación de un aislamiento en un ensayo de campo a pequeña escala	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	Yordany Ramos González	yordany.ramos@umich.mx
Director	Ana Mabel Martínez Castillo	ana.martinez@umich.mx
Codirector	Samuel Pineda Guillermo	samuel.pineda@umich.mx
Coordinador del programa	Omar Chassin Noria	omar.chassin @umich.mx

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	no	
Traducción al español	no	
Traducción a otra lengua	no	
Revisión y corrección de estilo	no	
Análisis de datos	no	
Búsqueda y organización de información	no	
Formateo de las referencias bibliográficas	no	
Generación de contenido multimedia	no	
Otro	no	

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Yordany Ramos González 
Lugar y fecha	Morelia, Michoacán 18/08/2025