

## Materiales porosos como soporte de viabilidad de *Beauveria bassiana* para el biocontrol de *Sphenarium purpurascens* *in vitro*

Antonio Rivera-Tapia<sup>1</sup>, Luis Josué Amaro-Leal<sup>2</sup>, M. Angeles Valencia-de Ita<sup>2</sup>,  
Conrado Parraguirre-Lezama<sup>2</sup>, Dora M. Sangerman-Jarquín<sup>3</sup>  
y Omar Romero-Arenas<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, ICUAP-BUAP; Edificio 103-J, Ciudad Universitaria. C.P. 72570, Puebla, México

<sup>2</sup> Centro de Agroecología, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP); Edificio VAL 1, Km 1,7 carretera a San Baltazar Tetela, San Pedro Zacachimalpa. C.P. 72960, Puebla, México

<sup>3</sup> Campo Experimental Valle de México-INIFAP. Carretera Los Reyes-Texcoco km 13,5, Coatlinchán, Texcoco, Estado de México. CP. 56250, México

### Resumen

Los hongos entomopatógenos son un amplio grupo de microorganismos que proveen múltiples servicios a los sistemas agroecológicos y, presentan algunas ventajas sobre los insecticidas químicos, ya que producen tasas de mortalidad de un modo natural y tienen menor impacto ambiental que éstos. La producción de agentes de biocontrol como *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) encuentra múltiples limitaciones, como el ajuste de la concentración óptima de conidios y velocidad específica de muerte, entre otras; además, se desconoce el potencial que pueden tener las cepas nativas mexicanas para su uso en el control del chapulín, *Sphenarium purpurascens* (un ortóptero comestible pero que se comporta como plaga en muchos cultivos).

En la presente investigación, se evaluó la mortalidad de dos instares (o estadios) de *S. purpurascens* *in vitro* más la fase adulta, mediante la aplicación de bio-preparados de la cepa MA-Bb1 en materiales porosos como soporte. La mayor mortalidad corregida %MC y la mayor velocidad específica de muerte K ( $d^{-1}$ ) del ortóptero para los diferentes instares, así como para el adulto de *S. purpurascens*, se presentó en el bio-preparado (Zeolita+Diatomita+B. *bassiana*) a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios  $mL^{-1}$ , presentando una viabilidad del 89,1 %. Estos resultados muestran la posibilidad para el biocontrol con el uso de la cepa nativa mexicana MA-Bb1 de *B. bassiana* en combinación con materiales porosos de diatomita y zeolita, en condiciones de laboratorio.

**Palabras clave:** Conidios, cepa nativa, chapulín, mortalidad, monominerales.

---

\* Autor para correspondencia: biol.ora@hotmail.com

Cita del artículo: Rivera-Tapia A, Amaro-Leal LJ, Valencia-de Ita MA, Parraguirre-Lezama C, Sangerman-Jarquín DM, Romero-Arenas O (2021). Materiales porosos como soporte de viabilidad de *Beauveria bassiana* para el biocontrol de *Sphenarium purpurascens* *in vitro*. ITEA-Información Técnica Económica Agraria 117(2): 90-107. <https://doi.org/10.12706/itea.2020.032>

### Porous materials as viability support of *Beauveria bassiana* for the biocontrol of *Sphenarium purpurascens* *in vitro*

#### Abstract

Entomopathogenic fungi are a large group of micro-organisms that provide multiple services to agro-ecological systems and have some advantages over chemical insecticides, since they produce mortality rates naturally and have less environmental impact. The production of biocontrol agents such as *Beauveria bassiana* finds multiple limitations, such as the adjustment of the optimum concentration of conidia and specific speed of death, among others. In addition, the potential that Mexican native strains can have for their use in the control of the grasshopper *Sphenarium purpurascens* (an edible insect but that behaves as a pest in several crops). In the present investigation, the mortality of two instars (or stages) of *S. purpurascens* *in vitro* plus the adult phase, was evaluated by applying bio-preparations of the MA-Bb1 strain in porous materials as support. The highest corrected mortality CM% and the highest specific speed of death  $K(d^{-1})$  of the orthopteran for the different instars, as well as for the adult of *S. purpurascens* was presented in the bio-preparation (Zeolite + Diatomite + *B. bassiana*) at a concentration of  $1 \times 10^8$  conidia  $mL^{-1}$ , presenting a viability of 89,1%. These results show the possibility for biocontrol with the use of the native Mexican strain MA-Bb1 of *B. bassiana* in combination with porous materials of diatomite and zeolite, in laboratory conditions.

**Keywords:** Conidia, native strain, grasshopper, mortality, monomineralic.

#### Introducción

*Sphenarium purpurascens* (Orthoptera: Acrididae; Romaleidae) es una especie cosmopolita, distribuida en zonas tropicales, desérticas y con mayor frecuencia en praderas, donde alcanza altas poblaciones (Bustillos-Rodríguez et al., 2015). Cueva del Castillo et al. (1999) mencionan que en México se distribuyen ampliamente en la zona centro y sur del país abarcando los estados de Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas, para la zona sur y los estados de Hidalgo, Michoacán, Querétaro, México y Puebla para el centro del país, afectando diversos cultivos agrícolas como frijol, alfalfa, calabaza y maíz, (Morales-Martínez et al., 2013). El valle de Puebla-Tlaxcala, estados pertenecientes al centro de México, presentan cultivos predominantes como el maíz, el frijol y la alfalfa, que son continuamente afectados por *S. purpurascens*; alimentándose del follaje y causando pérdidas económicas al productor (Cerritos y Cano-Santana, 2007). Esta especie abarca hasta Guatemala y algunas islas del Caribe (Kevan,

1977), sin embargo, hay que considerar que hay más de 350 especies de saltamontes y langostas que invaden periódicamente los agrosistemas de todo el mundo, donde las poblaciones locales pueden aumentar significativamente y considerarse "plagas nativas", además, las especies de plagas no nativas pueden migrar al área y, en algunos casos, cambiar las interacciones entre especies nativas (Speight et al., 1999).

En todo el mundo se utilizan los pesticidas químicos en entornos agrícolas, es una práctica común para el control de plagas; sin embargo, la aplicación de estos productos, involucra una gran variedad de fuentes de exposición, incluyendo residuos en alimentos, suelo y agua, encontrando efectos negativos como la muerte de organismos no objetivo, problemas de salud humana, contaminación ambiental e interferencia con las funciones del ecosistema (Sanborn et al., 2007), generando pérdida en la biodiversidad, concretamente, los insectos polinizadores son muy susceptibles a la acción de ciertos compuestos químicos.

Además, muchos insectos desarrollan rápidamente resistencia genética a los pesticidas (Georghiou y Mellon, 1983), agudizando más los problemas antes mencionados.

Estos métodos han obligado a buscar alternativas a los insecticidas sintéticos y el biocontrol representa una posibilidad para el control de *S. purpurascens* (Vázquez-Jorge et al., 2016). El uso de hongos entomopatógenos para el biocontrol de insectos en diversos cultivos, ha sido una de las mejores propuestas para combatir diferentes plagas, ya que presentan un amplio espectro de huéspedes (De Faria y Wraight, 2007). Entre los hongos más utilizados como insecticidas biológicos, se incluye a *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*; *B. bassiana* infecta más de 200 especies de insectos y ácaros de diversos géneros, en los órdenes Orthoptera, Hemiptera, Lepidoptera, Dermaptera, Hymenoptera, Coleoptera, entre otros, además se cree que *B. bassiana* puede ser efectivo para el biocontrol de *S. purpurascens* en el valle de Puebla-Tlaxcala, ya que se ha observado tiene la capacidad de penetrar la cutícula del insecto (Huerta et al., 2014).

Para la utilización de *B. bassiana*, como agente de biocontrol, es necesario desarrollar sistemas de producción y formulación masiva que permitan mayor eficacia que los productos químicos, siendo uno de los requisitos para la aceptación y comercialización de un preparado biológico, además se deben desarrollar formulaciones que garanticen su viabilidad, capacidad de desarrollo y almacenamiento (Cruz et al., 2006).

Una posibilidad sería el uso de determinados materiales porosos como portadores de estos hongos. Algunos de ellos presentan una composición mayoritaria de un solo mineral, de los cuales destacan el yeso, la sal común, la anhidrita, la calcita y algunas zeolitas; también se incluyen las diatomitas, las radiolarias y calizas fusulinicas, que se componen de esqueletos silíceos de diatomeas (algas unicelulares)

lulares) y de radiolarios (protozoos microscópicos). El uso de polvos inertes, presentan una alternativa para el control de insectos, pero que son relativamente inofensivos para los humanos y los vertebrados superiores, además de tener un impacto limitado en el ambiente (Rouhani et al., 2012).

La preparación de materiales mesoporosos a partir de monominerales presentan excelentes propiedades de adsorción de moléculas orgánicas de diferente naturaleza, intercambiadores iónicos, catalizadores y tamices moleculares, características que los hacen muy atractivos, tanto a nivel de laboratorio como industrial, adsorbentes con estas propiedades selectivas incluyen carbones activados, sílice microporosa y zeolitas (Bhattacharyya et al., 2010). Estos desarrollos provocaron un renovado interés en el uso de polvos desecantes para el control de plagas de insectos, ya que las nanopartículas (Rouhani et al., 2012) y las zeolitas son ejemplos de clases de materiales cuyo potencial para el manejo de plagas agrícolas se ha evaluado recientemente. Pero también los "insecticidas naturales" establecidos como las tierras de diatomeas están siendo revisados por los investigadores (De Smedt et al., 2015).

Las zeolitas, en cambio, son materiales microporosos [diámetro de poro (w),  $w < 2$  nm (De Smedt et al., 2015), constituidos principalmente de átomos de Si y Al (llamados átomos T), cada uno de los cuales está unido de forma tetraédrica a los átomos de  $O^2$ . Considerando este aspecto, las zeolitas presentan muchas aplicaciones, el tamaño y la selectividad de formas, intervienen en procesos de catálisis, intercambio iónico y adsorción (Curtis y Deem, 2003).

Los datos sobre la efectividad de las zeolitas contra las plagas de insectos son escasos, sin embargo, Haryadi et al. (1994) han demostrado que la zeolita natural puede ser efectiva para controlar el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* (Motsch), además Kljajić et

a/. (2011) también han encontrado una alta efectividad de la zeolita natural originaria de Serbia, contra tres plagas de escarabajos en trigo almacenado.

Por otro lado, la diatomita esta constituida por dióxido de silicio proveniente de restos fosilizados de algas diatomeas de agua dulce y salada (Cook y Armitage, 2000). El silicio constituye entre el 70 % y 90 % del total de los compuestos presentes en la diatomea, siendo el resto cantidades pequeñas de minerales como calcio, fósforo, azufre, níquel, zinc, manganeso, aluminio, hierro, magnesio y sodio (Korunic, 1998) compuestos importantes para el desarrollo de microorganismos. Además, las diatomeas son insecticidas naturales; utilizados en el control integrado de plagas en diversos cultivos agrícolas (Korunic, 1997; Arthur, 2004). Athanassiou y Korunic (2007), manifestaron que la susceptibilidad de los insectos a la diatomita es variable, dependiendo de la especie y estadio de desarrollo, sin embargo, las tendencias actuales en el manejo integrado de plagas (MIP), se orientan hacia la preservación del ambiente junto al uso de métodos de bajo impacto y pesticidas naturales de escasa toxicidad, entre los que se encuentran, las tierras de diatomeas (Dal Bello et al., 2006).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la mortalidad de *S. purpurascens* mediante la combinación de 2 materiales mesoporosos (zeolita y diatomita) y conidios de *B. bassiana* *in vitro*, así como viabilidad de conidios en los materiales porosos.

## Material y métodos

### Material biológico

Se utilizó la cepa MA-Bb1 de *B. bassiana*, proveniente del Municipio de Tetela de Ocampo, Puebla, México; dicha cepa fue depositada y mantenida en medio de cultivo agar papa

dextrosa (PDA) en el Centro de Recursos Genéticos del Centro de Agroecología del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), cuya identidad se confirmó mediante la amplificación de la región ITS1 e ITS4 (White et al., 1990).

La secuencia obtenida para cada región genómica de la cepa MA-Bb1 se comparó *in silico* con 9 accesiones homólogas mediante la herramienta BLAST, presente en el sitio Web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, 2020) de los Estados Unidos.

### Elaboración de bio-preparados y viabilidad de la cepa MA-Bb1

Las preparaciones se hicieron a partir de colonias frescas de *B. bassiana* en medio de cultivo PDA de 10 días, sometidas a un fotoperiodo de 12:12 horas luz:oscuridad, reproduciéndola masivamente en 500 g de arroz esterilizado en 10 cajas Petri con 5 mL de agua estéril, inoculadas con un disco de 0,5 mm de la cepa MA-Bb1, e incubadas durante 20 días a  $28 \pm 1$  °C y 60 % de humedad. Para la obtención de conidios, se frotó suavemente el arroz colonizado en un tamiz ENDECOTTS® hasta la obtención de un polvo fino mediante operación manual; tras esto, cada muestra se tamizó mediante una rejilla metálica n.º 60 con malla de apertura de 250 µm; se molieron hasta obtener un tamaño de partícula de 0,2 mm (AOAC, 2006). Se determinó la concentración de conidios en una proporción de 1/10 mediante el conteo en una cámara Neubauer, ajustando la suspensión inicial con  $1 \times 10^8$  con  $\text{mL}^{-1}$ . Se prepararon 4 bio-preparados con la cepa MA-Bb1 a base de zeolita y diatomita, así como un grupo testigo, que consistió de agua destilada estéril.

La viabilidad de conidios se calculó haciendo una relación entre el porcentaje de germinación y el número de conidios iniciales de cada bio-preparado, el cual se consideró como el 100 % de viabilidad (Tabla 1). Se ob-

servaron 100 conidios y se registró el número de conidios germinados de los cinco puntos de la placa de Petri; se consideraron germinados aquellos conidios cuyo tubo germinativo mostrase la mitad del diámetro del co-

nidio; esta cuenta se hizo por triplicado para cada bio-preparado a base de *B. bassiana* (Dal Bello et al., 2006). Los datos se sometieron a un análisis de varianza y a la prueba de grupos homogéneos ( $P < 0,05$ ).

Tabla 1. Formulación y viabilidad de bio-preparados a base de conidios de *Beauveria bassiana* (Bb1).  
Table 1. Formulation and viability of bio-preparations based on conidia of *Beauveria bassiana* (Bb1).

Clave	Zeolita (g)	Diatomita (g)	Agua (mL)	Conidios $\text{mL}^{-1}$ <i>B. bassiana</i>	% Viabilidad inicial	% Viabilidad final	EEM
Z+D+Bb1	25	25	250	$1 \times 10^8$	100	89,11 <sup>a</sup>	1,2741
Z+Bb1	50	–	250	$1 \times 10^8$	100	83,88 <sup>a</sup>	0,9043
D+Bb1	–	50	250	$1 \times 10^8$	100	56,33 <sup>b</sup>	3,2956
Bb1	–	–	250	$1 \times 10^8$	100	49,11 <sup>b</sup>	3,8530
Z+D	30	30	250	–	–	–	–
Testigo	–	–	250	–	–	–	–

Medias con letras diferentes indican diferencias significativas con la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ). EEM = error estándar de la media.  $F_{\text{cal.}}$  = F calculada (55,9260) y  $P_{\text{val}}$  = valor de P (Probabilidad  $\leq 0,001$ ); Z = zeolita, D = tierra de diatomitas.

### Inoculación de *B. bassiana* en tres instares de *S. purpurascens* in vitro

Para efectuar los 4 bioensayos se utilizaron en total 2.160 individuos de *S. purpurascens* colectados en parcelas de maíz del municipio de Amozoc de Mota, Puebla-México. En cada bioensayo se evaluó la eficacia de los mismos bio-preparados sobre los instares segundo, cuarto y sobre adultos recolectados en el periodo de julio de 2017 a agosto de 2018, como se muestra en la Tabla 2.

Se utilizó una caja de plástico por instar, tratamiento y ensayo de 102 L de capacidad, largo de 34,41 cm, ancho de 78 cm y altura 38 cm, modelo BO102GAL cubierta con malla mosquitera n.º 2 (Douglas et al., 1997). En cada una de las cajas, se agregaron 250 mL de cada bio-preparado, con la ayuda de una

Aspersora de Compresión Swissmex 1,5 L modelo: 310.055 observándose cada 24 h durante 15 días; es decir, que al final del experimento se utilizaron 1.620 individuos de los tres instares para el año 2017 y 540 para el año 2018. A todos los tratamientos se les adicionó 3,7 kg de alfalfa (*Medicago sativa* L.) fresca como dieta de los chapulines por unidad experimental en los 2 años del experimento, la temperatura se mantuvo a  $26 \pm 1$  °C y la humedad relativa a  $84 \pm 2$  %.

### Análisis de datos

La mortalidad se corrigió mediante la fórmula de Abbott (1925) y se expresó en porcentaje, donde se transformó con arcocoseno angular. Los datos se analizaron mediante un ANOVA utilizando el modelo cuadrático de superficie de respuesta para la mortalidad

Tabla 2. Fecha de colecta y evaluación de los bioensayos en los diferentes estadios de *S. purpurascens* recolectados en el periodo de julio de 2017 a agosto de 2018.

Table 2. Evaluation of bioassays in the different stages of *S. purpurascens* collected in the period from July 2017 to August 2018.

Bioensayo/Estadio	Instar 2	Instar 4	Adulto
<b>Bioensayo 1</b>			
Colecta	07/07/2017	28/07/2017	03/09/2017
Evaluación	08 de julio al 18 de septiembre de 2017		
<b>Bioensayo 2</b>			
Colecta	14/07/2017	04/08/2017	10/09/2017
Evaluación	15 de julio al 25 de septiembre de 2017		
<b>Bioensayo 3</b>			
Colecta	21 /07/2017	11/08/2017	17/09/2017
Evaluación	22 de julio al 02 de octubre de 2017		
<b>Bioensayo 4</b>			
Colecta	14/07/2018	04/08/2018	10/09/2018
Evaluación	15 de julio al 25 de septiembre de 2018		

Se colectaron 180 individuos en cada bioensayo y estadio analizado.

corregida de *S. purpurascens* y la prueba de grupos homogéneos a un nivel de significancia de  $P < 0,05$ . Los tiempos letales medio y alto ( $TL_{50}$  y  $TL_{80}$ ) se obtuvieron con el análisis Probit (Finney, 1972) y posteriormente se determinó la velocidad específica de muerte  $K$  ( $d^{-1}$ ); que representa el menor tiempo de afectación del 50 % de la población bajo estudio, donde nuevamente se les realizó un ANOVA mediante el modelo cuadrático de superficie de respuesta a ( $P < 0,05$ ). Todos los cálculos y pruebas estadísticas se realizaron utilizando el software estadístico SPSS versión 17 (Statistical Package for Social Sciences).

## Resultados y discusión

### Identificación

La identificación morfológica de la cepa MA-Bb1 se realizó con el propósito de corroborar la clasificación taxonómica del género *Beau-*

*veria*. La cepa MA-Bb1 se caracterizó por presentar un crecimiento lento de forma radial, llegando alcanzar 23 mm de diámetro en 10 días, lo que coincide con lo establecido por Domsch *et al.* (1993) para *B. bassiana*, que presenta un rango de 6 a 23 mm de diámetro.

El aspecto de la colonia de *B. bassiana* fue lanoso, mostrando micelio aéreo abundante, presentando un color blanco al principio de su desarrollo, tornándose amarillento a los 10 días en el medio PDA. La cepa MA-Bb1 presentaron hifas lisas y cenocíticas, con células conidiogemas formando densos racimos irregularmente agrupados; las fialides presentaban una morfología de lageniformes estrechamente lageniformes. El tamaño de las células conidiogemas fue de  $3,6 \times 1,5 \mu\text{m}$ , el raquis de  $2,2 \times 1 \mu\text{m}$ . Los conidios fueron hialinos de forma globosa con un tamaño de  $2,3 \mu\text{m}$  de diámetro; estos resultados coincidieron con la descripción de Domsch *et al.* (1993) para la especie *B. bassiana*.

Con la amplificación de la región ITS ribosomal se obtuvo un producto de 610 pb de la cepa MA-Bb1, el que presentó 100 % de identidad con *B. bassiana* (Muro et al., 2005; Cruz et al., 2006) en los datos del GenBank, esta secuencia se incluyó en la base de datos del National Center for Biological Information (NCBI) con el número de acceso MN209825.1. El árbol filogenético (Figura 1) se construyó con 9 accesos disponibles en la base de datos del (NCBI) de la región 5,8S ribosomal de *B. bassiana* (Tabla 3).

### Evaluación de los bioensayos de mortalidad de tres instares de *S. purpurascens* in vitro

El mayor número de conidios viables se obtuvo en el bio-preparado (Z+D+Bb1) con 89,1 %, las menores viabilidades de conidios se obtuvieron en los bio-preparados (D+Bb1) con 56,3 % y (Bb1) con 49,1 % (Tabla 1). Al respecto Shah et al. (2005) mencionan que al seleccionar preparados con una alta viabilidad de conidios aumenta la probabilidad de éxito en el campo, donde su viabilidad, re-

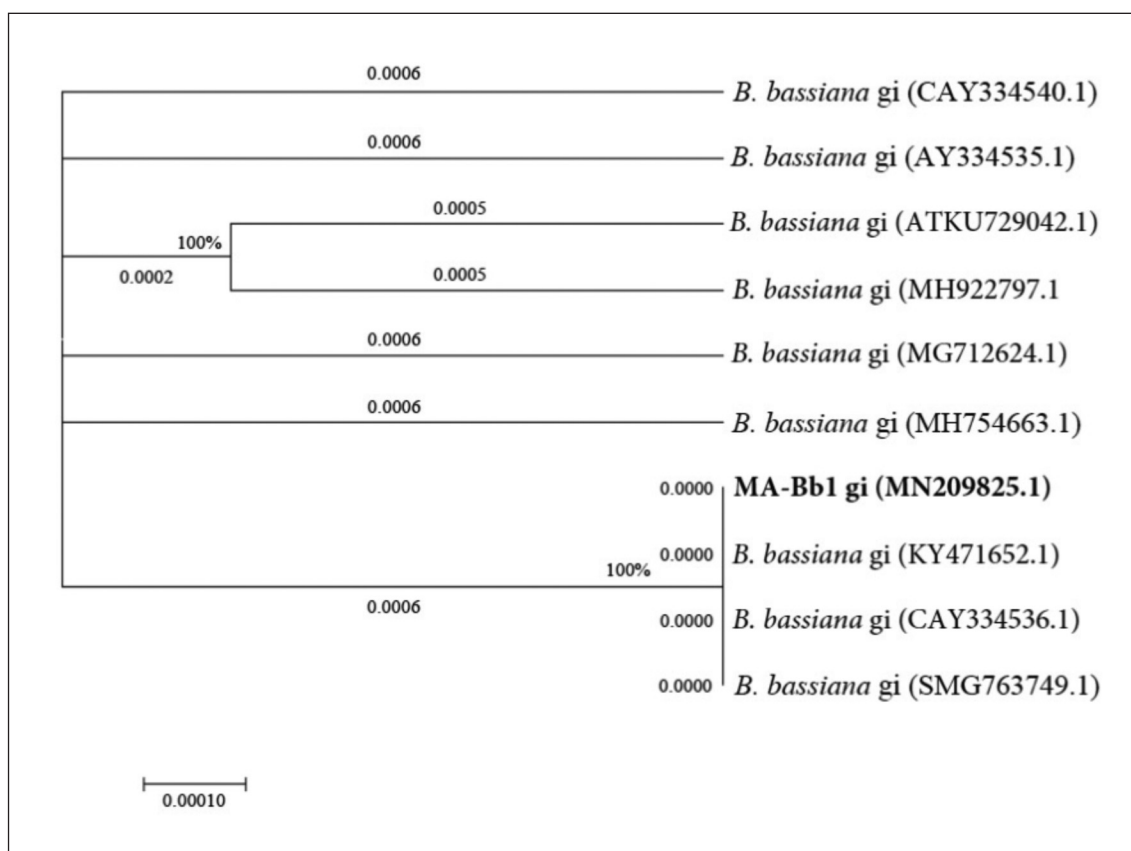


Figura 1. Árbol filogenético que incluyó la cepa MA-Bb1 (MN209825.1) generado por el método máxima verosimilitud (Kumar et al., 2016).

Figure 1. Phylogenetic tree including the MA-Bb1 (MN209825.1) strain generated by the maximum likelihood method (Kumar et al., 2016).

Tabla 3. Grado de identidad del producto de PCR de la cepa MA-Bb1 presente del GenBank (MN209825.1) comparado con 9 accesos de la base pública.

Table 3. Degree of identity of the PCR product of the MA-Bb1 strain present in GenBank (MN209825.1) compared to 9 accesses of the public base.

Producto de PCR	Identidad(%)	Especie	Cod. Gen bank
610 pb	100,00	<i>B. bassiana</i> (MA-Bb1)	MN209825.1
562 pb	100,00	<i>Beauveria bassiana</i>	KY471652.1
569 pb	100,00	<i>B. bassiana</i>	AY334536.1
570 pb	100,00	<i>B. bassiana</i>	MG763749.1
573 pb	99,80	<i>B. bassiana</i>	MH754663.1
575 pb	99,60	<i>B. bassiana</i>	KU729042.1
537 pb	99,60	<i>B. bassiana</i>	MH922797.1
566 pb	99,21	<i>B. bassiana</i>	MG712624.1
569 pb	98,19	<i>B. bassiana</i>	AY334540.1
569 pb	98,19	<i>B. bassiana</i>	AY334535.1

sistencia a factores ambientales o la presencia de otros microorganismos competidores está directamente relacionado con la capacidad de permanencia y virulencia de estos organismos, características determinantes para la selección de cepas para el biocontrol.

En la Tabla 4 se muestra el resumen del ANOVA para el modelo cuadrático de superficie de respuesta, a los cuatro días después de tratamiento. El valor del Modelo para F = 5099,263 y su correspondiente valor que implica un modelo altamente significativo.

No hubo diferencias significativas entre ensayo; esto nos indica que los resultados fueron constantes a lo largo del tiempo y que el momento de realización de los ensayos no afectó a los bio-preparados ni influyó en los diferentes instares de *S. purpurascens* en condiciones *in vitro*. No obstante, la interacción entre los bio-preparados e instares fue significativa. Por lo tanto, los tratamientos no tuvieron el mismo efecto sobre los diferentes estadios de los insectos. Así mismo, los dife-

rentes bio-preparados e instares de *S. purpurascens* tuvieron un efecto significativo sobre la mortalidad corregida (%) de *S. purpurascens in vitro* (Figura 2 A-D). La interacción entre los bio-preparados e instares fueron significativos ( $P < 0,014$ ). Dos de los tratamientos fueron los más eficaces (Figura 2 A-C) sobre los instares 2, 4 y adultos de *S. purpurascens*: Z+D+Bb1 y D+Bb1; en los instares 4 se añadió Z+Bb1 y para los adultos también Z+D, presentando todos estos casos una mortalidad mayor al 70 %. Por lo contrario, los preparados Z+D, Bb1 y Z+Bb1 alcanzaron eficacias inferiores al 70 % en los instares 2; para los instares 4 lo fueron los preparados Z+D y Bb1 y para los adultos, el preparado Bb1 fue el que mostró la menor eficacia (Figura 2 C).

Cabe recalcar que estos resultados se refieren a los 4 días después de la aplicación de los tratamientos y que todos los bio-preparados consiguieron un 100 % de mortalidad en los insectos a los 15 días a excepción de Z+D con los adultos (Figuras 2 A-D).



Tabla 4. ANOVA del modelo cuadrático de superficie de respuesta para la mortalidad corregida de *S. purpurascens*.

Table 4. ANOVA of the quadratic response surface model for corrected mortality of *S. purpurascens*.

Variable dependiente: mortalidad corregida (%)					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo	86185,451	71	1213,880	5099,263	<0,011
Intercepto	268527,122	1	268527,122	1128028,239	<0,001
Ensayos (1, 2, 3 y 4)	21,403	3	7,134	29,970	0,133
Tratamientos (control, Bb1, Z+D, Z+Bb1, D+Bb1 y Z+D+Bb1)	77750,983	5	15550,197	65323,237	<0,003
Instares (2º, 4º y adulto)	380,924	2	190,462	800,092	<0,025
Ensayos × Tratamientos	42,890	15	2,859	12,011	0,223
Ensayos × Instares	45,421	6	7,570	31,801	0,135
Tratamientos × Instares	7060,603	10	706,060	2966,017	<0,014
Ensayos × Tratamientos × Instares	174,632	30	5,821	24,453	0,159
Error	0,238	1	0,238		
Total	361117,765	73			
Total corregido	86185,689	72			
R <sup>2</sup>	0,911				
Cuadrado R <sup>2</sup>	0,823				
Cuadrado ajustado R <sup>2</sup>	0,830				

El porcentaje de mortalidad se basó en los resultados de los cuatro ensayos evaluados el día 4 del segundo instar (Figura 2A), debido a que fue el primer día donde se alcanzó el 72 % de mortalidad con el tratamiento (Z+D+Bb1). A los seis días después de la inoculación, las ninfas del segundo instar exhibieron 100 % de mortalidad en todos los tratamientos con *B. bassiana* (Figura 2A). Estos resultados son similares a los reportados por Johnson y Goettel (1993), quienes obtuvieron un 70 % de mortalidad en otra especie de ortóptero *Melanoplus bivittatu* (Orthoptera: Acrididae; Romaleidae), con una

concentración de  $2 \times 10^{10}$  con  $g^{-1}$ . La menor mortalidad se obtuvo con el tratamiento (Z+D) con 17,5% a los cuatro días, alcanzando el 100% de mortalidad a los 15 días.

De manera consistente, el porcentaje de mortalidad en el cuarto instar presentó diferencias entre los bio-preparados evaluados (Figura 2D). García y González (2009) citan que *B. bassiana* con dosis de  $1,2 \times 10^9$  blastósporas  $mL^{-1}$  causaron una mortalidad del 100 % de las ninfas del cuarto instar de *S. purpurascens* a los 6 días, cabe resaltar que estos autores no utilizaron como soporte nano ma-

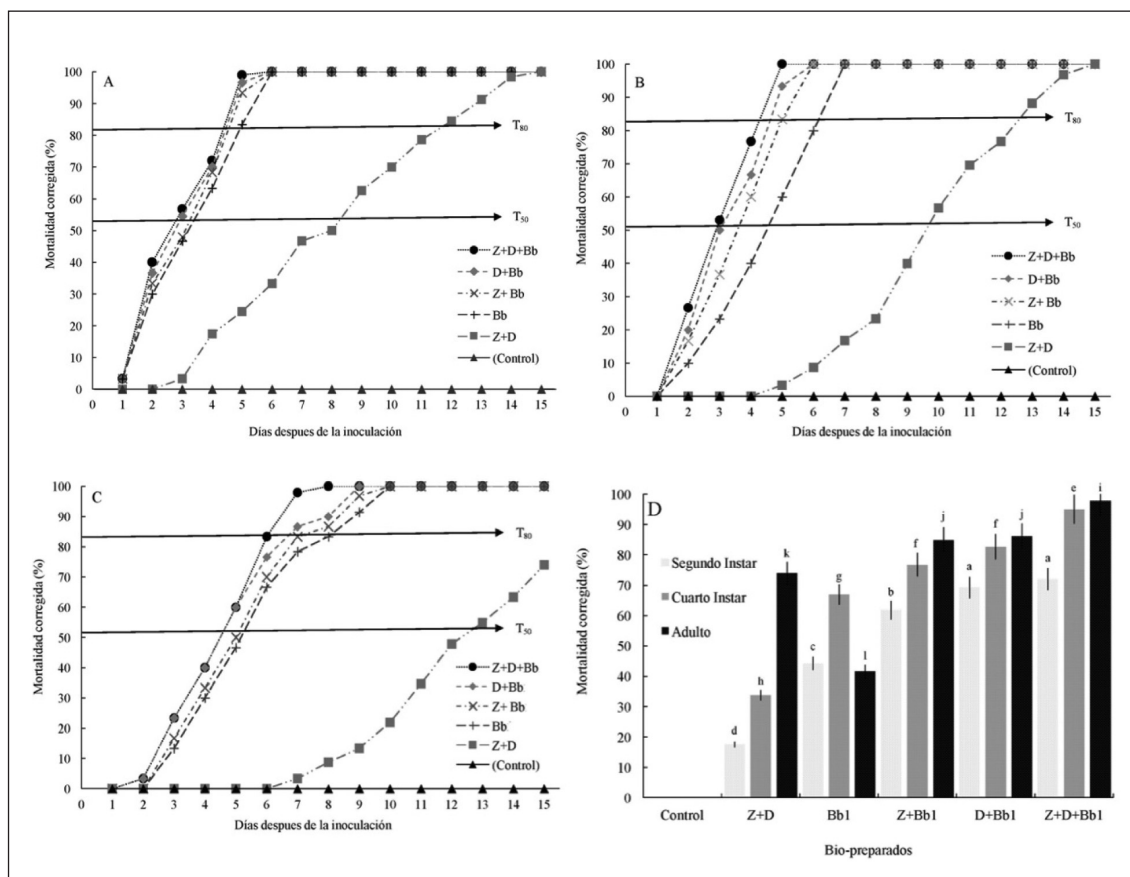


Figura 2. Mortalidad corregida (%) de los diferentes estadios de *S. purpurascens*: A) Segundo instar, B) Cuarto instar y C) Adulto, en diferentes bio-preparados a base de *B. bassiana* (Bb1), diatomita y zeolita. Z = zeolita, D = tierra de diatomitas. D) Promedio de mortalidad corregida (%). Medias con letras diferentes indican diferencias significativas con la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ), a-d = segundo instar; e-h = cuarto instar; i-l = adulto. Figure 2. Corrected mortality (%) of the different stages of *S. purpurascens*: A) Second instar, B) Fourth instar and C) Adult in different bio-preparations, based on *B. bassiana* (Bb1), diatomite and zeolite. Z = zeolite, D = diatomaceous earth. D) Corrected mortality average (%). Means with different letters indicate significant differences with the Tukey test ( $P < 0.05$ ), a-d = second instar; e-h = fourth instar; i-l = adult.

teriales, sin embargo, es muy similar la concentración de conidios utilizados en la presente investigación.

Los bio-preparados a base de zeolita (Z) y diatomita (D) con una concentración de  $1 \times 10^8$  con  $\text{mL}^{-1}$ , ocasionaron mortalidad en los cuatro ensayos evaluados, donde se alcanzó el del 97,9 % en adultos de *S. purpurascens* a

los 7 días después de la inoculación (Figura 2C); así mismo, el menor promedio de mortalidad se obtuvo en el bio-preparado (Z+D) con 74 % a los 15 días después de la inoculación (Figura 2C). Estos resultados son similares a los reportados por Adatia et al. (2010) quienes obtuvieron un 50 % de mortalidad en chapulines al día 5 y 90 % mortalidad al

séptimo día, utilizando únicamente tierra de diatomita. Es conocido que el uso de zeolitas y diatomitas polvos presenta mortalidad en insectos, como lo mencionan Andrić et al. (2012) donde investigaron el potencial insecticida de dos zeolitas naturales contra adultos del gorgojo del arroz, *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) y el escarabajo rojo *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae), reportando el 96 % y el 100 % de mortalidad después de 21 días de exposición al trigo tratado con 1,000 ppm. En los presentes ensayos, el testigo no presentó mortalidad al utilizar la fórmula de Abbott. Cabe resaltar que en general, haciendo la media de todos los tratamientos, la mortalidad a los 4 días después de tratamiento sobre los adultos de *S. purpurascens* fue significativamente superior a la registrada sobre el segundo y cuarto instar (Figura 3A), sin embargo el segundo y cuarto instar entre ellos no fueron significativos.

La diatomita presentó una acción insecticida en los bioensayos de mortalidad del presente trabajo, ya que posiblemente mejoró la absorción de sustancias químicas durante la penetración de microorganismos al exoesqueleto del insecto, como lo mencionan Choe et al. (2012) que la diatomita participa en la disolución de lípidos cuticulares que facilitan la penetración de microorganismos a través del exoesqueleto, además de que participa en procesos de comunicación química por contacto (Pedrini et al., 2007). Ho et al. (2019) presentaron que la combinación de surfactantes como zeolita, perlita y vermiculita junto con conidias fúngicas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* mostraron alta virulencia contra *Riptortus pedestris* *in vitro*.

#### **Evaluación de los bioensayos de la velocidad específica de muerte de tres instares de *S. purpurascens* *in vitro***

Utilizando los modelos de regresión, se obtuvo como resultado el promedio para la ve-

locidad específica de muerte  $K$  ( $d^{-1}$ ) entre 89,1 % y 49,1 % de viabilidad de conidios para los diferentes instares de *S. purpurascens*. En la Tabla 5 se muestra un resumen del ANOVA para el modelo cuadrático de superficie de respuesta, se encontró un modelo para  $F = 17244,203$  y su correspondiente valor bajo "Prob > F" ( $P < 0,006$ ).

Así mismo los diferentes bio-preparados ( $P < 0,02$ ) e instares de *S. purpurascens* ( $P < 0,005$ ) tuvieron un efecto significativo para la velocidad específica de muerte  $K$  ( $d^{-1}$ ) *in vitro* (Tabla 5). Pero de nuevo la interacción entre los tratamientos e instares fue también significativa ( $P < 0,008$ ) lo que indica que el modelo se ajusta a los datos experimentales y es altamente significativo. La variable número de ensayo no presentó diferencias significativas para este parámetro, lo cual indica, que la velocidad específica de muerte  $K$  ( $d^{-1}$ ) es afectada por los bio-preparados en los diferentes instares larvarios en condiciones *in vitro*.

El bio-preparado (Z+D+Bb1) presentó la mayor velocidad específica de mortalidad  $K$  ( $d^{-1}$ ), para las ninfas del 4º instar y adultos en los cuatro ensayos evaluados. Sin embargo, para el segundo instar el bio-preparado (Z+Bb1) presentó la mayor velocidad específica de mortalidad  $K$  ( $d^{-1}$ ), ver figura 4. Kljajić et al. (2011) mencionan que la tierra de diatomitas con estructura de sílice amorfa, mostró un alto potencial insecticida y fue más efectiva que los polvos de zeolita natural, como los aluminosilicatos hidratados cristalinos; además las zeolitas tienen desventajas específicas debido a la presencia de más ingredientes cristalinos o partículas más pequeñas contra *Sitophilus oryzae* (L.) y *Tribolium castaneum* (Herbst). Cabe resaltar que, en general, que los adultos de *S. purpurascens* presentaron diferencias significativas de velocidad de muerte en la mayoría de tratamientos con el segundo y cuarto instar, sin embargo, entre el segundo y cuarto instar no se encontraron diferencias significativas (Figura 3B).

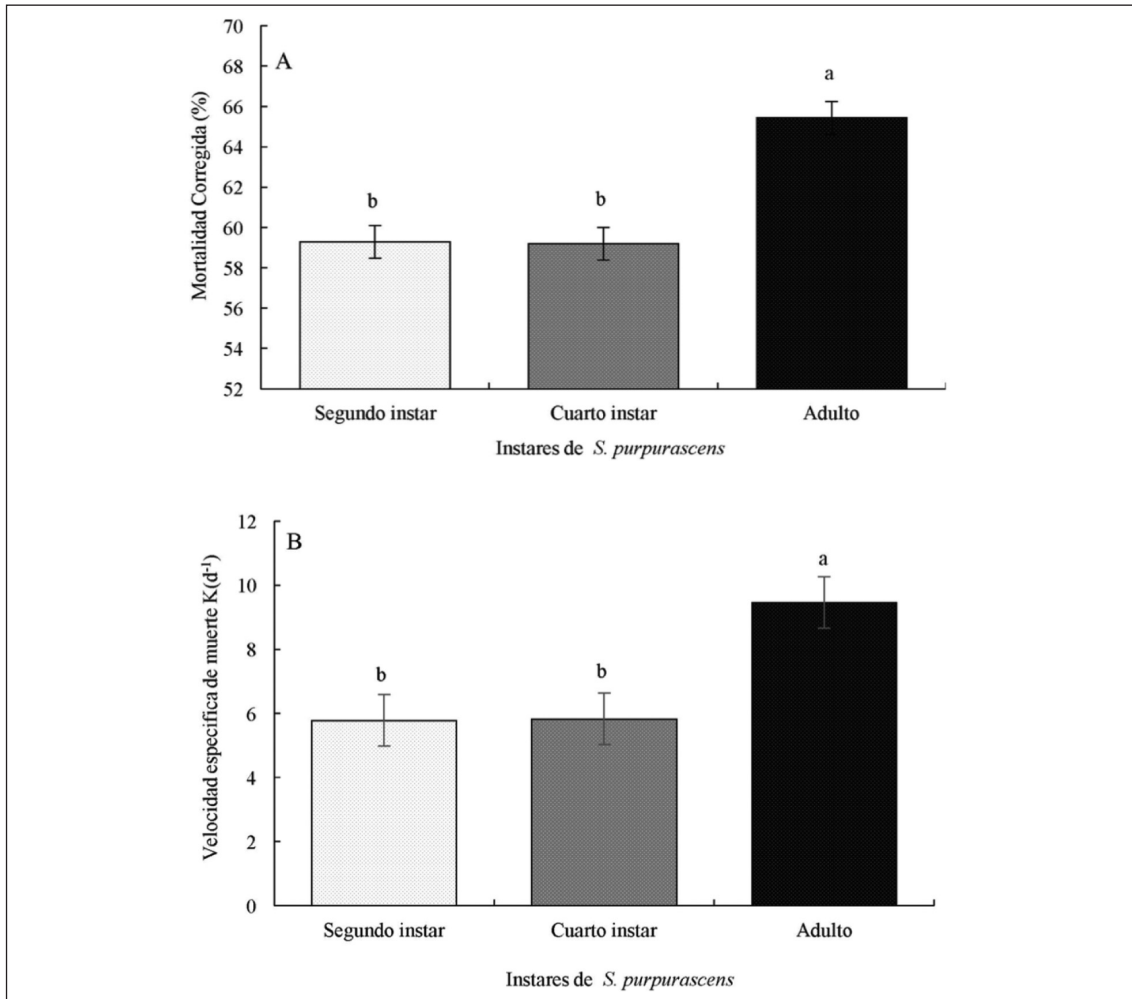


Figura 3. A) Porcentaje de mortalidad y B) velocidad específica de muerte  $K$  ( $d^{-1}$ ) de los diferentes estadios de *S. purpurascens* de acuerdo al modelo cuadrático de superficie de respuesta altamente significativo. Medias con letras diferentes indican diferencias significativas con la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).  
 Figure 3. A) Percentage of mortality and B) specific speed of death  $K$  ( $d^{-1}$ ) of the different stages of *S. purpurascens* according to the quadratic model of highly significant response surface. Averages with different letters indicate significant differences with the Tukey test ( $P < 0.05$ ).

La sinergia entre tierra de diatomitas y otros insecticidas naturales, con diferentes modos de acción, mejora en gran medida la efectividad de su mezcla, causando mayor desecación por otras sustancias y, reduciendo los tiempos o las aplicaciones requeridas (Almasi et al., 2013).

Para englobar y analizar todas las variables utilizadas, se realizó un análisis de correlación con el método de componentes principales (ACP). El método de componentes principales tiene por objeto transformar un conjunto de variables, a las que se denomina originales, en un nuevo conjunto de variables

Tabla 5. ANOVA del modelo cuadrático de superficie de respuesta la velocidad específica de muerte  $K$  ( $d^{-1}$ ) de *S. purpurascens*.

Table 5. ANOVA of the quadratic response surface model the specific speed of death  $K$  ( $d^{-1}$ ) of *S. purpurascens*.

Variable dependiente: velocidad específica de muerte $K$ ( $d^{-1}$ )					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo	8815,237	71	124,158	17244,203	<0,006
Intercepto	3704,688	1	3704,688	514540,033	<0,001
Bioensayos (1, 2, 3 y 4)	0,359	3	0,120	16,630	0,178
Tratamientos (control, Bb1, Z+D, Z+Bb1, D+Bb1 y Z+D+Bb1)	7858,059	5	1571,612	218279,406	<0,002
Instares (2º, 4º y adulto)	264,387	2	132,194	18360,219	<0,005
Ensayos × Tratamientos	0,810	15	0,054	7,500	0,280
Ensayos × Instares	1,223	6	0,204	28,299	0,143
Tratamientos × Instares	673,844	10	67,384	9358,951	<0,008
Ensayos × Tratamientos × Instares	1,633	30	0,054	7,559	0,281
Error	0,007	1	0,007		
Total	12449,310	73			
Total corregido	8815,244	72			
$R^2$	0,721				
Cuadrado $R^2$	0,449				
Cuadrado ajustado $R^2$	0,520				

denominadas componentes principales. Estas últimas se caracterizan por estar correlacionadas entre sí. Es decir, este método es utilizado para reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos hallando las causas de variabilidad del conjunto y ordenándolos por importancia, de acuerdo a la varianza.

El análisis indicó que el 95,8 % de la variabilidad (Tabla 6) se puede atribuir a dos componentes: CP1 (69,1 %) y CP2 (26,8 %), donde se muestra a los grupos de variables que denotan alta correlación positiva entre ellas,

como son: porcentaje de viabilidad de conidios, combinación de los bio-preparados y la cepa nativa de *B. bassiana* entre el  $K$  ( $d^{-1}$ ) y el %MC de los diferentes estadios de *S. purpurascens* (2º y 4º instar, adulto), además, CP1 se correlacionó negativamente con la  $T_{50}$  y  $T_{80}$  por los bio-preparados con una viabilidad de conidios baja y media, que va desde 53,3 % a 49,1 % que se presentaron en los bio-preparados, D+Bb1 y Bb1, respectivamente, así como el bio-preparado Z+D, donde la combinación del bio-preparado Z+D+Bb1 presentó la mayor mortalidad. El

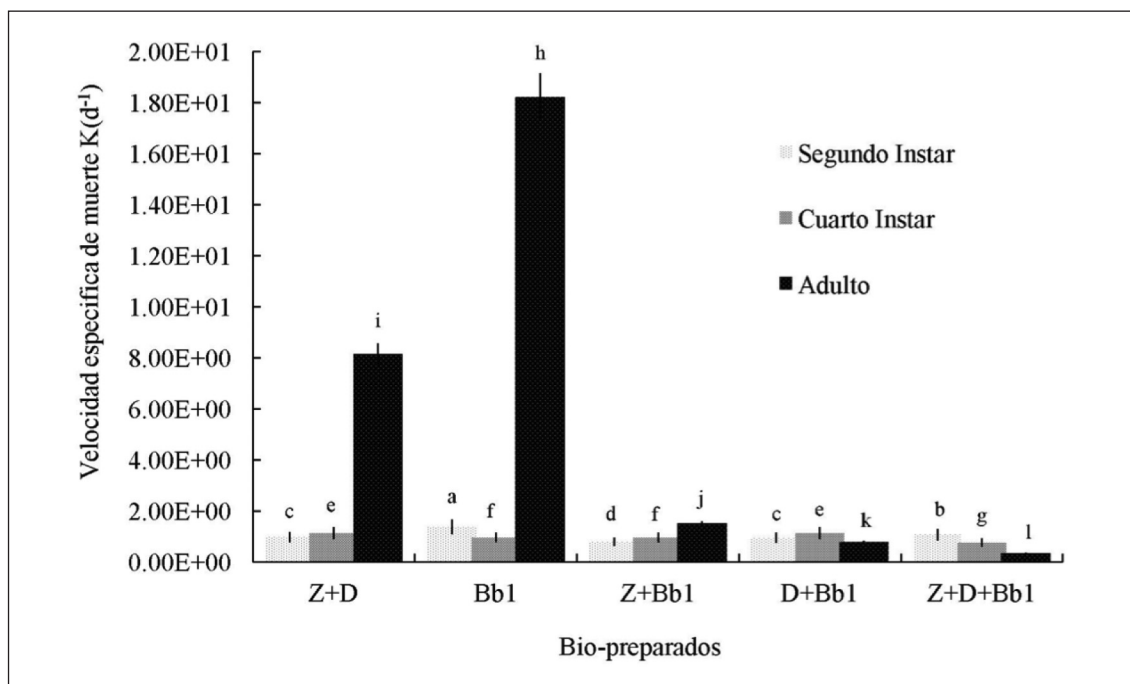


Figura 4. Promedio de velocidad específica de muerte  $K(d^{-1})$  de los diferentes estadios de *S. purpurascens* tras la exposición a diferentes bio-preparados a base de *B. bassiana* (Bb1), diatomita y zeolita. Z = zeolita, D = tierra de diatomitas. \*Medias con letras diferentes indican diferencias significativas con la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ), a-d = segundo instar; e-g = cuarto instar; h-l = adulto.

Figure 4. Average specific speed of death  $K(d^{-1})$  of the different stages of *S. purpurascens* after exposure to different bio-preparations based on *B. bassiana* (Bb1), diatomite and zeolite. Z = zeolite, D = diatomaceous earth. \*Averages with different letters indicate significant differences with the Tukey test ( $P < 0.05$ ), a-d = second instar; e-g = fourth instar; h-l = adult.

PC2 se correlacionó negativamente con el porcentaje de viabilidad de conidios en el %MC en los diferentes bio-preparados a una concentración de  $1 \times 10^8$  con  $mL^{-1}$ .

Se presentó una fuerte correlación positiva con las variables  $TL_{50}$  y  $TL_{80}$  evaluadas y la combinación de los bio-preparados Z+D+Bb1 y D+Bb1, alcanzando el  $TL_{50}$  a los tres días después de la inoculación, afectando al segundo y cuarto instar (Figura 2A-B), en el caso de los adultos de *S. purpurascens* fueron afectados hasta el quinto día después de la inoculación *in vitro* (Figura 2C); el menor  $TL_{50}$  se presentó en el tratamiento Z+D con 9

y 10 días, alcanzando el 100 % de mortalidad a los 15 días después de la inoculación para el segundo y cuarto instar respectivamente. Los aislamientos de hongos entomopatógenos con  $TL_{50}$  mayores de 14 días se consideran no patogénicos (Samuels *et al.*, 1989) por tal razón, en este estudio, los  $TL_{50}$  y  $TL_{80}$  obtenidas en los bio-preparados Z+D+Bb1 y D+Bb1, evaluados sobre los diferentes instares del chapulín, deben ser consideradas favorables para el control de este insecto.

Las evaluaciones en laboratorio son importantes, aunque no siempre reflejan los niveles de infección que ocurren en condiciones

Tabla 6. Análisis de componentes principales de la variable mortalidad corregida (%), correlacionadas con *S. purpurascens* bajo diferentes bio-preparados.

Table 6. Principal component analysis of the corrected mortality variable (%), correlated with *S. purpurascens* under different bio-preparations.

Características	Componente	
	PC1	PC2
% Viabilidad	0,295	-0,136
T <sub>50</sub>	-0,170	0,435
T <sub>80</sub>	-0,041	0,361
K (d <sup>-1</sup> )	0,020	0,302
%MC	0,243	-0,006
Bio-preparados	0,263	-0,063
Valores propios	4,830	1,878
% Varianza extraída	69,005	26,826

T<sub>50</sub> = Mortalidad del 50% + 1; T<sub>80</sub> = mortalidad del 80% + 1; K (d<sup>-1</sup>) = tiempo de afectación del 50% de la población bajo estudio; %MC = mortalidad corregida.

naturales (Fuentes-Contreras et al., 1998) y es necesario comprobar los resultados obtenidos en condiciones de campo. Sin embargo los resultados son prometedores, ya que varios ensayos de campo han evaluado la eficacia de *B. bassiana* contra saltamontes en África y América del Norte, donde aplicaron diferentes formulaciones como soporte a diferentes concentraciones de conidios de *B. bassiana*, dando como resultado la disminución de poblaciones entre 8 a 14 días, con altos porcentajes de mortalidad del insecto (Douglas et al., 1997).

### Conclusiones

Se obtuvo un producto de ampliación por PCR de 610 pares de bases de la región ITS ribosomal de la cepa MA-Bb1, cuya secuencia permitió ser identificada como *B. bassiana* con una homología del 100 % con respecto

a secuencias similares depositadas en base de datos públicas.

Los diferentes bio-preparados mostraron una tendencia lineal respecto a la mortalidad del 2º, 4º instar, así como a los adultos de *S. purpurascens in vitro*, donde el mayor porcentaje de mortalidad fue el bio-preparado Z+D+Bb1 a una concentración de  $1 \times 10^8$  con mL<sup>-1</sup> con una viabilidad del 89,1 %. La mayor velocidad específica de muerte del ortóptero *S. purpurascens* K (d<sup>-1</sup>) fue de 0,7 y la presentó de nuevo el bio-preparado (Z+D+Bb1) a las 72 horas post-infección, en comparación al preparado (Z+D), que fue el resultado más bajo en la velocidad específica de muerte obtenido en la presente investigación. No obstante, tras 15 días, todos los bio-preparados empleados llevaron a una mortalidad del 100 % excluyendo Z+D en adultos que fue cercano al 80 %.

Estos resultados demuestran la factibilidad del uso de la cepa nativa MA-Bb1 de *B. bas-*

*siana* en condiciones de laboratorio con alta viabilidad de conidios en combinación con materiales porosos, como la diatomita (D) y zeolita (Z) para el biocontrol de *S. purpurascens*.

Para futuros usos en campo será necesario realizar más ensayos con el fin de observar el comportamiento de *B. bassiana* en condiciones naturales no controladas.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al CONACyT por el respaldo financiero al proyecto "CVU: 775050", así mismo, al CONCyTEP por el financiamiento de beca tesis 2020.

### Referencias bibliográficas

- Abbott WS (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticides. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Adatia A, Johnson D, Entz S (2010). Pathogenicity of two new isolates of *Metarhizium anisopliae* from Canadian soil to *Melanoplus bivittatus* (Orthoptera: Acrididae) and *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *The Canadian Entomologist* 142: 128-134. <https://doi.org/10.4039/n09-041>
- Almasi R, Posloncec D, Korunic Z (2013). Possible new insecticides in the protection of stored wheat. *Bulgarian Journal of Agricultural Sciences* 19(5): 1076-1084.
- Andrić GG, Marković MM, Adamović M, Daković A, Golić MP, Kljajić PJ (2012). Insecticidal potential of natural zeolite and diatomaceous earth formulations against rice weevil (Coleoptera: Curculionidae) and red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology* 105(2): 670-678. <https://doi.org/10.1603/EC11243>
- AOAC (2006). Official methods of analysis, 18th ed. Association of Analytical Chemist, Washington, DC, USA.
- Arthur FH (2004). Evaluation of methoprene alone and in combination with diatomaceous earth to control *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) on stored wheat. *Journal of Stored Products Research* 40: 485-498. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(03\)00060-2](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(03)00060-2)
- Athanassiou CG, Korunic Z (2007). Evaluation of two new diatomaceous earth formulations, enhanced with abamectin and bitterbatkomycin, against four stored-grain beetle species. *Journal of Stored Products Research* 43(4): 468-473. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2006.12.008>
- Bhattacharyya A, Bhaumik Z, Usha-Rani P, Mandal S, Epiidi TT (2010). Nano-particles - A recent approach to insect pest control. *African Journal of Biotechnology* 9(24): 3489-3493.
- Bustillos-Rodríguez JC, Rios-Velasco C, Berlanga-Reyes DI, Acosta-Muñiz CH, Ruiz-Cisneros MF, Salas-Mariana MA (2015). Reporte preliminar de identificación molecular de *Beauveria* spp. y *Metarhizium* spp. Patogénicos al chapulín gordinflón *Brachystola magna Girard* (Orthoptera: Romaleidae) en Chihuahua, México. *Entomología Mexicana* 2: 247-252.
- Cerritos R, Cano-Santana Z (2007). Harvesting grasshoppers *Sphenarium purpurascens* in Mexico for human consumption: A comparison with insecticidal control for managing pest outbreaks. *Crop Protection* 27: 473-480.
- Cook DA, Armitage D (2000). Efficacy of a diatomaceous earth against mite and insect populations in small bins of wheat under conditions of low temperature and high humidity. *Pest Management Science* 56: 591-596. [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200007\)56:7%3C591::AID-PS180%3E3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200007)56:7%3C591::AID-PS180%3E3.0.CO;2-L)
- Cruz LP, Gaitan A, Gongora C (2006). Exploiting the genetic diversity of *Beauveria bassiana* for improving the biological control of the coffee berry borer through the use of strain mixtures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 918-926. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0218-0>
- Cueva del Castillo R, Núñez-Farfán J, Cano-Santana Z (1999). The role of body size in mating success of *Sphenarium purpurascens* in Central



- Mexico. *Ecological Entomology* 24: 146-155. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.1999.00188.x>
- Curtis RA, Deem MW (2003). A Statistical mechanics study of ring size, ring shape, and the relation to pores found in zeolites. *Journal Physical Chemistry B* 107(33): 8612-8620. <https://doi.org/10.1021/jp027447+>
- Choe A, Chuman T, Von-Reuss SH, Dossey AT, Yim JJ, Ajredini R, Kolawa AA, Kaplan F, Alborn HT, Teal PE, Schroeder FC, Sternberg PW, Edison AS. (2012). Sex specific mating pheromones in the nematode *Panagrellus redivivus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(51): 20949-20954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218302109>
- Dal Bello G, Padín S, Juárez P, Pedrini N, De Giusto M (2006). Biocontrol of *Acanthoscelides obtectus* and *Sitophilus oryzae* with diatomaceous earth and *Beauveria bassiana* on stored grains. *Biocontrol Science and Technology* 16(1): 215-220. <https://doi.org/10.1080/09583150500336010>
- De Faria MR, Wraight SP (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control* 43(1): 237-256. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>
- De Smedt C, Someus E, Spanoghe P (2015). Potential and actual uses of zeolites in crop protection. *Pest Management Science* 71(10): 1355-1367. <https://doi.org/10.1002/ps.3999>
- Domsch KH, Gams W, Anderson TH (1993). *Compendium of soil fungi*. Institute of Soil Biology, Federal Agricultural Research Centre, 845 pp.
- Douglas DG, Johnson DL, Goettel M (1997). Effects of temperature and sunlight on mycosis (*Beauveria bassiana*) (Hyphomycetes: Symptodulosporae) of grasshoppers under field conditions. *Environmental Entomology* 26(2): 400-409. <https://doi.org/10.1093/ee/26.2.400>
- Finney DJ (1972). *Probit Analysis: A Statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve*. 7th Edition, Cambridge University Press, Cambridge, 33 pp.
- Fuentes-Contreras E, Pell J, Niemeyer H (1998). Influence of plant resistance and the third trophic level: interactions between parasitoids and entomopathogenic fungi of cereal aphids. *Oecologia* 117: 426-432. <https://doi.org/10.1007/s004420050677>
- Georghiou GP, Mellon R (1983). Pesticide resistance in time and space. En: *Pest Resistance to Pesticides* (Eds. Georghiou G.P. y Saito T.), pp. 1-46. Plenum Press, New York. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4684-4466-7\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4684-4466-7_1)
- Haryadi Y, Syarief R, Hubeis M, Herawati I (1994). Effect of zeolite on the development of *Sitophilus zeamais* Motsch. *Stored Products Protection; Proceedings of the Sixth International Working Conference on Stored-product Protection*, 17-23 April 1994, Canberra, Australia, pp. 633-634.
- Ho SM, Seon YJ, Sihyeon K, Jin LS, Cheol KJ, Shin NY, Young ST, Su KJ (2019). Downstream processing of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* based fungal biopesticides against *Riptortus pedestris*: solid culture and delivery of conidia. *Biocontrol Science and Technology* 29(6): 514-532. <https://doi.org/10.1080/09583157.2019.1566951>
- Huerta AJ, Espinoza F, Téllez-Jurado A, Maqueda-Gálvez AP, Arana-Cuenca A (2014). Control biológico del chapulín en México. *Bio-Tecnología* 18: 28-49.
- Johnson DJ, Goettel MS (1993). Reduction of grasshopper populations following field application of the fungus *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology* 3(2): 165-175. <https://doi.org/10.1080/09583159309355273>
- Kevan DK (1977). The American Pyrgomorphidae. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*. 36: 3-28.
- Kljajić P, Andrić G, Adamović M, Prazić-Golić M (2011). Possibilities of application of natural zeolites in stored wheat grain protection against pest insects. *Journal on Processing and Energy in Agriculture* 15(1): 12-16.
- Korunic Z (1997). Rapid assessment of the insecticidal value of diatomaceous earths without conducting bioassays. *Journal of Stored Products Research* 33: 219-229. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(97\)00004-0](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(97)00004-0)

- Korunic Z (1998). Diatomaceous earths, a group of natural insecticides. *Journal of Stored Products Research* 34(3): 87-97. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(97\)00039-8](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(97)00039-8)
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016). MEGA7: Análisis de genética evolutiva molecular versión 7.0 para conjuntos de datos más grandes. *Biología molecular y evolución* 33: 1870-1874.
- Morales-Martínez N, Hernández-Hernández EM, Ramírez-Alarcón S, Solís-Aguilar J (2013). Abundancia de *Sphenarium purpurascens* Charpentier (Orthoptera: Pyrgomorphidae) en cultivos de importancia económica en la localidad de Tepepa, San Miguel Tenancingo, Tlaxcala. *Entomología Mexicana* 12(2): 1122-1127.
- Muro MA, Elliott S, Moore D, Parker LB, Skinner M, Reid W, Bouhssini M (2005). Molecular characterisation of *Beauveria bassiana* isolates obtained from overwintering sites of Sunn Pests (*Eurygaster* and *Aelia* species). *Mycological Research* 109: 294-306. <https://doi.org/10.1017/S0953756204001832>
- Nava-Galicia SB, Pérez-Torres BC (2016). Control de *Sphenarium purpurascens* con *Beauveria bassiana* y extractos vegetales en amaranto (*Amaranthus hypocondriacus* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(2): 235-247.
- NCBI (2020). Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (Consultado: 28 de julio de 2020).
- Pedrini N, Crespo R, Juárez M (2007). Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Pharmacol* 146: 124-137.
- Rouhani M, Samih MA, Kalantari S (2012). Insecticidal effect of silica and silver nanoparticles on the cowpea seed beetle *Callosobruchus maculatus* F. (Col.: Bruchidae). *Journal of Entomological Research* 4(4): 297-305.
- Samuels KDZ, Heale JB, Llewellyn M (1989). Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *Journal of Invertebrate Pathology* 53: 25-31. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(89\)90070-0](https://doi.org/10.1016/0022-2011(89)90070-0)
- Sanborn M, Kerr KJ, Sanin LH, Cole DC, Bassil KL, Vakil C (2007). Non-cancer health effects of pesticides: Systematic review and implications for family doctors. *Canadian Family Physician* 53(10): 1712-1720
- Shah FA, Wang C, Butt T (2005). Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letter* 251: 259-266. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.010>
- Speight MR, Hunter MD, Watt AD (1999). Insect Pest Management. En: *Ecology of Insects: Concepts and Applications*, 2nd Edition, Wiley-Blackwell, pp. 640.
- Vázquez-Jorge MA, Aragón-García A, Bibbins-Martínez MD, Castillo-Hernández DC, Nava-Galicia SB, Pérez-Torres BC (2016). Control de *Sphenarium purpurascens* con *Beauveria bassiana* y extractos vegetales en amaranto (*Amaranthus hypocondriacus* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(2): 235-247.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR protocols: a guide to methods and applications*. (Ed. Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T.), pp. 315-322. San Diego: Academic Press.

(Aceptado para publicación el 7 de septiembre de 2020)