

Medio suplementado con polvo de pupas de insectos para inducir el crecimiento de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium robertsii* y la patogenicidad de *Metarhizium robertsii*

Medium supplemented with insect pupae powder to induce growth of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium robertsii* and the pathogenicity of *Metarhizium robertsii*

 ADARA GRACIANO-OBESO¹  CIPRIANO GARCÍA-GUTIÉRREZ^{1*}
 MARÍA NANCY HERRERA-MORENO¹  HERVEY RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ¹  JUAN CARLOS SAINZ-HERNÁNDEZ¹
 GABRIELA LIZBETH FLORES ZAMORA¹

¹ Instituto Politécnico Nacional. Sinaloa, México.

* Autor de correspondencia

Instituto Politécnico Nacional. COFAA-CII-
DIR-Unidad Sinaloa. Boulevard Juan de Dios
Bátiz Paredes 250, C. P. 81101, Col. San Joachin,
Guasave, Sinaloa, México. cgarciag@ipn.mx

Citación sugerida

Graciano-Obeso, A., García-Gutiérrez, C., Herrera-Moreno, M. N., Rodríguez-González, H., Sainz-Hernández, J.C., & Flores-Zamora, G. L. (2023). Medio suplementado con polvo de pupas de insectos para inducir el crecimiento de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium robertsii* y la patogenicidad de *Metarhizium robertsii*. *Revista Colombiana de Entomología*, 49(1), e12252. <https://doi.org/10.25100/socolen.v49i1.12252>

Recibido: 15-Junio-2022

Aceptado: 06-Ene-2023

Publicado: 20-Mar-2023

Revista Colombiana de Entomología

ISSN (Print): 0120-0488

ISSN (On Line): 2665-4385

<https://revistacolombianaentomologia.univalle.edu.co>

Open access



BY-NC-SA 4.0
creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Publishers: Sociedad Colombiana de Entomología
SOCOLEN (Bogotá, D. C., Colombia)
<https://www.socolen.org.co>
Universidad del Valle (Cali, Colombia)
<https://www.univalle.edu.co>

Resumen: El uso de cutícula de insectos es una opción viable para inducir el crecimiento de hongos entomopatógenos. Se obtuvo polvo de pupas de *Spodoptera frugiperda* (*Sf*) y *Heliothis virescens* (*Hv*), el cual se adicionó para enriquecer al medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) a concentraciones de 0,25, 0,5 y 1 %. El polvo se usó para inducir crecimiento radial de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium robertsii*. Se determinó el tiempo letal (TL) de *M. robertsii* inducido a una concentración de 10⁸ esporas/mL y un control PDA. La mortalidad de larvas fue analizada mediante ANDEVA y una prueba Tukey ($\alpha = 0,05$). El contenido de grasa de *Sf* fue 49,9 y el de *Hv* 41,9 %; el extracto libre de nitrógeno (ELN) 21,3 y 32,0 %; proteínas 15,7 y 13,5 %, y la energía 517,87 y 493,73 (Kcal/g), respectivamente. Los nutrientes y la energía tuvieron efecto inductor en el crecimiento de *M. robertsii* con polvo de pupa de *Sf* y *Hv* al 1%, alcanzando 75,5 y 74,2 mm de crecimiento radial y en el control PDA 60 mm. *B. bassiana* con *Hv* 0,5 %, 55 mm y con *Sf* 0,25 %, 50 mm y en el control PDA 32,5 mm ($\alpha=0,05$). *M. robertsii* inducido con *Sf* causó 91,6 % de mortalidad de larvas de *Sf* en PDA 66,6 %, a los siete días ($\alpha = 0,05$). El suplemento de insectos incrementó el crecimiento de hongos en medio PDA, esto contribuyó a la patogenicidad de la cepa inducida de *M. robertsii* sobre *S. frugiperda*.

Palabras clave: Hongos entomopatógenos, *Heliothis virescens*, *Metarhizium robertsii*, crecimiento radial, *Spodoptera frugiperda*.

Abstract: The use of insect cuticle is a viable option to induce the growth of entomopathogenic fungi. *Spodoptera frugiperda* (*Sf*) and *Heliothis virescens* (*Hv*). Pupal powder was obtained, which was added to enrich the Potato Dextrose Agar (PDA) culture medium at concentrations of 0.25, 0.5 and 1 %. The powder was used to induce the radial growth of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium robertsii*. The lethal time (TL) of *M. robertsii* induced at a concentration of 10⁸ spores/mL and a PDA control. Larval mortality was analyzed by ANOVA and a Tukey test ($\alpha = 0.05$). The fat content of *Sf* was 49.9 % and that of *Hv* 41.9 %; the extract free of nitrogen (ELN) 21.3 and 32.0 %; proteins 15.7 and 13.5 %, and energy 517.87 and 493.73 (Kcal/g), respectively. Nutrients and energy had inducer effect on the growth of *M. robertsii* with 1 % *Sf* and *Hv* pupal powder, reaching 75.5 and 74.2 mm of radial growth and 60 mm in the PDA control. *B. bassiana* with *Hv* 0.5 % 55 mm and with *Sf* 0.25 %, 50 mm and in the PDA control 32.5mm ($\alpha = 0.05$). *M. robertsii* induced with *Sf* causing 91.6 % mortality of *Sf* larvae and 66.6 % in PDA, at seven days ($\alpha = 0.05$). The supplementation of the insects increased the growth of the fungi in PDA medium, this contributed to the pathogenicity of the induced strain of *M. robertsii* on *S. frugiperda*.

Keywords: Entomopathogenic fungi, *Heliothis virescens*, *Metarhizium robertsii*, radial growth, *Spodoptera frugiperda*.

Introducción

El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) y el gusano del fruto del tomate *Heliothis virescens* Fabricius, 1777 (Lepidoptera: Noctuidae) son insectos plaga que atacan cultivos de importancia económica en México (Blanco et al. 2007; Suris Campos et al. 2013; Nunes-Lemes et al. 2014). El método más utilizado para combatir a las plagas agrícolas es el control

químico, aún con los daños que ocasiona en el ambiente (Mahmood et al. 2016), por lo que es necesario contar con métodos alternativos de control biológico como los hongos entomopatógenos. Las especies más utilizadas en el control de insectos son *Metarhizium robertsii* (Metschnikoff) Sorokin, 1883 (antes *M. anisopliae*) (Hypocreales: Clavicipitaceae) y *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin, 1912 (Hypocreales: Clavicipitaceae) (Alatorre-Rosas 2007; Yehia et al. 2022). Sin embargo, se sabe que la capacidad patogénica de estos hongos disminuye cuando se mantienen por tiempos prolongados en el mismo medio de cultivo (González-García et al. 2001; Polovinko 2013; Keyhani 2018), por lo que es necesario contar con el medio de cultivo óptimo que contenga las sustancias nutritivas que requiere el hongo para su crecimiento y le confiera virulencia a las cepas durante la infección a insectos (González García et al. 2001; Cañedo & Ames 2004; Ishak et al. 2020; Rajula et al. 2021).

Los medios de cultivo de hongos entomopatógenos deben contener nitrógeno, carbono y vitaminas, para un desarrollo óptimo y reproducción, un pH de 6 a 6,3, así como antibióticos para evitar el crecimiento de bacterias saprofitas (Cañedo & Ames, 2004). De estos, los más comunes son PDA, Agar Agua (AA), Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), Sabouraud Dextrosa Agar con extracto de levadura (SDAY) y Agar Melaza levadura (AML). Al respecto, se han llevado a cabo estudios para determinar el crecimiento radial de los hongos *M. robertsii* y *B. bassiana* bajo diferentes condiciones de crecimiento (García-Gutiérrez et al. 2020), y otros con la finalidad de inducir su patogenicidad al usar suplementos de integumento de algunos insectos diana (González García et al. 2001; Sharapova 2019; Sapna Bai et al. 2020), así como para conocer su potencial en la inducción de la actividad enzimática dinámica y caracterización bioquímica de *B. bassiana* (Peteira et al. 2011). Los hongos tienen diferentes atributos que determinan su virulencia frente a sus hospedantes, tales como la producción de enzimas hidrolíticas como proteasas, lipasas y quitinasas (Zibae & Bandani, 2009; Batool et al. 2020). Este mecanismo enzimático puede lograr una alta mortalidad de insectos plaga ocasionada por los hongos, si a éstos se les provee el sustrato necesario para su desarrollo y se promueve la inducción de las enzimas involucradas en la patogenicidad (González García et al. 2001). Debido a esto, la virulencia de un hongo es considerada una característica importante en el control de las plagas.

El objetivo fue evaluar el crecimiento radial de cepas de *B. bassiana* y *M. robertsii* en medio suplementado con polvo de *S. frugiperda* y *H. virescens* y determinar la patogenicidad que *M. robertsii* induce sobre larvas de *S. frugiperda*.

Materiales y métodos

Producción del suplemento a base de los insectos *Spodoptera frugiperda* y *Heliothis virescens*

Cría de insectos. En los ciclos agrícolas primavera-verano y otoño-invierno de 2018 se recolectaron larvas de *S. frugiperda* (*Sf*) en cultivos de maíz y larvas de *H. virescens* (*Hv*) en cultivos de garbanzo en el municipio de Guasave, Sinaloa, México, para establecer una cría axénica en laboratorio. Las larvas se alimentaron con dieta artificial (elaborada con harina de maíz, salvado de trigo, levadura de cerveza, vitaminas, sales y metil-paraben como bacteriostático, solidificado en agar) (Acuña Jiménez et al. 2015).

Obtención del suplemento de insectos. Se siguió el procedimiento descrito por García-Gutiérrez et al. (2020). Se usaron pupas de la generación F3 de la cría axénica; se secaron en horno (Riossa®) a 50 °C durante tres días, se molieron en un mortero manual de porcelana hasta obtener un polvo, el cual se llevó a peso constante. Se almacenó en frascos de vidrio con boca ancha con capacidad de 118 mL a temperatura ambiente hasta su utilización.

Análisis proximal del suplemento. Al polvo se le realizó un análisis proximal por los métodos respaldados por la Asociación de químicos analíticos oficiales (A.O.A.C., por sus siglas en inglés) (Ramos Elorduy et al. 2002), para conocer el contenido de humedad por diferencia de peso a 105 °C/4 h y determinación de la energía, mediante factores de conversión propuestos por Heras et al. (1998), las proteínas por el método de Kjeldahl (1883), grasas por el método de Soxhlet (1879), cenizas por diferencia de peso: calcinación 600 °C/5 h, fibra cruda por hidrólisis sucesiva: ácido/base) y extracto libre de nitrógeno (ELN) con la ecuación:

$$\% ELN = 100 - (\%cen + \%prot + \%gra + \%fib)$$

En la ecuación ELN es el % de extracto libre de nitrógeno, cen de ceniza, prot de proteína, gra de grasa y fib de fibra.

Evaluación del crecimiento radial de *B. bassiana* y *M. robertsii* en medios suplementados

Selección de cepas. Se utilizaron cepas de *B. bassiana* (B1-CIDSB01) y *M. robertsii* (M1-CIDSM01) provenientes del cepario del laboratorio de Bioinsecticidas del CIIDIR-Sinaloa. Las cepas tienen las claves de acceso GenBank KR998503 para B1 y KR998522 para M1. Después de realizar resiembra de las cepas en cajas Petri con PDA, se seleccionaron las de mayor velocidad de crecimiento con las características morfológicas de cada especie (García-Gutiérrez et al. 2020).

Preparación de medios de cultivo. El medio PDA se usó como control, para su preparación se siguieron las instrucciones del fabricante. A los medios de cultivo PDA suplementados se les agregó el polvo de los dos insectos a concentraciones de 0,25 %; 0,5 % y 1 %. Los medios esterilizados se vaciaron en cajas Petri en una campana de flujo laminar (Cobeal HLV) y se almacenaron hasta su uso.

Crecimiento radial de los hongos entomopatógenos. Las cajas Petri con medio de cultivo PDA con y sin suplemento de insecto se inocularon con discos de 6 mm con micelio cortados con un sacabocados estéril (Hernández Mansilla et al. 2005), esto se llevó a cabo en una campana de bioseguridad (Telstar bio-11-A). Las cajas inoculadas se colocaron en una cámara bioclimática marca Scorpion Scientific a 28 °C y 80 % de HR durante 15 días para su desarrollo. Cada 24 h se realizó la medición del crecimiento radial en milímetros con una regla graduada. Para el análisis de los datos se realizó un diseño estadístico completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANDEVA) y una prueba de comparación múltiple de Tukey a un nivel de significancia $\alpha = 0,05$ utilizando el paquete estadístico SAS® versión 9.0.

Evaluación de la patogenicidad de *M. robertsii* inducido sobre *S. frugiperda*

Determinación de la concentración y viabilidad de esporas. Para esta prueba se utilizó la cepa de *M. robertsii* Hv 1 % con mayor crecimiento radial, las esporas se cosecharon al raspar la superficie de la placa con un asa bacteriológica estéril, tanto del medio control como de los medios suplementados y se disolvieron en 15 mL de solución estéril de Tween 80 al 0,01 %. Una vez obtenida la suspensión madre se hicieron diluciones seriadas para determinar su concentración, de las cuales se tomaron 10 µL y se depositaron en una cámara de Neubauer (LAREN®) para posteriormente contar las esporas en un microscopio óptico (Zeiss) a una ampliación de 40X. En la prueba de viabilidad se tomaron 100 µL de las diluciones y se depositaron en el centro de una caja Petri con medio PDA, se distribuyó uniformemente el contenido con una varilla estéril, las cajas se incubaron a 28 °C por 16 h en cámara bioclimática (Scorpion Scientific). Se cortó 1 cm² del medio y se colocó en un portaobjetos para su observación con un microscopio óptico (Zeiss), se contaron esporas germinadas (mayor al 90 %) con un tamaño de dos o más veces mayor al diámetro de la espora para considerarse como viable (Inglis et al. 2012).

Bioensayos. Se empleó una suspensión de *M. robertsii* a una concentración de 10⁸ esporas/mL y se utilizaron larvas del tercer estadio de *S. frugiperda*, por ser más activas y manipulables. Se evaluaron tres tratamientos, los cuales consistieron en utilizar el hongo *M. robertsii* proveniente de los medios suplementados con *S. frugiperda* (M1 Sf) y *H. virescens* (M1 Hv), además de un control (M1 Ctl) (sin suplemento de insecto). Se hicieron tres réplicas por tratamiento con ocho larvas

cada una (las larvas respondieron a la infección del patógeno en prueba preliminar). Las larvas se colocaron en cajas Petri de cinco cm de diámetro y se les proporcionó una porción de dieta artificial, cada larva fue inoculada con 300 µL de la suspensión de esporas con una micropipeta de 500 µL marca LABMATE. Las cajas de cada tratamiento se incubaron a 28 °C y HR de 80 % en una cámara bioclimática marca Scorpion Scientific. Cada 24 h se contaron las larvas muertas y vivas durante siete días. Las larvas muertas permanecieron tres días más en cámara húmeda para observar la esporulación total del hongo sobre los insectos. Para el análisis de los datos se usó un diseño estadístico completamente al azar, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y una prueba de comparación múltiple de Tukey a un nivel de significancia $\alpha = 0,05$, se utilizó el paquete estadístico SAS® versión 9,0.

Resultados

Composición del suplemento de *Spodoptera frugiperda* y *Heliothis virescens*

El análisis proximal realizado al integumento en polvo de los dos insectos se presentan en la tabla 1.

Crecimiento radial de *M. robertsii* y *B. bassiana* en medio PDA suplementado con *H. virescens* y *S. frugiperda*

El crecimiento radial de *M. robertsii* suplementado con *S. frugiperda* al 1 % fue de 75,5 mm y con *H. virescens* de 74,2 mm, con diferencias estadísticas respecto al control (60 mm). El crecimiento de *B. bassiana* suplementado con *H. virescens* al 0,5 % fue 55 mm y con *S. frugiperda* al 0,25 %, 50 mm, con diferencias estadísticas con el control 33,25 mm ($\alpha = 0,05$) (figura 1).

Tabla 1. Análisis proximal del polvo de *H. virescens* y *S. frugiperda*

Insecto	Humedad (%)	Proteína (%)	Extracto etéreo (%)	Fibra cruda (%)	Cenizas (%)	ELN* (%)	Energía (Kcal/g)
<i>H. virescens</i>	0,91	13,51	41,94	8,34	4,17	32,04	493,73
<i>S. frugiperda</i>	2,70	15,78	49,90	8,57	4,37	21,39	517,87

*Extracto libre de nitrógeno

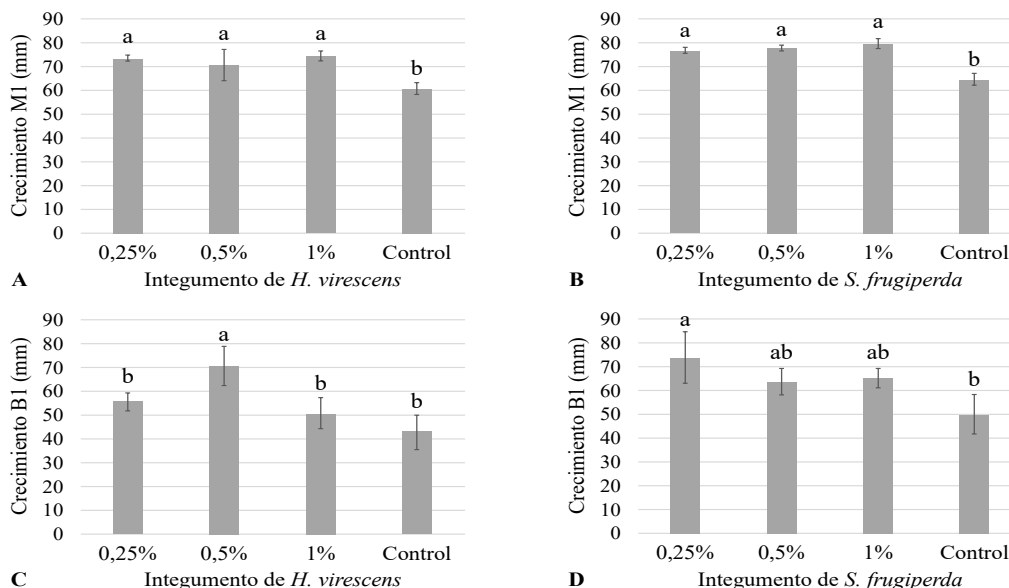


Figura 1. Crecimiento radial de los hongos en PDA: *M. robertsii*: A) Suplementado con *H. virescens*, B) Suplementado con *S. frugiperda*; *B. bassiana*, C) Suplementado con *H. virescens*, D) Suplementado con *S. frugiperda*.

En la figura 2 se puede observar el mayor halo de crecimiento de la cepa M1 suplementados con *Hv* y *Sf* al 1 %, la colonia es de una coloración verde oliva característica de este hongo, y en la cepa B1 suplementada con *Hv* al 0,5 % y *Sf* al 0,25 % aparece un halo de menor diámetro de color blanco típica en *B. bassiana*. En ambos casos la cepa en el medio control tuvo menor diámetro en mm, que los hongos crecidos en medios suplementados con polvo de pupas durante 15 días.

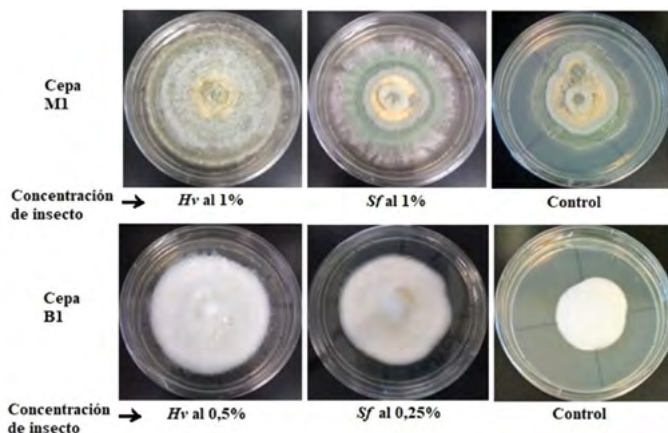


Figura 2. Crecimiento radial de *M. robertsii* (cepa M1) y *B. bassiana* (cepa B1) a los 15 días de desarrollo.

Patogenicidad de *M. robertsii* inducido sobre larvas de *S. frugiperda*

La viabilidad de las conidias de la cepa M1 de *M. robertsii* utilizada en este estudio fue superior al 90 % de esporas germinadas a las 16 h.

Bioensayo. La cepa M1 de *M. robertsii* crecida en medio suplementado con *Sf* causó 12,5 % de mortalidad de larvas a las 24 h post inoculación, aumentó en las siguientes horas. Se observaron diferencias estadísticas en la mortalidad de larvas de *S. frugiperda* a las 168 h, entre los tratamientos de *M. robertsii* *Sf* (91,6 %), *Hv* (80 %) y el Ctl (66,6 %), mientras que en el control (agua y Tween 80), no hubo mortalidad de larvas ($\alpha = 0,05$) (Figura 3).

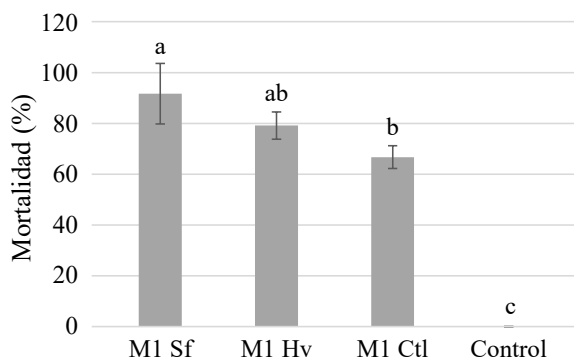


Figura 3. Mortalidad de larvas de *S. frugiperda* causada por la cepa M1 a las 168 h. Tratamientos: M1 Sf = Hongo desarrollado en medio con *S. frugiperda*, M1 Hv = hongo desarrollado en medio con *H. virescens*, M1 Ctl = hongo desarrollado en medio sin insecto, Control = agua y Tween 80 como control negativo.

Discusión

El análisis proximal del polvo indicó que el mayor nutriente en *S. frugiperda* y *H. virescens* son las grasas, valores superiores a los de Rodríguez-Ortega et al. (2016) en pupas del gusano de seda *Bombyx mori* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Bombycidae) (20,63 %). El contenido de ELN de *H. virescens* fue 10 veces mayor a la reportado en *B. mori* (3,92 %) por Rodríguez-Ortega et al. (2016) y similar a lo reportado por Ramos-Elorduy et al. (1998) en *Heliothis zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) con 21%. Con relación a las proteínas, los resultados fueron inferiores a los obtenidos por Rodríguez-Ortega et al. (2016) en *B. mori* (64,31%) y por Ramos Elorduy et al. (1998) en *H. zea* (41,98 %). Lo anterior es importante, al considerar que los hongos requieren fuente de carbono y de nitrógeno para su crecimiento y desarrollo, los cuales son aportados como suplemento al medio de cultivo PDA, además de la fuente de energía libre disponible para la realización de los procesos metabólicos de estos hongos.

El crecimiento radial de las cepas de *M. robertsii* y *B. bassiana* durante 15 días fue mayor en el medio suplementado con *H. virescens* y *S. frugiperda*, y estos fueron superiores a lo reportado por García-Gutiérrez et al. (2020) con los dos hongos (2,46 y 2,63 mm/día) respectivamente, inducido con cutícula de *S. frugiperda*, mientras que Vejar-Cota et al. (2017) reportaron crecimiento de 2,05-2,62 mm/d con *B. bassiana* en medio PDA y con *M. robertsii* 2,70-3,03 mm/d. Las diferencias en el crecimiento de estos hongos se deben a la adición de nutrientes del suplemento en las concentraciones aplicadas.

La patogenicidad de *M. robertsii* en medio suplementado con *S. frugiperda* alcanzó 91,6 % de mortalidad de larvas. En otros estudios donde el hongo se aisló de cadáveres de este insecto, la mortalidad máxima fue 88 % (Ullah et al. 2022) en larvas de *S. frugiperda* y del 100 % en huevos y larvas neonatas del mismo insecto con *M. robertsii* (Cruz-Avalos et al. 2019). Por otro lado, se reportó patogenicidad de *B. bassiana* con eficiencia del 96,6 % (García-Gutiérrez et al. 2011). Otros estudios consignan patogenicidad de *M. robertsii* y *B. bassiana* del 33 %-100 % (Gutiérrez-Cárdenas et al. 2019).

Los resultados sugieren que *M. robertsii* alcanzó una mayor patogenicidad en larvas de *S. frugiperda*, debido a que el hongo se cultivó en medio suplementado con polvo del insecto diana. Lo anterior coincide con lo reportado por González-García et al. (2001) quienes observaron una mayor mortalidad de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae) por acción de *B. bassiana* después de cultivarlo en medio con integumento del insecto hospedero. Se sugiere también que los componentes del polvo favorecieron la producción de enzimas que el hongo necesita para infectar al insecto, lo cual coincide con Gato-Cárdenas et al. (2017) quienes relacionan la rápida mortalidad con altos niveles de enzimas. En relación con la virulencia de *M. robertsii*, se sabe que está asociada a la actividad de enzimas extracelulares como quitinasa, lipasa y proteasa (Gebremariam et al. 2022), a su vez relacionada a los genes *mad1*, *mad2* y *gmact* presentes en *M. robertsii* (Cruz-Avalos et al. 2019). De esta forma, la virulencia y efectividad de *M. robertsii* en el control de *S. frugiperda* es evidenciada, por lo que este hongo y *B. bassiana* pueden ser usados como alternativa a los insecticidas químicos tradicionales (Montecalvo et al. 2021).

Conclusiones

Los resultados demostraron que los medios de cultivo suplementados con polvo de pupas de los insectos *S. frugiperda* y *H. virescens*, inducen el crecimiento de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. robertsii*. También se incrementó la patogenicidad de *M. robertsii* sobre larvas de *S. frugiperda*. El uso del suplemento a base de estos insectos podría mejorar la producción masiva de hongos entomopatógenos en laboratorio.

Agradecimientos

Agradecimientos. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, México y al Programa BEIFI-IPN. Por las becas recibida en los estudios de maestría de la primera autora.

Literatura citada

- Acuña Jiménez, M., García Gutiérrez, C., Rosas García, N. M., López Meyer, M., & Sainz Hernández, J. C. (2015). Formulación de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin con polímeros biodegradables y su virulencia contra *Heliothis virescens* (Fabricius). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 31(3), 219-226. <https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/44016>
- Alatorre-Rosas, R. (2007). Hongos Entomopatógenos Cap. 9. In L. A. Rodríguez-del-Bosque.
- Arredondo-Bernal, H. C. (Eds.). *Teoría y Aplicación del Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico. México. 303 p. http://www.ucv.vg/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/Zoologia_Agricola/Manejo_Integrado/Material_Interes/Libro_CB_Arredondo-Rodriguez_2007_Control_Biologico.pdf
- Batool, R., Umer, M. J., Wang, Y., He, K., Zhang, T. Bai, S., Zhi, Y., Chen, J., & Wang, Z. (2020). Synergistic effect of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma asperellum* to induce maize (*Zea mays* L.) defense against the asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera, Crambidae) and larval immune response. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 1-29. <https://doi.org/10.3390/ijms21218215>
- Blanco, C. A., Terán-Vargas, A. P., López, J. D., Kauffman, J. V., & Wei, X. (2007). Densities of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in three plant hosts. *Florida Entomologist*, 90(4), 742-750. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2007\)90\[742:DOHVAH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2007)90[742:DOHVAH]2.0.CO;2)
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 62 p.
- Cruz-Avalos, A. M., Bivián-Hernández, M. Á., Ibarra, J. E., & Del Rincón-Castro, M. C. (2019). High virulence of Mexican entomopathogenic fungi against fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 112(1), 99-107. <https://doi.org/10.1093/jee/toy343>
- García-Gutiérrez C., Berenice González, M., & Néstor Bautista, M. (2011). Pathogenicity of isolates of entomopathogenic fungi against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 37(2), 217-222. <https://doi.org/10.25100/socolen.v37i2.9077>
- García-Gutiérrez, C., García-Guajardo, M. I., Vejar-Cota, G., Meza-García, L., & Chávez-Medina, J. A. (2020). Macromorphology and radial growth of entomopathogenic fungi strains supplement with lepidoteran powder. *Revista Colombiana de Entomología*, 46(1), 1-6. <https://doi.org/10.25100/socolen.v46i1.10164>
- Gato-Cárdenas, Y., Márquez-Gutiérrez, M. E., Baró-Robaina, Y., & Calle-Osorno, J. D. J. (2017). Detección de enzimas extracelulares en cepas cubanas del complejo *Metarhizium anisopliae* robertsii con acción entomopatógena contra *Cylas formicarius* Fabricius (Coleoptera: Brentidae). *Actualidades Biológicas*, 39(106), 71-78. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v39n106a07>
- Gebremariam, A., Chekol, Y., & Assefa, F. (2022). Extracellular enzyme activity of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* robertsii and their pathogenicity potential as a bio-control agent against whitefly pests, *Bemisia tabaci* and *Trialetrodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *BMC Research Notes*, 15(1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/s13104-022-06004-4>
- González García, M. T., Valencia Jiménez, A., & Bustillo Pardey, A. E. (2001). Incremento de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*, utilizando integumento del insecto en el medio de cultivo. *Manejo Integrado de Plagas*, 60, 31-35. <https://repositorio.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/6384/A1758e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gutiérrez-Cárdenas, O. G., Cortez-Madrigril, H., Malo, E. A., Gómez-Ruiz, J., & Nord, R. (2019). Physiological and pathogenical characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* robertsii isolates for management of adult *Spodoptera frugiperda*. *Southwestern Entomologist*, 44(2), 409-421. <https://doi.org/10.3958/059.044.0206>
- Heras, H., Garin, C., & Pollero, R. (1998). Biochemical composition and energy sources during embryo development and in early juveniles of the snail *Pomacea canaliculata* (Mollusca: Gastropoda). *Journal of Experimental Zoology*, 280(6), 375-383. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19980415\)280:6<375::AID-JEZ1>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19980415)280:6<375::AID-JEZ1>3.0.CO;2-K)
- Hernández Mansilla, A. A., & Rosón Álvarez, C. (2005). Evaluación preliminar del crecimiento y la esporulación de *Aschersonia aleyrodinis* en medios de cultivos convencionales. *Fitosanidad*, 9(3), 61-63. <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209116189012.pdf>
- Inglis, G. D., Enkerli, J., & Goettel, M. S. (2012). *Laboratory Techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales*. [Manual of Techniques in Invertebrate Pathology]. Washington, USA: Ed Lawrence A. Lacey. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2.00007-5>
- Ishak, I.; Ng, L. C., Haris-Hussain, M., Jalinis, J., Idris, A. B., Azlina, Z., Samsudin, A., & Wahizatul, A. A. (2020). Pathogenicity of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) (MET-GRA4 Strain) as a potential biological control agent against the red palm weevil (Coleoptera: Dryophthoridae). *Journal of Economic Entomology*, 113(1), 43-49. <https://doi.org/10.1093/jee/toz233>
- Keyhani, N. O. (2018). Lipid biology in fungal stress and virulence: Entomopathogenic fungi. *Fungal Biology*, 122(6), 420-429. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.07.003>
- Kjeldahl J. (1883). New method for the determination of nitrogen. *Chem News*, 48(1240), 101-102.
- Mahmood, I., Imadi, S. R., Shazadi, K., Gul, A., & Hakeem, K. R. (2016). Effects of pesticides on environment. En K.R. Hakeem, M.S. Akhtar, & S.N.A. Abdullah (Eds.), *Plant, Soil and Microbes: Volume 1: Implications in Crop Science* (pp. 253-269). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3_13
- Montecalvo, M. P., & Navasero, M. M. (2021). Comparative virulence of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin to *Spodoptera frugiperda* (j.e. smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*, 27(1), 15-26. <https://www.ukdr.uplb.edu.ph/journal-articles/5246/>
- Nunes Lemes, A. R., Davolos, C. C., Legori, P. C. B. C., Fernandes, O. A., Ferre, J., Lemos, M. V. F., & Desiderio, J. A. (2014). Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A

- and Cry1 proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. *PLoS One*, 9(10), e107196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107196>
- Peteira, B., González, I., Arias, Y., Fernández Turro, A., Miranda, I., & Martínez, B. (2011). Caracterización bioquímica de seis aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Revista de Protección Vegetal*, 26, 16-22. https://agris.fao.org/agris-search/search.do?sessionid=31BE11238D09B296E2F6EC731573709E?request_locale=fr&recordID=CU2011100629&query=&sourceQuery=&sortField=&sortOrder=&agrovocString=&advQuery=¢erString=&enableField=
- Polovinko, G. P. (2013). Dependence of the viability and virulence of siberian isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals-Griv.) Vuill. on the period of their storage at positive temperatures. *Contemporary Problems of Ecology*, 6, 247-251. <https://doi.org/10.1134/S1995425513030116>
- Rajula, J., Pittarate, S., Suwannarach, N., Kumla, J., Ptaszynska, A. A., Thungrabeab, M., Mekchay, S., & Krutmuang, P. (2021). Evaluation of native entomopathogenic fungi for the control of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in thailand: A sustainable way for eco-friendly agriculture. *Journal of Fungi*, 7(12). <https://doi.org/10.3390/jof7121073>
- Ramos Elorduy, J., Pino Moreno, J. M., Morales De León, J. 2002. Análisis químico proximal, vitaminas y nutrientes inorgánicos de insectos consumidos en el estado de Hidalgo, México. *Folia Entomológica Mexicana*, 41(1), 15-29.
- Rodríguez Ortega, A., Pino Moreno, J. M., Ángeles Campos, S. C., García Pérez, A., Barrón Yáñez, R. M., & Callejas Hernández, J. (2016). Valor nutritivo de larvas y pupas de gusano de seda (*Bombyx mori*) (Lepidoptera: Bombycidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 42(1), 69-74. <https://doi.org/10.25100/socolen.v42i1.6672>
- Sapna Bai, N., Remadevi, O. K., Sasidharan, T. O., & Dharmarajan, P. (2020). Mass production of entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.): Evaluation of growth substrates and supplementation of growth media with silkworm pupa powder. *Biopesticides International*, 16(1), 27-35. https://connectjournals.com/toc.php?aid=%20O.%20K.%20RE-MADEV1&&bookmark=CJ-023217&&volume=16&&issue_id=01&&month=June&year=2020
- Sharapova, I. E. (2019). Prospects of using entomopathogenic fungus in development of a biopesticide product with nematocidal activity. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19, 101098. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101098>
- Soxhlet, F. V. (1879). Die gewichts analytics he bestimmung des milchfettes. *Dingler's Polytechnisches Journal*, 232(461-465).
- Suris Campos, M., Pérez Zaldivar, J. C., & Miranda, I. (2013). Competencia interespecífica entre *Heliothis virescens* (F.) y *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) en el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum* L.). *Revista de Protección Vegetal*, 28, 171-177. [https://www.semanticscholar.org/paper/Competencia-interespec%C3%ADfica-entre-Heliothis-\(F.\)-y-Campos-Zald%C3%ADvar/6418c36aff9049d1b8a85dc64036bd33b8176757](https://www.semanticscholar.org/paper/Competencia-interespec%C3%ADfica-entre-Heliothis-(F.)-y-Campos-Zald%C3%ADvar/6418c36aff9049d1b8a85dc64036bd33b8176757)
- Ullah, S., Raza, A. B. M., Alkafafy, M., Sayed, S., Hamid, M. I., Majeed, M. Z., Riaz, M. A., Gaber, N. M., & Asim, M. (2022). Isolation, identification and virulence of indigenous entomopathogenic fungal strains against the peach-potato aphid, *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae), and the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32(2), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00500-8>
- Vejar-Cota, G., García-Gutiérrez, C., Rosas-García, N. M., Escobedo-Bonilla, C. M., & González-Ocampo, H. A. (2017). Morphological and molecular characterization of entomopathogenic fungi with potential to control sugarcane borers at Sinaloa. *Southwestern Entomologist*, 42(2), 395-400. <https://doi.org/10.3958/059.042.0208>
- Yehia, R. S., Shaalan, E. A., & Al-Sheikh, H. M. (2022). Efficacy of two entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, isolated from Eastern Saudi Arabia against the house fly, *Musca domestica*. *Pakistan Journal of Zoology*, 54(3), 1405-1411. <https://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/20190204010222>
- Zibace, A., & Bandani, A. R. (2009). Purification and characterization of the cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* in the presence of Sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae) cuticle. *Biocontrol Science and Technology*, 19(8), 797-808. <https://doi.org/10.1080/09583150903132172>

Origen y financiación

Esta investigación se realizó en el laboratorio de Bioinsecticidas del Departamento de Biotecnología Agrícola del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (IPN), El trabajo se derivó de la tesis de maestría de Adara Graciano Obeso y fue financiado por el proyecto: Estudio de efectividad y persistencia de formulaciones de hongos entomopatógenos para el control de plagas del tomate” Clave SIP: 20200535.

Contribución de los autores

Adara Graciano-Obeso fue responsable de la realización del trabajo experimental, procesamiento de datos e imágenes y redacción del artículo. Cipriano García-Gutiérrez se encargó de la dirección, diseño y supervisión del trabajo experimental, revisión de resultados y redacción del artículo, es además el autor de correspondencia. María Nancy Herrera-Moreno apoyó en el diseño y supervisión del trabajo experimental, revisión de resultados y redacción del artículo. Hervey Rodríguez-González contribuyó con la realización de los análisis bromatológicos de las pupas de insectos estudiados. Juan Carlos Sainz Hernández participó en la supervisión del trabajo experimental, sugerencias y revisión del artículo. Gabriela Lizbeth Flores Zamora proporcionó apoyo técnico en el desarrollo del trabajo experimental.

Conflictos de interés

Los autores declaramos no tener conflictos de intereses.