REVISTA BIO CIENCIAS
http://revistabiociencias.uan.edu.mx
https://doi.org/10.15741/revbio.05.nesp.e444
ISSN 2007-3380

Original Article/Artículo Original

Ocurrencia natural de *Metarhizium rileyi* en larvas de *Spodoptera frugiperda* en el estado de Chihuahua

Natural occurrence of *Metarhizium rileyi* on *Spodoptera frugiperda* larvae in the state of Chihuahua

Ordóñez-García, M.[1], Bustillos-Rodríguez, J. C.[1], Berlanga-Reyes, D. I.[2], Cambero-Campos, O. J.[3], Salas-Marina, M. Á.[4], Estrada-Virgen, M. O.[3], Rios-Velasco, C.[2].

[1]Doctorado en Ciencias, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Cuauhtémoc. Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua, México. Av. Río Conchos S/N. Parque Industrial. C.P. 31570.
[2]Profesor-Investigador, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Cuauhtémoc. Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua, México. Av. Río Conchos S/N. Parque Industrial. C.P. 31570.
[3]Profesor-Investigador, Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit. Xalisco, Nayarit, México. Carretera Tepic-Compostela Km. 9. C.P. 63155.
[4]Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, División de Ingeniería. Carretera Villacorzo-Ejido Monterrey Km 3.0. Chiapas, México. C.P. 29000.

Cite this paper/Como citar este artículo: Ordóñez-García, M., Bustillos-Rodríguez, J. C., Berlanga-Reyes, D. I., Cambero-Campos, O. J., Salas-Marina, M. Á., Estrada-Virgen, M. O., Rios-Velasco, C. (2018). Natural occurrence of *Metarhizium rileyi* on *Spodoptera frugiperda* larvae in the state of Chihuahua *Revista Bio Ciencias* 5(nesp1), e444. doi: https://doi.org/10.15741/revbio.05.nesp.e444

ABSTRACT

The fall armyworm (FAW), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), is the main pest of maize (corn). Its control depends mainly on the use of chemical insecticides, which cause adverse effects on the environment and the health of agricultural workers. A viable alternative to these products is the use of biological control agents, such as entomopathogenic microorganisms, highlighting fungi among others. The fungus *Metarhizium rileyi* (Farlow) Kepler (Hypocreales: Clavicipitaceae), plays an important role in the population regulation of lepidopteran pests, causing natural epizootics when the conditions for its growth are optimal. The aim of the study was to determine the

RESUMEN

El gusano cogollero (FAW) *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), es considerado la principal plaga del maíz; su control depende principalmente del uso de insecticidas químicos, los cuales causan efectos adversos al ambiente y a la salud de los trabajadores agrícolas. Una alternativa viable a estos productos químicos, es el uso de agentes de control biológico, tales como microorganismos entomopatógenos, entre los cuales destacan los hongos. El hongo *Metarhizium rileyi* (Farlow) Kepler (Hypocreales: Clavicipitaceae), juega un papel importante en la regulación poblacional de lepidópteros, causando epizootias naturales cuando las condiciones para su crecimiento son óptimas. El objetivo de este estudio fue determinar la ocurrencia natural de *M. rileyi* sobre larvas de *S. frugiperda* en maíz. Se recolectaron 452 larvas de *S. frugiperda* de diferentes estadios en una parcela de maíz en el municipio de Cusihuiriachi, Chihuahua, México, en agosto y septiembre de 2017, donde se registró

Article Info/Información del artículo
Received/Recibido: December 19th 2017.
Accepted/Aceptado: May 18th 2018.
Available on line/Publicado: October 17th 2018.

Corresponding Author:
Claudio Rios Velasco. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Cuauhtémoc. Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua, México. Av. Río Conchos S/N. Parque Industrial. C.P. 31570. E-mail: claudio.rios@ciad.mx

natural occurrence of *M. rileyi* fungus on *S. frugiperda* larvae in a corn plot. Four hundred fifty-two FAW larvae from all instars were collected from an infested maize (corn) plot from Cusihuiriachi municipality, Chihuahua in August and September 2017, where the number of larvae with mycosis was recorded. The fungi *M. rileyi* and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Cordycipitaceae) were identified according to their macroscopic and microscopic morphological characters. Temperature, relative humidity (RH) and accumulated precipitation were obtained from the weather stations of Unifrut and INIFAP. The highest percentage (48 %) of mycosed larvae by *M. rileyi* was obtained during the sample performed in August, where temperature and RH average were 16.76 °C and 80.1 %, respectively, and an accumulated precipitation of 218 mm. These results suggest that the climatic conditions were optimal for the development of the fungal epizootic on field.

KEY WORDS

Corn, fall armyworm, biological control, entomopathogenic fungi.

Introduction

The fall armyworm (FAW) *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) is the most important pest of maize in America (Portillo *et al*., 1991). Its conventional control involves the application of chemical insecticides. However, the incorrect use of these pesticides has caused multiple problems of intoxication towards farmers and generated resistance by the pest (Tinoco *&* Halperin, 1998; Ahmad *et al*., 2007). Given to above, alternatives to the use of chemical insecticides have been searched for, fostering the use of *S. frugiperda* biological control agents, such as parasitoids, predators, nematodes, fungi, bacteria and viruses among others (Molina-Ochoa *et al*., 2003; Negrisoli *et al*., 2010; Rios-Velasco *et al*., 2011). Entomopathogenic fungi play an important role in decreasing pest populations, causing epizootics when agroclimatic conditions are optimal for fungus growth, as well as pest population densities (Thorvilson, 1984; Sujeetha *&* Sahayaraj, 2014). *Metarhizium* genus has been reported as a entomopathogenic genus causing natural epizootics in various pest insects (Vázquez-Moreno *&* Elósegui-Claro, 2011). The biological activity of this genus has been widely studied due to its agricultural

el número de larvas micosadas. Los hongos *M. rileyi* y *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Cordycipitaceae), se identificaron de acuerdo con sus caracteres morfológicos macro y microscópicos. La temperatura, humedad relativa (RH) y precipitación acumulada, se obtuvieron de estaciones meteorológicas de Unifrut e INIFAP. El mayor porcentaje (48 %) de larvas micosadas por *M. rileyi,* se obtuvo durante el muestreo de agosto, donde se registraron promedios de temperatura y RH de 16.76 °C y 80.1 %, respectivamente, así como una precipitación acumulada de 218 mm. Estos resultados sugieren que las condiciones climatológicas fueron las óptimas para el desarrollo de la epizootia en campo.

PALABRAS CLAVE

Maíz, gusano cogollero, control biológico, hongos entomopatógenos.

Introducción

El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), es la principal plaga del maíz en América (Portillo *et al*., 1991). Su control convencional involucra la aplicación de insecticidas químicos. Sin embargo, el uso incorrecto de estos, ha generado múltiples problemas de intoxicación hacia los agricultores y resistencia por parte de la plaga (Tinoco *&* Halperin, 1998; Ahmad *et al*., 2007). Dado lo anterior, se han buscado alternativas a la utilización de insecticidas químicos, propiciando el uso de agentes de control biológico de *S. frugiperda*, dentro de los cuales se encuentran parasitoides, depredadores, nematodos, hongos, bacterias y virus (Molina-Ochoa *et al*., 2003; Negrisoli *et al*., 2010; Rios-Velasco *et al*., 2011). Los hongos entomopatógenos juegan un papel importante en la reducción de poblacional de la plaga, causando epizootias cuando las condiciones agroclimáticas son óptimas para el crecimiento de los hongos, así como las densidades poblacionales de la plaga (Thorvilson, 1984; Sujeetha *&* Sahayaraj, 2014). El género *Metarhizium* ha sido reportado como entomopatógeno causante de epizootias en diversos insectos plaga (Vázquez-Moreno *&* Elósegui-Claro, 2011). La actividad biológica de este género, ha sido ampliamente evaluada por ser de gran importancia agrícola (Zhang *et al*., 2016; Mochi *et al*., 2017). Aunque el género *Metarhizium* está bien definido, la delimitación de las especies es difícil, debido a la gran variación en el rango de hospederos y el tamaño de

importance (Zhang *et al*., 2016; Mochi *et al*., 2017). Although the *Metarhizium* genus is well defined, the delimitation of the species is difficult due to the great variation in the host range and in conidia size (White *et al*., 2003). In 2014 a phylogenetic analysis indicated that fungal isolates identified as *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson (Hypocreales: Clavicipitaceae) belonged to the *Metarhizium* genus (Kepler *et al*., 2014; Baral, 2017). *Metarhizium rileyi* (Farlow) Kepler frequently causes natural epizootics in lepidopteran populations, especially from the Noctuidae family, in different subtropical and temperate agroecosystems, reducing larval populations, which makes it an excellent biocontroller for its high virulence (Boucias *et al*., 2000; Inglis *et al*., 2001; Devi *et al*., 2003; Suwannakut *et al*., 2005). The aim of the study was to determine the natural occurrence of *M. rileyi* on *S. frugiperda* larvae in corn plots from Chihuahua, Mexico.

Material and Methods

Sampling area

Samplings were carried out in a corn (*Zea mays,* L.) plot, free from the use of chemical insecticides in the locality of Ojo de Agua (28º12'57''N; 107º1'48''W, 2,129 masl) belonging to Municipality of Cusihuiriachi, Chihuahua, Mexico. Plants were randomly chosen at 70 and 100 days after sowing (physiological stages 2-4), respectively.

Larvae collection

FAW larvae from all instars of *S. frugiperda* were collected on two sampling dates (August 26th and September 22nd, 2017) (Table 1). Larvae were transferred to the Laboratory of Postharvest Physiology, Plant Pathology and Biological Control of the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), Cuauhtémoc Unit, Chihuahua, Mexico and were individually maintained under controlled conditions (26 ± 2 °C, with a RH > 70 % and a 12:12 L:D photoperiod) in 1 oz plastic cups (Solo, Dart Containers) containing an artificial diet (Southland Products Incorporated). Larvae were systematically checked every 24 hours until they showed mycosis, parasitism or until they reached adulthood.

Obtaining parasitoids

Emerged parasitoids were collected and maintained in 70 % ethanol and then they were classified according to the taxonomic keys of Wharton *et al*. (1997), las conidias (White *et al*., 2003). En el año 2014, un análisis filogenético indicó que los aislados fúngicos identificados como *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson (Hypocreales: Clavicipitaceae), pertenecían al género *Metarhizium* (Kepler *et al*., 2014; Baral, 2017). *Metarhizium rileyi* (Farlow) Kepler, frecuentemente causa epizootias naturales en poblaciones de lepidópteros de la familia Noctuidae, en diferentes agroecosistemas subtropicales y templados, reduciendo las poblaciones de larvas, lo que lo hace un excelente agente biocontrolador, dada su alta virulencia (Boucias *et al*., 2000; Inglis *et al*., 2001; Devi *et al*., 2003; Suwannakut *et al*., 2005). El objetivo del estudio, fue determinar la ocurrencia natural de *M. rileyi* sobre larvas de *S. frugiperda* en maíces de Chihuahua, México.

Material y Métodos

Zona de muestreo

Los muestreos se realizaron en una parcela de maíz *Zea mays* (L.) con historial libre de uso de insecticidas químicos, en la localidad de Ojo de Agua (28º12'57'' N; 107º1'48'' O, 2,129 msnm), municipio de Cusihuiriachi, Chihuahua, México. Las plantas se eligieron al azar a los 70 y 100 días después de la siembra (etapas fisiológicas 2-4), respectivamente.

Recolección de larvas

Se recolectaron larvas de todos los instares de *S. frugiperda* en dos fechas de muestreo (26 de agosto y 22 de septiembre de 2017) (Tabla 1). Las larvas se trasladaron al Laboratorio de Fisiología de Poscosecha, Patología Vegetal y Control Biológico del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD), Unidad Cuauhtémoc, Chihuahua, México, y fueron mantenidas individualmente bajo condiciones controladas (26 ± 2 °C, con una RH > 70 % y un fotoperiodo 12:12 L:D), en vasos de plástico de 1 oz (Solo, Dart Containers), conteniendo dieta artificial (Southland Products Incorporated). Las larvas se revisaron sistemáticamente cada 24 horas, hasta observar micosis, parasitismo o hasta que llegaran a la etapa adulta.

Obtención de parasitoides

Los parasitoides emergidos, se recolectaron y se conservaron en etanol al 70 %, para después ser clasificadas de acuerdo con las claves taxonómicas de Wharton *et al*. (1997), con la ayuda de un estereoscopio (Leica G26). El porcentaje de parasitismo, se calculó con

under a stereoscope (Leica G26). The percentage of parasitism was calculated based on the number of parasitized larvae divided by the total of collected larvae × 100 (Pair *et al*., 1996).

Isolation of entomopathogenic fungi

FAW larvae that showed mycosis were placed in humid chambers to induce mycelial growth and sporulation. Subsequently, larval mycelium was taken and inoculated in Petri dishes that contained potato dextrose agar (PDA-Bioxon®) culture medium and were incubated at 28 ± 2 °C (Precision Scientific) until its growth, colonies with typical characteristics of the fungi *Metarhizium* and *Beauveria* were purified by means of the hypha point technique.

Morphological identification of entomopathogenic fungi

Fungi mycelia were mounted, stained with lactophenol blue, observed under an optical microscope (AxioScope, Carl Zeiss) at 1,000x magnifications and were identified according to their macro- and microscopic characters, using the taxonomic keys of Barnett *&* Hunter (2006).

Record of climatic conditions

Temperatures and RH recorded during the sampling period were taken from the weather station "La Capilla Cusihuiriachi" Unifrut (Unión Agrícola Regional de Fruticultores del Estado de Chihuahua). The accumulated precipitation of August and September 2017 was obtained from a weather station of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) near the experimental area (INIFAP, 2017; UNIFRUT, 2017).

Results and Discussion

Four hundred fifty-two *S. frugiperda* larvae were collected, 198 (43.8 %) of these larvae showed mycosis caused by *M. rileyi* and *B. bassiana*, 25 larvae were parasitized by *Meteorus* sp. (5.5 %) and 65 (14.38 %) died from unknown causes. *Meteorus* has been reported as a parasitoid of some pest lepidopterans of the Noctuidae family such as *S. frugiperda*, *S. litoralis*, *S. exigua*, *Agrotis ipsilon*, among others, with different parasitism rates (Caballero *et al*., 1990; Caballero *et al.,* 1992; Estrada-

base en el número de larvas parasitadas, dividida entre el total de larvas recolectadas por 100 (Pair *et al*., 1996).

Aislamiento de hongos entomopatógenos

Las larvas FAW que mostraron micosis, se colocaron en cámaras húmedas, para inducir el crecimiento micelial y la esporulación. Posteriormente se tomó parte del micelio de las larvas y se sembró en cajas de Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA-Bioxon®), y se incubaron a 28 °C ± 2 °C (Precision Scientific) hasta su crecimiento, las colonias con características típicas del hongo se purificaron mediante la técnica de punta de hifa (Agrios, 2005).

Identificación morfológica de los hongos entomopatógenos

A partir del crecimiento micelial de los hongos, se realizaron montajes, se tiñeron con azul de lactofenol y se observaron bajo un microscopio óptico (AxioScope, Carl Zeiss) a 1,000x magnificaciones y se identificaron de acuerdo con sus caracteres macro y microscópicos, empleando las claves taxonómicas de Barnett *&* Hunter (2006).

Registro de condiciones climáticas

Las temperaturas y RH durante el periodo de muestreo, se tomaron de la estación meteorológica más próxima al sitio experimental que fue "La Capilla Cusihuiriachi", Unifrut (Unión Agrícola Regional de Fruticultores del Estado de Chihuahua). La precipitación acumulada de los meses de agosto y septiembre de 2017, se obtuvo de una estación meteorológica del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), cercana al sitio experimental (INIFAP, 2017; UNIFRUT, 2017).

Resultados y Discusión

Se recolectaron 452 larvas de *S. frugiperda*, de las cuales, 198 (43.8 %), mostraron micosis causada por *M. rileyi* y *B. bassiana*, 25 larvas fueron parasitadas por *Meteorus* sp. (5.5 %), y 65 (14.38 %) murieron por causas desconocidas. *Meteorus,* ha sido reportado como parasitoide de algunos lepidópteros, plaga de la familia Noctuidae como *S. frugiperda, S. litoralis, S. exigua, Agrotis ipsilon*, entre otros, con niveles de parasitismo variables (Caballero *et al*., 1990; Caballero *et al.,* 1992; Estrada-Virgen *et al*., 2013). En larvas de *S. frugiperda*, los niveles de parasitismo también han

Virgen *et al*., 2013). In *S. frugiperda* larvae, parasitism rates recorded in Mexico have also been variable. In this regard, Cortez-Mondaca *et al*. (2010) recorded 11 % in Sonora, a higher percentage (4.4 times) than 2.5 % found by García-Gutiérrez *et al*. (2013) in the valleys of Durango, Mexico.

In the August sampling, the number of larvae infected by *M. rileyi* and *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Cordycipitaceae) was of 120 (48.0 %) and 9 (3.6 %), respectively, while, in September, 59 (29.2 %) larvae infected by *M. rileyi* were found and another 10 (5.0 %) by *B. bassiana* (Table 1). *Metarhizium rileyi*, has been reported infecting larvae of nocturnal lepidopteran species, such as *Anticarsia gemmatalis* Hübner, *Helicoverpa zea* (Boddie), *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera sunia* (Guenee), *Trichoplusia brassicae* (Hiibner) and *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), in various agroecosystems (Vázquez-Moreno & Elósegui-Claro, 2011; Namasivayam *et al*., 2013).

In August, an average temperature of 16.76 °C, 80.1 % RH, and an accumulated rainfall of 218 mm were recorded. While, in September there was an average temperature (16.7 ° C) equal to the one of August; however, the RH and the accumulated rainfall were lower, with 68.1 % and 55 mm, respectively. The percentage of specimens of *S. frugiperda* mycosed by *M. rileyi* was higher in the first sampling, attributed to the high RH and rainfall that may have triggered the occurrence of epizootics. In addition, the high incidence of *M. rileyi* on *S. frugiperda* larvae was possibly due to its pathogenicity and virulence and/or to the lower hydrophobicity of their conidia, which allow them to remain adherent to plants foliage, an area in which *S. frugiperda* spends most of its larval stage, which increases the probability of being infected. On the contrary, *B. bassiana* conidia are more hydrophobic, so they are more easily dragged towards the ground by the action of rain or wind and, therefore, the probability of making contact with the larvae decreases (Boucias & Pendland, 1998).

In this regard Ignoffo & García (1985) and Kish & Allen (1978) mentioned that some of the factors that favor *M. rileyi* growth and that cause the occurrence of epizootics are periods of high RH (≥ 70 %) and the presence of wind inducing the dispersion of infective conidia. Another determining factor is rain, which allows conidia

sido variables en México. Al respecto Cortez-Mondaca *et al*. (2010), registraron un 11 % en Sonora, México; porcentaje superior (4.4 veces) al 2.5 % encontrado por García-Gutiérrez *et al*. (2013) en los valles de Durango, México.

Durante el muestreo en agosto, el número de larvas infectadas por *M. rileyi* y *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Cordycipitaceae), fue de 120 (48.0 %) y 9 (3.6 %), respectivamente, mientras que en septiembre se encontraron 59 (29.2 %) larvas infectadas por *M. rileyi* y 10 (5.0 %) por *B. bassiana* (Cuadro 1). *Metarhizium rileyi,* se ha reportado infectando a larvas de especies de lepidópteros noctuidos, tales como *Anticarsia gemmatalis* Hübner, *Helicoverpa zea* (Boddie), *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera sunia* (Guenee), *Trichoplusia brassicae* (Hiibner) y *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), en diversos agroecosistemas (Vázquez-Moreno & Elósegui-Claro, 2011; Namasivayam *et al*., 2013).

En agosto, se registró una temperatura promedio de 16.76 °C, RH del 80.1 %, y una precipitación acumulada de 218 mm. Mientras que en septiembre, se presentó una temperatura promedio (16.7 °C), igual a la de agosto; sin embargo, la RH y la precipitación acumulada fueron menores, registrándose 68.1 % y 55 mm, respectivamente. El porcentaje de especímenes de *S. frugiperda* micosados por *M. rileyi,* fue mayor en el primer muestreo, atribuido a la alta RH y precipitación pluvial que pudieron detonar la ocurrencia de la epizootia. Aunado a esto, la alta incidencia de *M. rileyi* sobre larvas de *S. frugiperda*, posiblemente se debió a su patogenicidad y virulencia, y/o a la hidrofobicidad menor que muestran sus conidias, permitiéndoles permanecer adheridas al follaje de las plantas, área en la que *S. frugiperda* pasa la mayor parte de su etapa larval, lo que incrementa la probabilidad de infectarse. Contrariamente, las conidias de *B. bassiana* son más hidrofóbicas, por lo que son fácilmente arrastradas hacia el suelo por la acción de la lluvia o viento, y por ende, la probabilidad de entrar en contacto con las larvas decrece (Boucias & Pendland, 1998).

Al respecto Ignoffo & García (1985) y Kish & Allen (1978), mencionan que algunos de los factores que favorecen el crecimiento de *M. rileyi* y que ocasionan la ocurrencia de epizootias son los periodos de alta RH (≥ 70 %), y la presencia de viento que induzca la dispersión de las conidias infectivas. Otro factor determinante es la lluvia, permitiendo que las conidias sean arrastradas a través del suelo y la planta, promoviendo la infección, aunado a las características del huésped, la patogenicidad y virulencia del entomopatógeno, y el impacto de las actividades antropogénicas, particularmente en los agroecosistemas

Tabla 1.
Incidencia de enemigos naturales en larvas de *Spodoptera frugiperda,* énfasis en hongos entomopatógenos.

Table 1.
Incidence of natural enemies of *Spodoptera frugiperda*, emphasis on entomopathogenic fungi.

Plot	Date (Day and month)	Total number of larvae	Parasitized larvae (*Meteorus* sp.)	Entomopathogenic fungi		Adults	Unknown causes of death
				M. rileyi	*B. bassiana*		
Ojo de agua	26-Ago	250	12	120	9	74	35
	22-Sep	202	13	59	10	90	30
Total		452	25	179	19	164	65

to be dragged through the soil and the plant, promoting infection, together with the characteristics of the host, the pathogenicity and virulence of entomopathogens, and the impact of anthropogenic activities, particularly in agroecosystems (Kish & Allen, 1978; Kubicek & Druzhinina, 2007). Inglis *et al*. (2001) emphasized that physiological and morphological factors also influence the susceptibility of insect pests to entomopathogenic fungi, among them, their population density, developmental stage, nutrition and exposure to injuries caused by mechanical, chemical or non-microbial (predators and parasitoids) agents. Naturally, *M. rileyi* has been found causing epizootics in various lepidopterans species. Rios-Velasco *et al*. (2010) found *M. rileyi* causing epizootics in *S. frugiperda* larvae in corn in the state of Coahuila, Mexico. Duarte-da Costa *et al*. (2015) reported the natural occurrence of this fungus in *Helicoverpa armigera* (Hübner) larvae in Brazil, causing 33.1 % of mortality. Ruiz-Nájera *et al*. (2013) and Ordoñez-García *et al*. (2015) reported *M. rileyi* causing mycosis in *S. frugiperda* larvae in Chiapas and Chihuahua, Mexico, however incidence rates were 3.05 % and 8.6 %, respectively. At the beginning of the infection, *S. frugiperda* larvae infected by *M. rileyi* were stiff previously to the whitish initial mycosis, which finally became green due to spores production (Figure 1). It should be noted that entomopathogenic fungi that cause natural epizootics persist in the soil as mycelium or conidia inside insect cadavers (Charnley & Collins, 2007). According to Nicholls (2008), after 5 to 6 days post-infection, hyphal bodies were developed in the hemocele, blood and adipose cells, causing the death of the

(Kish & Allen, 1978; Kubicek & Druzhinina, 2007). Inglis *et al*. (2001), enfatizan que los factores fisiológicos y morfológicos, también influyen en la susceptibilidad de las plagas insectiles a los hongos entomopatógenos, entre ellos, su densidad poblacional, estado de desarrollo, nutrición y exposición a lesiones causadas por agentes mecánicos, químicos o no microbianos (depredadores y parasitoides). De manera natural, se ha encontrado a *M. rileyi* causando epizootias en diversas especies de lepidópteros. Rios-Velasco *et al*. (2010) encontraron a *M. rileyi* causando epizootias en larvas de *S. frugiperda,* en maíz en el estado de Coahuila, México. Duarte-da Costa *et al*. (2015), reportaron la ocurrencia natural de este hongo en larvas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) en Brasil, causando un 33.1 % de mortalidad. Ruiz-Nájera *et al*. (2013) y Ordóñez-García *et al*. (2015), reportaron a *M. rileyi* causando micosis en larvas de *S. frugiperda* en Chiapas y Chihuahua, México, sin embargo, los porcentajes de incidencia fueron de 3.05 % y 8.6 %, respectivamente. Al inicio de la infección, las larvas de *S. frugiperda* infectadas por *M. rileyi,* presentaron rigidez, previo a la micosis inicial de color blanquecino, que finalmente se tornó verde debido a la producción de esporas (Figura 1). Cabe señalar, que los hongos entomopatógenos que causan epizootias naturales persisten en el suelo como micelio o conidias dentro de cadáveres de insectos (Charnley & Collins, 2007). De acuerdo con Nicholls (2008), después de 5 a 6 días post-infección, se desarrollan cuerpos hifales en el hemocele, en las células sanguíneas y adiposas, causando la muerte del insecto, finalmente los cuerpos hifales invaden el cadáver y dan origen a los conidióforos, fiálides y conidias (Figura 1 y 2).

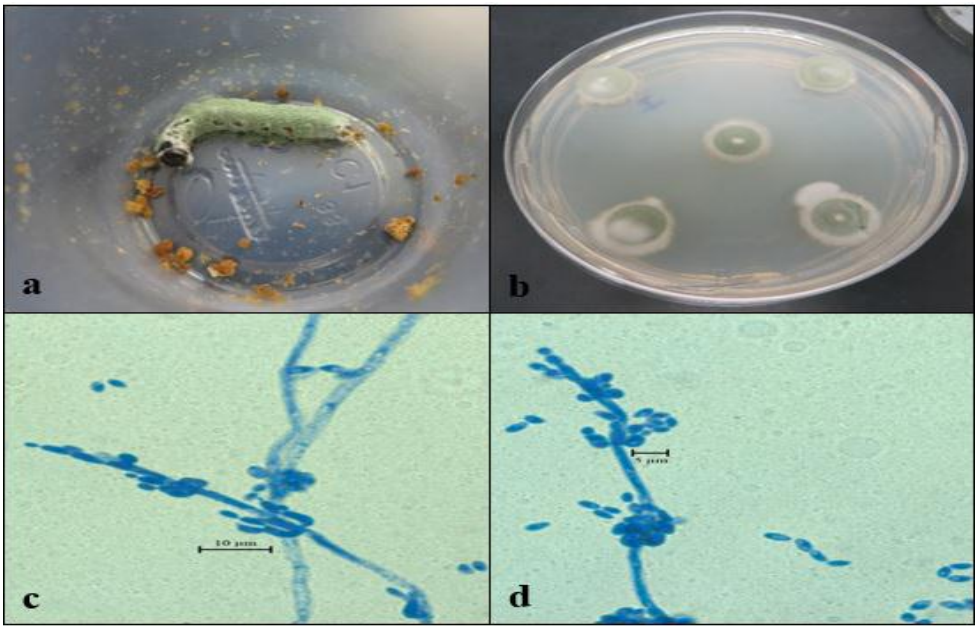

Figure 1. Infective development of the entomopathogenic fungus *Metarhizium rileyi* on *Spodoptera frugiperda* larvae. a) rigid dead larva; b) appearance of mycelium; c) complete mycosis; d) initial sporulation; e) production of spores.

Figura 1. Desarrollo infectivo del hongo *Metarhizium rileyi* sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*. a) larva rígida; b) inicio de la micosis; c) micosis abundante; d) inicio de esporulación; e) esporulación completa.

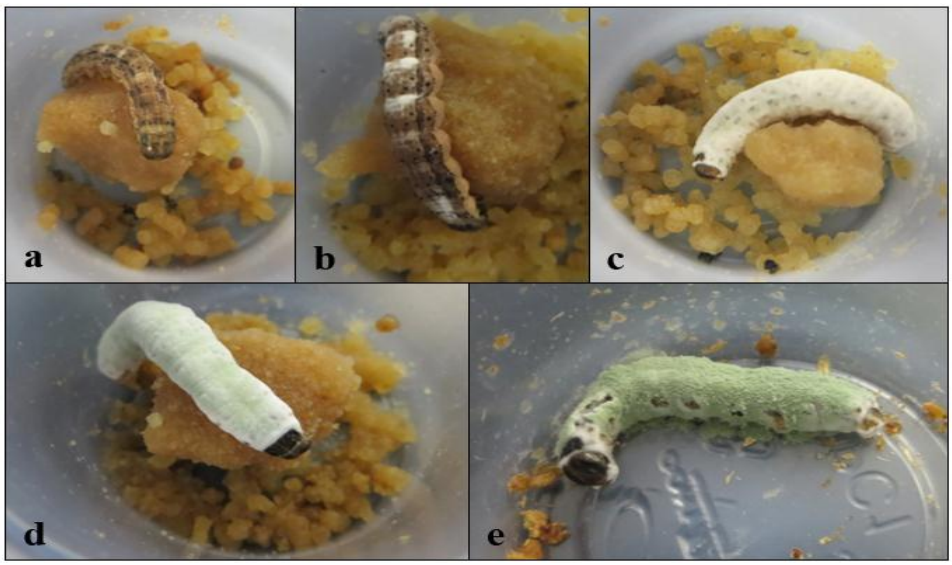

Figura 2. Infección de *Spodoptera frugiperda* por *Metarhizium rileyi*, a) larva micosada; b) morfología macroscópica del crecimiento del hongo en medio PDA; c) y d) morfología microscópica del hongo donde se observan las fiálides y conidias tomado en 1,000x magnificaciones.

Figure 2. Infection of *Spodoptera frugiperda* by *Metarhizium rileyi*, a) mycosed larva; b) macroscopic morphology of the fungus grown in PDA medium; c) and d) microscopic morphology of the fungus showing phialides and conidia at 1,000x magnifications.

insect, finally, these hyphal bodies invade the cadaver and give rise to the production of conidiophores, phialides and conidia (Figure 1, 2).

The macroscopic characteristics of the growth of *M. rileyi* on infected larvae and in the culture medium were similar, showing a whitish coloration at the beginning and olive green at the end due to the formation of spores (Figure 1). The isolates produced grayish-green, short-chain phialides and ovoid conidia (Figure 2) (Humber, 1997; Bosa *et al*., 2004).

Conclusion

The highest incidence of the *M. rileyi* fungus occurred in the sampling performed in August 2017, which could be favored by the climatic conditions, especially the high rainfall and an RH greater than 80 %, contributing to dispersion and favoring the growth of the fungus. These conditions could cause new epizootics during the rainy season with high populations of the pest.

Las características macroscópicas del crecimiento de *M. rileyi* sobre larvas infectadas y en el medio de cultivo, fueron similares, mostrando una coloración blanquecina al inicio y verde oliváceo al final por la formación de esporas (Figura 1). Los aislados produjeron fiálides y conidias ovoides (Figura 2) de color verde grisáceo y en cadenas cortas (Humber, 1997; Bosa *et al*., 2004).

Conclusión

Sé encontró una alta incidencia del hongo *M. rileyi* durante el muestreo realizado en agosto de 2017, lo cual pudo ser favorecido por las condiciones climatológicas que se presentaron, principalmente la alta precipitación y una RH superior al 80 %, contribuyendo con la dispersión y favoreciendo el crecimiento del hongo. Estas condiciones podrían ocasionar nuevas epizootias en temporada de lluvias con altas poblacionales de la plaga.

References

Agrios, G.N. (2005). Plant Pathology. Fifth Edition. Elsevier Academic Press. New York. USA. 922 p.

Ahmad, M., Arif, M. I. *and* Ahmad, M. (2007). Occurrence of insecticide resistance in field populations of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan. *Crop Protection*, 26(6): 809-817. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.07.006

Baral, B. (2017). Evolutionary trajectories of entomopathogenic fungi ABC transporters. (Cap. 4) *En*: Advances in genetics. Friedmann, T., Dunlap, J. C., Goodwin, S. F. (Editores). Academic Press, Cambridge, MA, 124 p. https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2017.07.002

Barnett, L.H. & Hunter, B.B. (2006). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.

Bosa, O. C. F., Chávez, O., Torres, L., París, A. Villamizar, L. *and* Cotes, Y. A. M. (20049. Evaluación de aislamientos nativos de *Nomuraea rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología,* 30(1): 93–97. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-04882004000100014&script=sci_arttext&tlng=en

Boucias, D.G., & Pendland, J. C. (1998). Principles of insect pathology. Chapter 10. Entomopathogenic fungi: fungi imperfecti, Springer. New York, USA. 321-329 p. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4915-4_10

Boucias, D., Stokes, C., Suazo, A. and Funderburk, J. (2000). AFLP analysis of the entomopathogen *Nomuraea rileyi*. *Mycologia*, 92(4): 638-648. https://doi.org/10.1080/00275514.2000.12061204

Caballero, P., Vargas-Osuna, E., Aldebis, H.K. *and* Santiago-Alvares, C. (1990). Parásitos asociados a poblaciones naturales de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) y *Spodoptera exigua* (Hb) (Lepidoptera: Noctuidae). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 16: 91-96. https://www.researchgate.net/profile/Enrique_Vargas_Osuna/publication/28162175_Parasitos_asociados_a_poblaciones_naturales_de_Spodoptera_littoralis_Boisduval_y_S_exigua_Hb_Lepidoptera_Noctuidae/links/09e41506ee6974d457000000/Parasitos-asociados-a-poblaciones-naturales-de-Spodoptera-littoralis-Boisduval-y-S-exigua-Hb-Lepidoptera-Noctuidae.pdf

Caballero, P., Vargas-Osuna, E. *and* Santiago, C. (1992). Biología de *Meteorus rubens* (Hymenoptera: Braconidae), parasitoide primario de *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae). *Entomophaga* 37(2): 301-309. https://doi.

org/10.1007/BF02372431

Charnley, A. K. & Collins, S. A. (2007). Entomopathogenic fungi and their role in pest control. *In* C. P. Kubicek & I. S. Druzhinina (Eds.), *Environmental and microbial relationships* (2nd ed., Vol. 4, pp. 159-181). New York: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-71840-6_10

Cortez-Mondaca, E., Armenta-Cárdenas, I. *and* Bahena-Juárez, F. (2010). Parasitoides y porcentaje de parasitismo sobre el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) en el Sur de Sonora. *Southwestern Entomologist*, *35*(2): 199-203. https://doi.org/10.3958/059.035.0209

Duarte-da Costa, V. H., Soares, M. A., Rodríguez, F. A. D., Zanuncio, J. C., da Silva, I. M. *and* Valicente, F. H. (2015). *Nomuraea rileyi* (Hypocreales: Clavicipitaceae) in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Brazil. *Florida Entomologist*, 98(2): 796-798 https://doi.org/10.1653/024.098.0263

Devi, P. V., Prasad, Y. G., Chowdary, D. A., Rao, L. M. *and* Balakrishnan, K. (2003). Identification of virulent isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (F) Samson for the management of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Mycopathologia*, 156(4): 365-373. https://doi.org/10.1023/B:MYCO.0000003578.38483.34

Estrada-Virgen, O., Cambero-Campos, J., Robles-Bermúdez, A., Rios-Velasco, C., Carvajal-Cazola, C., Isiordia-Aquino, N. *and* Ruíz-Cancino, E. (2013). Parasitoides y entomopatógenos nativos asociados al gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en Nayarit, México. *Southwestern Entomologist* 38: 339-344. http://dx.doi.org/10.3958/059.038.0216

García-Gutiérrez, C., González-Maldonado, M. B. *and* González-Hernández, A. (2013). Parasitismo natural de Braconidae e Ichneumonidae (Hymenoptera) sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología,* 39 (2): 211-215. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882013000200006

Humber, R. A. (1997). Fungi: identification. Chapter 4. *In*: *Manual of techniques in insect pathology.* Lacey, L. A. (Editor) *Academic, San Diego, CA*, 153-185.

Ignoffo, C.M. & García, C. (1985). Hosts spectrum and relative virulence of an Ecuadoran and Mississipian biotype of *Nomuraea rileyi*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 45: 346-352 https://doi.org/10.1016/0022-2011(85)90113-2

Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M. *and* Strasser, H. (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In T. M. Butt, C. W. Jackson & M. N. (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents* (Vol. 1, pp. 23-69). London, U . K.: CABI Publishing.

INIFAP. (Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícolas y Pesqueras) (2017). Clima. Precipitación en el año. [Last Cheked December 2017].

Kepler, R. M., Humber, R. A., Bischoff, J. F. *and* Rehner, S. A. (2014). Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Journal Mycologia,* 106(4): 811-829. https://doi.org/10.3852/13-319

Kish, L. P. & Allen, G. E. (1978). The biology and ecology of *Nomuraea rileyi* and a program for predicting its incidence on *Anticarsia gemmatalis* in soybean. *Boletín. Florida Agricultural Experiment Station*, No. 795. 44 p.

Kubicek, C. P. & Druzhinina, I. S. (Eds.). (2007). *Environmental and microbial relationships* (Vol. 4). Springer Science & Business Media. 183 p. https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=E9RjQnMduaQC&oi=fnd&pg=PA5&dq=Environmental+and+microbial+relationships+(Vol.+4)&ots=6EjB1XUMWj&sig=akaEtkitjOmNIjUHA7Ctmqa5fi0#v=onepage&q=Environmental%20and%20microbial%20relationships%20(Vol.%204)&f=false

Mochi, D. A., Monteiro, A. C., Pietro, R. C. L. R., Corrêa, M. A. *and* Barbosa, J. C. (2017). Compatibility of *Metarhizium anisopliae* with liposoluble photoprotectants and protective effect evaluation against solar radiation. *Bioscience Journal,* 33(4): 1028-1037. https://doi.org/10.14393/BJ-v33n4a2017-34080

Molina-Ochoa, J., Carpenter, J.E., Heinrichs, E.A. *and* Foster, J.E. (2003). Parasitoids and parasites of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas and Caribbean basin: an inventory. *Florida Entomologist*, 86(3): 254–289. https://doi.org/10.1653/0015-4040(2003)086[0254:PAPOSF]2.0.CO;2

Namasivayam, K. R., Bharani, R. S. A. *and* Ansari, M. R. (2013). Natural occurrence of potential fungal biopesticide *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson associated with agriculture fields of Tamil Nadu, India and it's compatibility with metallic nanoparticles. *Journal of Biofertilizers and Biopesticides*, *4*: 132-139. https://www.researchgate.net/profile/Selvaraj_Karthick_Raja_Namasivayam/publication/265729623_Biofertilizers_Biopesticides/links/541a6d030cf25ebee988968e/Biofertilizers-Biopesticides.pdf

Negrisoli, A. S., García, M. S. *and* Negrisoli, C. R. B. (2010). Compatibility of entomopathogenic nematodes (Nematoda:

Rhabditidae) with registered insecticides for *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. *Crop Protection*, 29(6): 545-549. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.12.012

Nicholls, C. I. (2008). Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Editorial Universidad de Antioquia. 282 p. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=LPwcidQx3TkC&oi=fnd&pg=PR13&dq=Nicholls,+C.+I.+(2008).+Control+biol%C3%B3gico+de+insectos:+un+enfoque+agroecol%C3%B3gico.+Editorial+Universidad+de+Antioquia.+282+p&ots=n_ialUZ174&sig=ZcgCX9XewViXGS7PJeg16n1VPms#v=onepage&q&f=false

Ordóñez-García, M., Rios-Velasco, C., Berlanga-Reyes, D. I., Acosta-Muñiz, C. H., Salas-Marina, M. Á. *and* Cambero-Campos, O. J. (2015). Occurrence of natural enemies of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Chihuahua, Mexico. *Florida Entomologist*, 98(3), 843-847. https://www.jstor.org/stable/24587732

Pair, S. R., Raulston, J. R., Sparks, A.N. *and* Martin, P. B. (1986). Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) parasitoids: differential spring distribution and incidence on corn and sorghum in the southern United States and northeastern Mexico. Environmental Entomology, 15: 342-348. https://doi.org/10.1093/ee/15.2.342

Portillo, H. E., Pitre, H. N., Meckenstock, D. H. *and* Andrews, K. L. (1991). Langosta: a lepidopterous pest complex on sorghum and maize in Honduras. *Florida Entomologist*, 74(2): 287-296. https://doi.org/10.2307/3495308

Rios-Velasco C., Cerna-Chávez E., Sánchez-Peña S. *and* Gallegos-Morales G. (2010). Natural epizootic of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson infecting *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Coahuila México. *Journal of Research on the Lepidoptera*, 43: 7-8.

Rios-Velasco C., Gallegos-Morales G., Cambero-Campos J., Cerna-Chávez E., Del Rincón-Castro MC. *and* Valenzuela-García R. 1). Natural enemies of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Coahuila, México. *Florida Entomologist*, 94: 723-726. https://www.jstor.org/stable/41336468?seq=1

Ruiz-Nájera, R. E., Ruiz-Estudillo, R. A., Sánchez-Yáñez, J. M., Molina-Ochoa, J., Skoda, S. R., Coutiño-Ruiz, R. *and* Foster, J. E. (2013). Occurrence of entomopathogenic fungi and parasitic nematodes on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae collected in central Chiapas, México. *Florida Entomologist*, 96(2): 498-503. https://doi.org/10.1653/024.096.0215

Sujeetha, J. A. R. & Sahayaraj, K. (2014). Role of entomopathogenic fungus in pest management. In K. Sahayaraj (Ed.), *Basic and Applied Aspects of Biopesticides* (pp. 31-46): Springer. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1877-7_3

Suwannakut, S., Boucias, D. G. *and* Wiwat, C. (2005). Genotypic analysis of *Nomuraea rileyi* collected from various noctuid hosts. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90(3): 169-176. https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.08.010

Thorvilson, H. G. (1984). The ecology of *Nomuraea rileyi* (Fungi: Deuteromycotina) and other natural enemies of the green cloverworm in Iowa agroecosystems. Tesis Doctoral. Entomology department. Iowa State University. https://doi.org/10.31274/rtd-180813-5976

Tinoco, R. & Halperin, D. (1998). Poverty, production and health: Inhibition of erythrocyte cholinesterase through occupational exposure to organophosphate insecticides in Chiapas, Mexico. *Archives of Environmental Health*, 53: 29–35. https://doi.org/10.1080/00039899809605686

UNIFRUT (Unión Agrícola Regional de Fruticultores del Estado de Chihuahua) (2017). Resumen de las estaciones meteorológicas por municipios. [Last Checked December 2017]. http://www.unifrut.com.mx/clima/resumen.php

Vázquez-Moreno, L. L. & Elósegui-Claro O. (2011). Manejo de epizootias por hongos entomopatógenos. En: Manual para la adopción del manejo agroecológico de plagas en fincas de la agricultura suburbana. L. L. Vázquez Moreno editor. Volumen I. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. La Habana. Capítulo 8, pp. 145-161. https://www.researchgate.net/profile/Luis_L_Vazquez_Moreno/publication/274312652_Manejo_de_epizootias_por_hongos_entomopatogenos/links/551b05460cf2bb7540787fba.pdf

Wharton, R. A., Marsh, P. M. *and* Sharkey, M. J. (1997). Manual of the New World genera of the family Braconidae (Hymenoptera). Special Publication of the International Society of Hymenopterists 1: 439 p. https://doi.org/10.1093/aesa/92.4.615

White, J. F., Bacon, C. W., Hywel-Jones, N. L. *and* Spatafora, J. W. (2003). *Clavicipitalean Fungi: Evolutionary Biology, Chemistry, Biocontrol and Cultural Impacts* (Vol. 19): CRC Press. http://ascofrance.com/uploads/forum_file/Chap.3-Clavicipetalean-Fungi-0001.pdf

Zhang, S., Chen, X., Luan, F., He L., Pu, S. *and* 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