

**NOMURAEA RILEYI (FARLOW) SAMSON COMO CANDIDATO PARA EL
CONTROL BIOLÓGICO DE ANTICARSIA GEMMATALIS HÜBNER EN EL
CULTIVO DE LA SOYA EN LA PROVINCIA DE MATANZAS.**

MS.c Yosmari Delgado Calvo

*. Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”, Vía
Blanca Km.3, Matanzas, Cuba.*

Resumen

El cultivo de la soya (*Glycine max* (L.) Merrill) resulta estratégico para la biodiversificación del Ministerio de la Azúcar (MINAZ) en Cuba, en la provincia de Matanzas se encuentran grandes extensiones con la introducción de nuevas variedades. El ataque de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), constituye un factor biótico limitante para el cultivo y la detección del hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, surge una alternativa potencial para el control biológico de esta plaga e insertarse en los programas de Manejo Integrado del Cultivo. Sin embargo, es escaso el conocimiento científico sobre la virulencia de aislados locales de *N. rileyi*, así como su reproducción "in vitro" y efectividad patogénica. El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de caracterizar aislados locales del hongo entomopatógeno *N. rileyi* en ecosistemas de soya de la provincia de Matanzas. Se describió la aparición de larvas de *A. gemmatalis* micosadas en campo y se relacionó con los factores abióticos, se evaluó "in vitro" la reproducción del entomopatógeno en diferentes medios de cultivo sólidos y su eficacia patogénica sobre *A. gemmatalis*. Se observaron micosis bajo temperaturas de 26.5°C y humedad relativa promedio de 81.5%. Se encontró mejor crecimiento "in vitro" del hongo entomopatógeno sobre el medio de cultivo modificado sabouraud dextrosa agar con 1% de extracto de levadura y 0.05 % de cloranfenicol (SDA-Y). Las suspensiones conidiales del aislado local a titulaciones de 4.25×10^7 conidios/mL⁻¹ mostró eficacia patogénica, alcanzando 100% de mortalidad de las larvas a los ocho días.

Palabras claves: Soya, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson

Introducción

El cultivo de la soya (*Glycine max* (L.) Merrill) constituye una alternativa de creciente demanda internacional, por cuanto permite la obtención de proteínas destinadas a la alimentación humana y animal (Funda Cruz, 2008). La soya garantiza el 23 % de la producción mundial de aceite y el 65.8% de la producción mundial de harinas proteicas; su alto valor biológico permitiría solucionar aspectos dietéticos de gran relevancia para nuestra sociedad (FAO, 2003).

A escala mundial, el cultivo presenta serios problemas por el ataque de organismos nocivos, el 15 % de las pérdidas es provocado por el ataque de insectos plagas que producen infestación desde el mismo momento en que se deposita la semilla en el suelo,

hasta su almacenamiento, provocando niveles de daños que pueden tener importancia económica (Aragón, 2002).

En Cuba, se obtienen bajos rendimientos en el cultivo, que alcanzan solamente entre 0.6-0.7 t.ha⁻¹ distante de las potencialidades que presentan algunas variedades 2.8-4.6 t.ha⁻¹ bajo condiciones tropicales muy similares a las nuestras (Martínez, 2001).

Entre las principales causas de esta problemática se encuentra la incidencia de insectos nocivos durante todo el ciclo del cultivo (Comisión Nacional del Cultivo de la Soya en Cuba, 1996), siendo *Anticarsia gemmatalis* Hübner una de las plagas claves más voraces de la soya a escala mundial, pues posee una amplia distribución geográfica y una marcada polifagia, potencialmente puede alcanzar tasas de defoliación de un 100 % y es considerada como una de las principales orugas consumidoras de follaje en el cultivo (Hoffman y Clara, 2004).

La amplia utilización popular del frijol de soya en la alimentación, sus bondades ecológicas y las potencialidades que ofrecen variedades cubanas adaptadas a condiciones de primavera para el redimensionamiento y biodiversificación de las áreas cañeras del Ministerio de la Azúcar (MINAZ) fundamentan la necesidad de implementar programas de Manejo Integrado de Plaga en el cultivo, con el fin de minimizar los daños ocasionados por organismos nocivos (Ortiz, 2004; citado por Marrero, 2007).

En condiciones de producción, se ha generalizado el control químico de estos insectos mediante insecticidas como Carbaryl y Endosulfan, que son altamente tóxicos e incompatibles con los bioplaguicidas recomendados y atentan además contra la biodiversidad y sostenibilidad en los agroecosistemas, situación ésta que encarece el manejo del cultivo (Ortiz *et al.*, 1997).

En la actualidad, resulta impostergable la transición de la agricultura moderna hacia una agricultura sostenible, en la cual, el control biológico resultaría una eficiente alternativa para el control de plagas (Alatorre, 2004).

En la agricultura los hongos entomopatógenos representan una alternativa muy promisoriosa en el control de plagas, siendo en su mayoría, totalmente inocuos al medio ambiente, al hombre y los animales (Zambrano *et al.*, 2003).

Debido a la potencialidad en el control de insectos dañinos a los cultivos, *N. rileyi* ha sido señalado como un eficaz agente de control biológico, fundamentalmente contra larvas de lepidópteros, ejerciendo su mejor acción en condiciones de tiempo de humedad (Sosa y Delpin, 2003).

Para la producción masiva de estos agentes de control biológico es necesario el estudio de nuevos sustratos que sean más eficientes y menos costosos (Cuadra *et al.*, 2005). También es de gran importancia trabajar con aislamientos que expresen una alta virulencia para crear fuertes epizootias en el campo, lo que puede resultar de interés a la hora de su utilización en programas de manejo de plagas (Lacey *et al.*, 2001).

En nuestro país se ha empleado el hongo *N. rileyi* como bioinsecticida para inducir epizootias mediante aplicaciones tempranas y la manipulación del agroecosistema y se han obtenido buenos resultados al emplearlo para el control de la palomilla del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) Fall (Lepidoptera: Noctuidae) (ANAP, 1998; Piedra, 2003). Por otra parte, Méndez *et al.* (2007) evaluaron la producción de biomasa del aislamiento (Nr- 003) de *N. rileyi* en diferentes medios de cultivo líquidos con agitación y su virulencia sobre *S. frugiperda*. De ahí que nos proponemos como objetivo de este trabajo evaluar el comportamiento de aislamientos naturales de *N. rileyi* como candidato de control biológico de *A. gemmatilis* en la provincia de Matanzas.

Desarrollo

Materiales y Métodos

Detección del hongo entomopatógeno en condiciones de producción

Durante el periodo Abril 2006 – Julio 2007 se desarrollaron monitoreos semanales a poblaciones de lepidopteros y se observaron larvas de *A. gemmatilis* micosadas naturalmente, las cuales se colectaron mediante el método de muestreo del paño horizontal (EMBRAPA, 2003; Pioli *et al.*, 2005), en plantaciones de soya (variedad Doko) cultivadas en la Estación Experimental de Investigaciones de la Caña de Azúcar (EPICA) “Antonio Mesa”, Jovellanos Provincia de Matanzas. Es de significar que los campos de soya muestreados no recibieron ninguna aplicación de medios químicos ni biológicos.

Las larvas micosadas se depositaron individualmente en placas Petri estériles y se trasladaron al Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Matanzas, con la finalidad de describir cuidadosamente la infección de las larvas y obtener los aislamientos locales, las cuales se conservaron en el cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Agronomía, se tomaron imágenes digitales (cámara Canon) con el auxilio de un Fotoestereomicroscopio Novel.

Descripción de micosis naturales de *N. rileyi* e influencia de los factores abióticos

Se obtuvo la caracterización climática de la localidad, y se analizó la influencia de los factores abióticos sobre el desarrollo de las micosis sobre *A. gemmatilis* en condiciones

de campo. Para ello, se registraron las variables Temperatura (T) y Humedad Relativa (Hr) (mínimas, máximas y promedio), así como el acumulado pluviométrico del día anterior a los muestreos y el registro decenal de todas las variables; citadas anteriormente, información facilitada por la Estación Meteorológica de la EPICA “Antonio Mesa”, de Jovellanos, ubicada a 25 m de las parcelas experimentales.

Aislamiento y selección del medio de cultivo para el desarrollo del entomopatógeno en condiciones de laboratorio

Las larvas de *A. gemmatalis* infectadas naturalmente y colectadas en condiciones de producción, se desinfectaron con hipoclorito de sodio 1% durante un minuto y posteriormente se lavaron con agua destilada estéril durante otro minuto, antes de ser colocadas en cámara húmeda para estimular el desarrollo de la esporulación (Zayas, 2004) con el objetivo de obtener abundantes esporas del hongo para realizar la siembra directa en los diferentes medios de cultivos utilizados para el crecimiento del hongo (García y Pozo, 2004).

Para conocer el medio de cultivo más propicio para el crecimiento del hongo se efectuaron siembras directas en cuatro medios de cultivo sólidos: sabouraud dextrosa agar (SDA), agar trigo (AT), agar papa dextrosa (PDA) y sabouraud dextrosa agar modificado con 1% de extracto de levadura y 0.05% de cloranfenicol (SDA-Y) (Zayas, 2004). Posteriormente se realizó la incubación a temperatura de $(26 \pm 1^\circ\text{C})$ durante tres semanas. Los medios de cultivos y las concentraciones utilizadas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Medios de cultivo y concentraciones utilizadas

Medios de cultivo	Cantidad (g/L)
Sabouraud Dextrosa Agar (SDA)	39
Agar Trigo (AT)	28
Papa Dextrosa Agar (PDA)	1 litro de agua destilada +100 g de papa rallada + 10 g de dextrosa. + 10 g de agar
Sabouraud Dextrosa Agar con 1% de extracto de levadura y 0.05% de Cloranfenicol (SDA-Y)	39 + (1% + 0.05 %)

Una vez observado el crecimiento micelial de las colonias típicas y la esporulación del entomopatógeno en los diferentes medios, se seleccionó el medio de cultivo

que mostró condiciones más propicias para el crecimiento del microorganismo, según los criterios disponibles de Zayas (2004).

Caracterización morfofocultural e identificación del aislamiento en el medio de cultivo modificado (SDA-Y)

Se realizó la caracterización cultural, para ello se evaluó el color de las colonias, textura, bordes y tipo de crecimiento en el medio de cultivo (SDA-Y). Posteriormente se procedió a la caracterización morfológica, para lo cual se realizaron preparaciones fijas del hongo y se describieron las características del micelio (forma, presencia o ausencia de septos o tabiques y coloración de las esporas (Marcodes y Batista 2006).

Para la identificación final de los aislamientos se emplearon las claves taxonómicas de clasificación Samson (1980) y Alexopoulos *et al.* (1996). Se consultaron los criterios de Fernández (2001) y además se desarrolló la comparación visual de los aislamientos respecto a las cepas disponibles en el Departamento de Entomopatógenos del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Matanzas.

Efectividad patogénica *N. rileyi* sobre larvas de *A. gemmatalis* en condiciones de Laboratorio

Se colectaron larvas sanas de *A. gemmatalis*, procedentes de parcelas experimentales de soya de la EPICA Jovellanos que no fueron sometidas a aplicación química ni a tratamientos biológicos. Las larvas se depositaron en microjaulas entomológicas, se alimentaron con folíolos de soya y se trasladaron al Laboratorio de Sanidad Vegetal de La Universidad de Matanzas. Posteriormente se seleccionaron larvas de tercer instar y se obtuvo una población homogénea en cuanto a talla, color y vigor del insecto (Méndez *et al.*, 2007).

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con cuatro tratamientos y un grupo control, cada uno con cinco repeticiones. Para ello se colocaron 10 larvas en el interior de cada placa Petri de 15 cm de diámetro para un total de 50 individuos por tratamiento, se alimentaron con folíolos de soya, los cuales se renovaron diariamente (Hoffmann y Clara 2004). En la Tabla 2 se describen las titulaciones de las suspensiones que se aplicaron en cada tratamiento, al grupo control solo se le suministró agua destilada estéril (Hoffmann-Campo *et al.*, 1985)

Las diferentes suspensiones (D₁, D₂, D₃ y D₄), se prepararon con agua destilada estéril a partir del cultivo puro del entomopatógeno conservado en (SDA-Y), se realizó la suspensión inicial y se obtuvieron suspensiones ajustadas en sucesión geométrica de

progresión 10, (Zayas, 2004). Las concentraciones de conidios se determinaron mediante una cámara de Neubauer según la metodología (Herrera y Mayea, 1994).

Tabla 2. Titulación de las suspensiones conidiales

Suspensiones conidiales	Titulación (conidios/ mL⁻¹)
D₁	4.25 x 10 ⁷
D₂	4.25 x 10 ⁶
D₃	4.25 x 10 ⁵
D₄	4.25 x 10 ⁴

Los datos de temperatura y humedad relativa del laboratorio se registraron diariamente con el auxilio de un Hidrotermógrafo Web y con la ayuda de una micro pipeta variable, se inocularon sobre el cuerpo de cada larva 0.2 mL de las diferentes suspensiones conidiales evaluadas, mientras que para el testigo se aplicó similar volumen de agua estéril (Méndez *et al.*, 2007).

Se realizaron observaciones diarias hasta que empezaron a aparecer larvas muertas. A partir de ese momento se contabilizó el número acumulado de las mismas, para determinar el porcentaje de mortalidad a los cuatro, seis y ocho días. Los resultados obtenidos fueron transformados según la expresión $\arcsin(p+5)^{1/2}$ y procesados mediante un análisis de varianza simple para cada momento de evaluación. Las medias fueron comparadas utilizando la Dócima de Rango Múltiple de Duncan.

Resultados y Discusión

Detección del hongo entomopatógeno en condiciones de producción

Durante el periodo Abril 2006 – Julio 2007 en la localidad EPICA Jovellanos se observaron micosis naturales de un hongo entomopatógeno sobre larvas de *A. gemmatalis*, insecto que ocasionó severas defoliaciones en el cultivo de la soya. Los cuerpos de las larvas estaban típicamente cubiertas por abundante micelio de color blanco y mostraron un aspecto momificado, duro y quebradizo que muestran una similitud con los síntomas ocasionados por la infección de *N. rileyi* (Figura 1).



Figura 1. Infección de *N. rileyi* sobre larvas de *A. gemmatalis* en ecosistemas de soya

Edelstein y Trumper (2001) coinciden en señalar que las infecciones de *N. rileyi* sobre lepidópteros plagas del cultivo de la soya, son frecuentes en países tropicales, bajo condiciones de temperatura y humedad ambiental favorables, típico en condiciones de tiempo de humedad.

Faria *et al.* (1993) informan que el tegumento de las larvas es atravesado por las hifas del hongo y se producen nuevos conidios que cubren la superficie externa de los cadáveres. Es típico que las larvas micosadas se momifiquen y se cubran inicialmente de un micelio denso y blanco; transcurridos uno o dos días se producen gran cantidad de conidios de color verde pálido, los cuales constituyen unidades infectivas que se ponen en contacto con nuevos insectos hospederos, luego de ser dispersados por agentes externos como el viento y las precipitaciones.

Descripción de micosis naturales de *N. rileyi* e influencia de los factores abióticos

Se observó el predominio de larvas de *A. gemmatalis* adheridas a las plantas, colgando de los tallos y pecíolos (Figura 2) descripción que muestra correspondencia con la infección típica de *N. rileyi* sobre *A. gemmatalis* en el cultivo de la soya, informada por la literatura científica internacional (Jonson *et al.*, 1976).

Aragón *et al.* (1997) destacan que el hongo *N. rileyi* tiene una gran importancia en el control de *A. gemmatalis* cuando se presentan condiciones favorables para su difusión. Las larvas infectadas quedan adheridas a tallos y hojas, adquieren un color blanco y más tarde un color verde pálido.

Al respecto, varios autores informan epizootias naturales en plantaciones de soya causadas por el hongo mitospórico *N. rileyi* que aparece frecuentemente sobre poblaciones de lepidópteros plagas (Thorvilson y Pedigo, 1984). En Argentina, Brasil y

Uruguay, este entomopatógeno infecta principalmente larvas de *A. gemmatalis*, *S. frugiperda*, *Colias lesbia* (F.), *Spilosoma virginica* (F.), y otros lepidópteros plagas de la subfamilia Plusiinae (Gazzoni, 1997).



Figura 2. Micosis natural de *N. rileyi* sobre *A. gemmatalis* en ecosistemas de soya, EPICA

Fernández (2001) refiere que los hongos entomopatógenos difieren de otros grupos de organismos patógenos de insectos porque actúan principalmente por contacto, ya que son capaces de penetrar a través del tegumento e invadirlo para provocarle la muerte por micosis.

Por otra parte, se argumenta que transcurrido un ciclo de crecimiento fúngico y la esporulación de *N. rileyi* los conidios generados se dispersan desde la superficie de los cadáveres de las larvas, produciéndose así probablemente el primero de dos o tres incrementos en el inóculo, que eventualmente proveerá de esta forma suficientes esporas como para iniciar una epizootia de *N. rileyi* con tan solo una larva esporulada por cada 100 plantas, se pueden obtener suficientes conidios como para dar inicio a una epizootia (Devi y Mohan, 2003).

Es de significar que en coincidencia con la aparición de *N. rileyi* en los muestreos de campo realizados en la localidad EPICA Jovellanos, los niveles poblacionales de *A. gemmatalis* solo alcanzaron infestaciones de 5.4 larvas / m lineal, valores muy inferiores a los umbrales de daño económico (40 larvas / m lineal) informados para esta plaga (EMBRAPA, 2002). Este hallazgo, sugiere potencialidades de los aislamientos locales de *N. rileyi* como agente de control biológico de *A. gemmatalis*.

El control natural de *N. rileyi* sobre la plaga, coincidió con un comportamiento abiótico muy favorable para la diseminación del patógeno en el entorno, ya que durante todo el período de primavera en que se realizaron los muestreos predominaron temperaturas medias de 26.5°C y humedad relativa promedio de 81.5% (Anexo 1).

Al respecto, Lecuona (2000) señala que el crecimiento, la esporulación y el desarrollo de epizootias naturales de *N. rileyi* se favorecen por temperaturas de 25°C y humedad relativa mayor del 70%.

Por su parte, Scharma *et al.* (1999) informan el establecimiento de *N. rileyi* en fenofases tempranas del cultivo de la soya, bajo condiciones en que las temperaturas oscilen entre 16-30°C.

Devi (2000) afirma que el rango óptimo de temperatura de este hongo y de otros entomopatógenos, para su desarrollo, patogenicidad y sobrevivencia, fluctúa entre los 20 y 30°C.

En Argentina en ecosistemas de soya se observaron infecciones naturales de *N. rileyi* sobre larvas de *A. gemmatalis*, notificándose, mayores densidades de cadáveres blancos durante el mes de Abril, lo cual evidencia que las condiciones ambientales en este periodo fueron favorables para la liberación de los conidios (Aragón *et al.*, 1997).

Debido a la potencialidad en el control de insectos dañinos a los cultivos, *N. rileyi* ha sido señalado como un eficaz agente de control biológico, fundamentalmente contra larvas de lepidópteros, ejerciendo su mejor acción en condiciones de tiempo húmedo (Sosa y Delpin, 2003).

Bajo las condiciones de Cuba, la siembra de variedades de soya en primavera se inicia precisamente en el mes de Abril, periodo en que las precipitaciones y las temperaturas favorecen el establecimiento del entomopatógeno (Ortiz, 2004).

El desarrollo fenológico de la variedad Doko, coincidió con los meses de Mayo, Junio, Julio, período en el que predominaron condiciones abióticas óptimas para el establecimiento de *N. rileyi* en el cultivo (Anexo 1).

Aislamiento y selección del medio de cultivo para el desarrollo del entomopatógeno en condiciones de laboratorio

Las larvas de *A. gemmatalis*, mostraron inicialmente un abundante crecimiento micelial de coloración blanca, que culminó con el cubrimiento de todo el cuerpo de las larvas con las esporas del hongo de color verde pálido (Figura 3) esto permitió obtener esporas necesarias para realizar la siembra directa en diferentes medios de cultivos, y seleccionar el de mejor comportamiento para su reproducción masiva.



Figura 3. Característica de la micosis del entomopatógeno *N. rileyi* sobre larva de *A. gemmatalis*

Hoffmann-Campo *et al.* (1985) coinciden en señalar que en estudios realizados con larvas de *A. gemmatalis* que fueron colocadas en cámara húmeda para estimular la esporulación del entomopatógeno *N. rileyi*, se encontraron abundantes esporas de color verde olivo que ocasionaron la muerte de los insectos.

En los ensayos de laboratorio, a partir de suspensiones de esporas de aislados locales inoculados sobre medios de cultivo (SDA), (AT), (PDA) se observó, un crecimiento micelial poco profuso, escasa esporulación del hongo, y aparición de un color amarillo claro, en ningún caso se constató color blanco, características culturales que se consideraron para discriminarlos como medios de cultivos adecuados para el desarrollo de *N. rileyi*.

Por su parte, el entomopatógeno en el medio de cultivo modificado (SDA-Y) mostró mayor crecimiento micelial inicialmente de color blanco y un desarrollo profuso con abundante esporulación de color verde pálido, criterios que se tuvieron en cuenta para la selección del medio de cultivo más adecuado para el crecimiento de *N. rileyi* en condiciones de laboratorio.

Varios autores coinciden en señalar que el extracto de levadura se ha utilizado frecuentemente como componente de medios de cultivo agarizados o líquidos para la reproducción masiva de *N. rileyi* (Han, 2002; Devi y Mohan, 2003).

Investigaciones desarrolladas en nuestro país, corroboran que se han obtenido buenos resultados para el desarrollo micelial y la producción de biomasa de *N. rileyi* en los medios boniato - extracto de levadura (BL), caldo de boniato y boniato- extracto de levadura-cloruro de calcio; resultando el medio (BL), el más promisorio. (Méndez *et al.*, 2007).

Por su parte, Sosa *et al.* (1990) utilizaron para la producción masiva del hongo *N. rileyi* el medio Arroz con una solución azucarada con extracto de levadura a temperatura de 25°C obteniendo una abundante esporulación a los ocho días, coincidiendo además con Silva y Recae (1985) quien encontró esporulación del hongo en un medio de cultivo en base a granos de arroz.

Desphande y Tour (2001) refieren que *N. rileyi* puede ser reproducido en medios de cultivos sólidos como sabouraud/ maltosa/ extracto de levadura/ peptona agar y puede alcanzar una producción de biomasa de 36.9 g de conidios/ L⁻¹.

Una vez seleccionado el medio de cultivo adecuado (SDA-Y) para el crecimiento del entomopatógeno *N. rileyi* se procedió a su caracterización morfofocultural e identificación.

Caracterización morfofocultural e identificación del aislamiento seleccionado de mejor comportamiento en el medio de cultivo modificado (SDA-Y)

Las características culturales del entomopatògeno aislado en este medio de cultivo modificado (SDA-Y) reflejaron la aparición de colonias redondeadas, de color verde pálido y aspecto aterciopelado; además, se visualizó la presencia de conidios en el centro y la formación de bordes blanquecinos en los que se observó el micelio más joven (Figura 4).

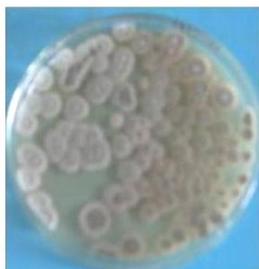


Figura 4. Colonia de un aislamiento de *N. rileyi* en medio de cultivo modificado (SDA-Y)

La observación microscópica permitió describir las características morfológicas del hongo. Se constató la presencia de micelio septado, el crecimiento de los conidios en cadenas, la presencia de células cilíndricas de pared hialina; así como la formación de conidióforos con hifas verticiladas de fiálides que se desarrollan en grupos compactos que rodean el talo debajo del septo.

Humber (1997) refiere que es típico de *N. rileyi* la formación de conidioforos verde - gris pálidos sobre la parte blanca basal del micelio, los conidioforos contienen de dos a cinco fiálides, los conidios son elipsoidales y en forma de cadenas.

Las características observadas en los ensayos de laboratorio coinciden con la descripción e identificación taxonómica de *N. rileyi*, expuesta por Samson (1980) y Alexopoulos *et al.* (1996), lo cual permite corroborar la identidad del organismo entomopatógeno como *N. rileyi*.

Es de significar que al realizarse la comparación visual de la larva con la micosis natural, colectada en plantaciones de soya en la EPICA, con la cepa de *N. rileyi* disponible en el Departamento de Entomopatógenos del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal Matanzas (LAPROSAV), se observó similitud en las características culturales de los aislados y este resultado permitió corroborar la identidad del hongo entomopatógeno como *N. rileyi*.

Efectividad patogénica *N. rileyi* sobre larvas de *A. gemmatalis* en condiciones de Laboratorio

Las cuatro suspensiones conidiales del aislamiento local evaluado ocasionaron mortalidad de los individuos entre los seis y ocho días; a partir de los dos días de ser inoculados se constató inapetencia e inmovilidad de las larvas y transcurridos cuatro días se comenzó a observar mortalidad con las suspensiones (D₁ y D₂) mientras que las suspensiones (D₃ y D₄) solo alcanzaron entre un 54 y 58% de mortalidad.

A los seis días postinoculación se encontró que las suspensiones conidiales de mayor titulación (D₁ y D₂) alcanzaron un 100% de mortalidad, mientras que las suspensiones (D₃ y D₄) solo mostraron un 96%. A los ocho días se constató un 100 % de mortalidad, observándose además sobre las larvas el desarrollo de conidiogénesis en todas las suspensiones evaluadas. (Figura 5).



Figura 5. Conidiogénesis de *N. rileyi* sobre larva de *A. gemmatalis* en condiciones de laboratorio

Ignoffo (1978) encontró que el ciclo de desarrollo de *N. rileyi* en larvas de lepidopteros infectados es de casi diez días y que en medio líquido la patogenicidad de sus conidios es efectiva, en seis días.

Al respecto, Kish y Alle (1975) encontraron que el tiempo entre la exposición al entomopatógeno *N. rileyi* y la muerte de las larvas promedió entre tres y seis días al igual que la formación de los conidióforos y la conidiogénesis.

La aparición de abundantes conidios en las larvas inoculadas en laboratorio mostró sintomatología coincidente con la del hospedero observado inicialmente en campo; criterio que valida positivamente los Postulados de Koch, (Herrera y Mayea 1994) al reproducirse en hospederos de igual especie, los síntomas presentados en los hospedantes iniciales de donde se aisló el hongo en condiciones de producción.

El análisis estadístico realizado con los datos de mortalidad reflejó que todas las dosis mostraron diferencias significativas respecto al control, en este último grupo no ocurrió ninguna muerte (Tabla 3).

Tabla 3. Mortalidad (%) de *A. gemmatalis* por aislamiento *N. rileyi* a diferentes titulaciones

Medias con letra iguales, dentro de cada columna, no difieren significativamente según Duncan ($p \leq 0.05$).

Se encontraron diferencias significativas en la mortalidad ocasionada por la suspensión

Suspensiones (Conidios / mL ⁻¹)	4 días		6 días		8 días	
	X orig.(%)	X Transf.	X orig.(%)	X Transf.	X orig.(%)	X Transf.
D ₁ = 4.25 x 10 ⁷	88	0.87 ^a	100	0.89 ^a	100	0.89 ^a
D ₂ = 4.25 x 10 ⁶	84	0.87 ^a	100	0.89 ^a	100	0.89 ^a
D ₃ = 4.25 x 10 ⁵	58	0.84 ^b	96	0.88 ^{bc}	100	0.89 ^a
D ₄ = 4.25 x 10 ⁴	54	0.84 ^b	96	0.88 ^{bc}	100	0.89 ^a
Control	0.0	0.23 ^c	0.0	0.23 ^d	0.0	0.23 ^b
ES X	0.4 ^{xx}		0.4 ^{xx}		0.4 ^{xxx}	
CV%	21.45		15.23		11.75	

(D₁ y D₂) respecto a la (D₃ y D₄), tanto a los cuatro, como a los seis días después de la inoculación de las larvas. No existiendo diferencia significativa a los ocho días entre las suspensiones (D₁, D₂, D₃ y D₄) para un 100% de mortalidad, respectivamente.

A los seis días se encontró una mortalidad del 100% en las dosis más altas (4.25 x 10⁷ conidios. mL⁻¹ y 4.25 x 10⁶ conidios. mL⁻¹), valor este que las hizo diferir de las dos restantes suspensiones, que alcanzaron un 96% de mortalidad sin diferir entre ellas. A los ocho días se apreciaron valores máximos de mortalidad en las cuatro dosis evaluadas, alcanzando el 100%, no se encontraron diferencias significativas entre ellas aunque sí respecto al testigo.

Edelstein *et al.*; (2004) observaron que a partir de los cinco días de la inoculación de aislamientos nativos de *N. rileyi* sobre poblaciones de insectos noctuidos se logra hasta

un 96% de mortalidad; resultados similares se obtuvieron en nuestro ensayo a los seis y ocho días. En estudios conducidos sobre *A. gemmatalis*, Edelstein y Trumper (2001). En Cuba; Piedra *et al.* (1997) hallaron que titulaciones de 10^7 conidios. mL⁻¹ de *N. rileyi* asperjadas sobre *S. frugiperda* ocasionaron un 97% de mortalidad de la plaga, lo que sugiere su uso como control biológico de estos Noctuidos, resultados muy semejantes se observaron sobre *A. gemmatalis* al utilizarse esta misma titulación como la mayor dosis evaluada.

Sin embargo, Méndez *et al.* (2007) al evaluar igual concentración conidial del entomopatógeno 4.25×10^7 conidios. mL⁻¹ en periodo postinoculación (7días) encontraron valores de mortalidad discretamente inferiores, alcanzando solo un 90% de mortalidad de la plaga.

Al respecto Edelstein y Trumper (2001), lograron un máximo de mortalidad sobre *A. gemmatalis* que oscila entre 60 y 90%, a los seis y siete días posteriores a la inoculación, lo que corrobora la virulencia del aislado y el tiempo máximo en que realiza el control biológico.

Los datos obtenidos también concuerdan con García y Pozo (2002) cuando realizaron una prueba de virulencia con dos aislamientos de *N. rileyi* (Nr- 001y Nr-002), los cuales mostraron mortalidad a partir del cuarto día de la inoculación.

También de igual manera se refiere que se ha probado la efectividad del hongo *N. rileyi* sobre un cuarto instar larval de *Helicoverpa armigera*, obteniendo buenos resultados, en los cuales se ha llegado a obtener una mortalidad de un 73.3% después de las 154 horas, seis a cuatro días (Lu y yin, 1998).

Ambethgar y loganathan (1998) realizaron una prueba de patogenicidad, alcanzando una mortalidad del 59% después de los ocho días de tratamiento sobre *Spodoptera litura* (Fab).

Estudios realizados por Devit y Mohan (2003) mostraron una mortalidad de un 89.7% y un 92.2% sobre *S. litura* con una concentración de 10^7 conidios .ml⁻¹ en 6.67 días en el primer caso y en el segundo 6.33 días.

Estos antecedentes y la mortalidad observada en las poblaciones de *A. gemmatalis* evidencian una positiva virulencia del aislamiento local de *N. rileyi* observado en el cultivo de la soya, localidad Jovellanos y sugiere la necesidad de profundizar los estudios para conocer las interacciones en dependencia del hospedante, la resistencia del

mismo al entomopatógeno, así como las características del agroecosistema evaluado para su inclusión futura en las estrategias de lucha biológica dentro de programas MIP.

Conclusiones

Los agroecosistemas de soya muestreados presentaron micosis natural del hongo *N. rileyi* sobre larvas de *A. gemmatilis* en las siguientes condiciones: temperatura promedio de 26,5% y humedad relativa promedio de 81,5%, las cuales resultaron favorables para su diseminación. Los aislamientos del hongo entomopatógeno *N. rileyi* presentaron un mejor comportamiento para el crecimiento en condiciones de laboratorio en el medio de cultivo modificado (SDA-Y). Las suspensiones conidiales utilizadas mostraron efectividad patogénica; con superior efectividad las dosis más altas (4.25×10^7 conidios. mL⁻¹ y 4.25×10^6 conidios. mL⁻¹), con la que se alcanzó un 100% de mortalidad de la plaga a partir de los seis días.

Bibliografía

Alexopoulos, C. J.; Mims, C. W. and Blackwell, M. Introductory Microbiology. 4th Ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1996, p. 24-45.

Aragón, J. R. Manejo integrado de plagas de la soya: Cuaderno de actualización técnica. No. 58. AACREA. Buenos Aires, Argentina, 2002, p. 48-65.

Aragón, J. R.; Molinari, A. y Lorenzatti de Diez, S.. Manejo Integrado de Plagas. En: El cultivo de la soja en la Argentina. Giorda, L. M. y H. E. J. Baigorri Eds. Córdoba, Centro Regional Centro; Coordinación Subprograma Soja (INTA), 1997, p. 247-288.

Alatorre, Rosa. XXVII Congreso Nacional de Control Biológico. Sede Los Mochis, Sinaloa, México. [En línea] 2004 [Disponible en: <http://www.guasave.udo.mx/jmeza/congreso2004.htm>]. [Consulta: Octubre/22/ 2007].

Ambethgar, V.; Loganathan, M. Incidente of green muscardine fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samsom on *Spodoptera litura* (Fab) in soybean. Journal of Entomological Research (UK), 22 (2):195-196,1998.

Comisión Nacional del Cultivo de la Soya. El cultivo y utilización de la soya en Cuba. Principales tipos de insectos que afectan al cultivo.1996, p. 26-28.

Cuadra, R.; Perales, M.; Pedroza, E.; Cruz, X.; Soto, L. y Zayas, M. Producción de bioplaguicidas confeccionados con productos o subproductos agrícolas de la Huasteca Hidalguense de México. *Rev. Protección Veg.* 20(2): 110-113, 2005.

Desphande, M. V. *Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges*. *Crit. Rev. Microbiol*, 1999, vol. 25, p. 229-243.

Desphande, M. V.; Tour, U. Microbial Control of Pests: Entomopathogenic Fungi as Mycoinsecticides [En línea]. 2001. [Disponible en: <http://www.biotech.biol.ethz.ch/India/Forms/pmfai-paper.pdf>]. [Consulta: Junio, 12, 2005].

Devi, V. Research on microbial control of insect pest at DOR. Newsletter, 2000, p. 29-33.

Devi, V.; Mohan, C. Susceptibility to Fungi of Cotton Bollworms Before and After a Natural Epizootic of the Entomopathogenic Fungus, *Nomuraea rileyi* (Farlow). *Biocontrol Science and Technology*, 2003, p. 367-371.

Edelstein, J. D. y Trumper, E. Las larvas desfoliadoras del cultivo de la soja y su control natural por el hongo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Información Técnica. Año II. N° 1. [En línea]. 2001. [Disponible en: <http://www.inta.gov.ar/manfredi/infodocumentos/docprodveg/entomo/dofosoja.htm>]. [Consulta: Enero/12/2007].

Edelstein, J. D.; Lecuona, R. y Trumper, E. Selection of Culture and *in vitro* Assessment of Temperatura-Dependent Development of *Nomuraea rileyi*. *Neotrop. Entomol*, 33(6):737-742.2004.

EMBRAPA. Recomendaciones técnicas para el cultivo de la soja en la región central de Brasil: Manejo de plagas, 2003, p.158- 22.

EMBRAPA. VIII Reunião Sul Brasileira de pragas de solo. 2002, p.119-123.

Funda Cruz. Boletín de Difusión Técnica de soja. Fundación de desarrollo Agrícola Santa Cruz. Editorial Funda Cruz, Bolivia, 2008, p.152.
FAO. Agriculture Services Bulletin, 2003, p. 1-27.

Faria, M. R. D.; Tigano-Milani, M. S. y Lecuona, R. Incidencia natural de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson em população de *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) no Distrito Federal. *An. Soc. Entomol. Brasil*, 22(2):358-388,1993.

Fernández-Larrea, Orietta. Temas interesantes acerca del control microbiológico de plagas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. La Habana: Cuba. 2001, p. 138.
García, Irma y del Pozo, E. Obtención y aislamiento de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson y su virulencia en larvas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). En: *Tecnologías Ecológicas para el agro*. Editora RAP-AL, Lima, 2002, p. 47-64.

García, J.; Clavijo, S. Incidencia del hongo *Nomuraea rileyi* (Farlow) (*Deuteromycetes: Ascomycotina*) en larvas de *Spodoptera frugiperda* criadas en laboratorio y alimentadas con plantas provenientes de campos comerciales de maíz. [En línea]. 2000. [Disponible

en: <http://www.redpav-fpolar.info.ve/entomol/v04/04b002.html>]. [Consulta: Junio/10/2002].

Gazzoni, D. L. A receita certa para aumentar seu lucro na cultura da soya. CNPSO, EMBRAPA. 2001. Brasil: 1997, p. 34-78.

Han, Q.; Inglis, G. y Hausner, G. Phylogenetic relationships among strains of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*, as revealed by partial tubulin sequences and intersimple sequence repeat (ISSR) analysis. *Lett. Appl. Microbiol*, 2002, p. 376-383.

Herrera, L. y Mayea, S. Fitopatología General: Tecnología y conceptos básicos. La Habana. Edición Ventura Publisher, 1994, p. 12.

Hoffmann-Campo, C.B., E.B. Oliveira & F. Moscardi.. Criação massal da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*. Documentos 10. Londrina, Embrapa CNPSO, 1985, p. 23.

Hoffmann, C. B. Clara, E. Moscardi, F. Pragas da soya no Brasil e seu Manejo Integrado. EMBRAPA (2003). Ministerio da Agricultura e do Abastecimento, 2004, p. 7- 63.

Humber, R. A. Fungi: identification. *In*: Manual of techniques in insect pathology. San Diego, California (USA): Academic Press Inc, 1997, p. 153-185.

Ignoffo, C. Studies to evaluate the potential of *Nomuraea rileyi* (Farlow) as a mycoinsecticide. Conference on the Production of Substances by Microbiological Means, Riga, 20-21 may, 1978, p. 62-83.

Kish, T.; Alle, D. Infectivity of *Nomuraea rileyi* (Farlow) in *Anticarsia gemmatalis*Hübner and its control in cotton fields. *Gen Virol*, New York: 24(2):14-17,1975.

Lacey, L. A.; Frutos, R.; Kaya, H. K.; and Vail, P. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do they Have a future? *Biological Control* 21: 2001 p. 230-248.

Lecuona, R. E. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. En: R. E. Lecuona Ed. Buenos Aires, Argentina: 2000, p. 338.

Lu, Y.; Yin, C. Infectivity of *Nomuraea* in *Helicoverpa armigera* and its control in cotton fields. *Gen. Virol (Cab)*, 1998, 24 (4): 14-17.

Marcondes de Almeida, J. E. y Batista, A. Biodiversidade para o controle microbiano de pragas. Banco de Microrganismos Entomopatogênicos. 30 Biotecnologias Ciência & Desenvolvimento. 2006, 20 (1): 1-7.

Marrero, L. Entomofauna associated to soybean varieties: Harmfulness, Population fluctuation and Natural Enemies of the Phytophage Complexes of Greater Agricultura Interest. Resumen de Tesis Doctoral. Universidad Central de la Villas: Rev. Protección Vegetal, Cuba, 2007, 22 (2):134.

Martínez, I. Validación de un Programa de Manejo Integrado para el control de plagas en el cultivo de la soya. Tesis de Maestría. ETPP Jaruco. La Habana: Cuba. 2001, p. 47-63.

Méndez, A.; del Pozo, E.; García, Irma. Producción de biomasa del aislamiento (nr-003) de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson en diferentes medios de cultivo líquidos con agitación y su virulencia sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) Rev. Protección Vegetal, 22 (2): 118-123, 2007.

Ortiz, H.; Salinas, E.; Vázquez, R. y Ramírez, R. Plaguicidas Organofosforados y Ambiente. Biotecnología México: 3 (2):129-151,1997.

Ortiz, R. Selección de variedades de soya para ser explotadas en áreas cañeras. En: Informe de Proyecto Investigación-Desarrollo, Programa Ramal desarrollo de granos en el MINAZ. Instituto de Investigaciones de Ciencias Agrícolas INCA, 2004, p. 30-37.

Piedra, F. Dinámica poblacional de plagas en soya. Trabajo de archivo. INISAV. Delicias Grandes, Alquizar, La Habana, 2003, p. 60.

Piedra, F.; Pérez, E.; Blanco, E. Manejo Integrado de la palomilla del maíz (*Spodoptera frugiperda* J. E. Smith). En: memorias del Tercer Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal; 23-27 de junio, Ciudad de La Habana, 1997, p.73.

Pioli, Rosanna; Vignaroli, L. y Leguizamón, E. S. Toma de Decisiones y Manejo de Adversidades en Agroecosistemas. Publicación cuatrimestral de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario. Argentina: 2005, p. 4.

Samson, R. A. Identification Entomopathogenic *Deuteromycetes*. In: Burges, H. D. Microbial control of pest and plant diseases, 1970-1980.

Scharma, Sh.; Gupta, R. and Yadaba, C. Mass multiplication and formulation of entomopathogenic fungi and their efficacy against white grubs. Journal of Mycology and Plant Pathology, 1999, p. 299-305.

Silva, L.; Recae, L. Esporulacao do fungo entomopatogenico *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson em meio da cultura a base de graos de arroz polidos. Anais da Sociedade Entomologica do Brasil (Bra), 1985, 16 (1): 213-222.

Sosa, R. and Delpin, K. The impact of Fungicides on *Nomureae rileyi* (Farlow) Samson epizootic and populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (*Lepidoptera: Noctuidae*) on Soybean. Neotropical Entomology (Londrina. Br): 2003, p. 287-291.

Thorvilson, H. G. and Pedigo, L. P. Epidemiology of *Nomuraea rileyi* in *Plathypena scabra* populations from Iowa soybeans. Environ. Entomol, 1984, vol.13, p. 1491-97.

Zambrano, C.; Sepúlveda, M.; Zambrano, E. y Molina, N. Hongos entomopatógenos en Venezuela: *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sor. Caracterización, formulación, producción y aplicación. [En línea] 2003. [Disponible en: <http://>

pegasus.ucla.edu.ve/CCC/RESUMEN/agronomia/c1-32-ag.htm.
Abril/3/2008].

[Consulta:

Zayas, M. Comunicación personal, INIFAT. 2004.