

Insectistatic and insecticide activity of *Beauveria bassiana* in *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae)

Actividad insecticida e insectistática de *Beauveria bassiana* en *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae)

Víctor H. Marín-Cruz^{1*}; Silvia Rodríguez-Navarro²; Juan E. Barranco-Florido³; David Cibrián-Tovar⁴

¹Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Doctorado en Ciencias Agropecuarias. Calzada del Hueso 1100, col. Villa Quietud. C. P. 04960. Coyoacán, Cd. de México, México.

²Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Departamento de Producción Agrícola y Animal. Calzada del Hueso 1100, col. Villa Quietud. C. P. 04960. Coyoacán, Cd. de México, México.

³Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Departamento de Sistemas Biológicos. Calzada del Hueso 1100, col. Villa Quietud. C. P. 04960. Coyoacán, Cd. de México, México.

⁴Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. km 38.5 Carretera México-Texcoco. C. P. 56230. Chapingo, Texcoco, Estado de México, México.

*Corresponding author: victormarin@hotmail.es, tel.: 52+ (55) 39 70 93 59

Abstract

Introduction: *Bradysia impatiens* causes significant losses in nurseries and greenhouses in Mexico.

Objective: The insecticidal and insectistatic effect of *Beauveria bassiana* was evaluated on *B. impatiens*.

Materials and methods: The insecticidal and insectistatic effect of conidia (10^7 conidia·mL⁻¹), enzymes (10 000 ppm), metabolites (10 000 ppm) and crude extract of *B. bassiana* were evaluated at 8 and 20 days. Corrected mortality data of larvae and pupae of *B. impatiens* and relative emergence of adults, transformed with the arcsine function, in an analysis of variance and comparison of Tukey's means ($P < 0.05$).

Results and discussion: At day 8, conidia had the highest insecticidal activity with 31.1 % of corrected mortality, and zero enzymes activity. At 20 days, treatments of metabolites and conidia had the greatest effect on mortality, 47.5 and 42.1 %, respectively. These treatments had the highest insectistatic activity. The emergence of adults at 20 days was lower with conidia (6 %), while with the enzymes it was 100 %. Metabolites caused that 65 % of adults had malformations.

Conclusions: Metabolites and conidia of *B. bassiana* could be used for the control of larvae and pupae of *B. impatiens*.

Keywords: entomopathogenic fungi, fungus gnats, conidia, enzymes, metabolites.

Resumen

Introducción: *Bradysia impatiens* causa pérdidas significativas en viveros e invernaderos de México.

Objetivo: El efecto insecticida e insectistático de *Beauveria bassiana* se evaluó sobre *B. impatiens*.

Materiales y métodos: El efecto insecticida e insectistático de conidios (10^7 conidios·mL⁻¹), enzimas (10 000 ppm), metabolitos (10 000 ppm) y extracto crudo de *B. bassiana* se evaluó a los 8 y 20 días. Los datos de mortalidad corregida de larvas y pupas de *B. impatiens* y emergencia relativa de adultos, transformados con la función arcoseno, se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$).

Resultados y discusión: En el día 8, los conidios tuvieron la mayor actividad insecticida con 31.1 % de mortalidad corregida, mientras que la actividad de las enzimas fue nula. A los 20 días, los tratamientos de metabolitos y conidios tuvieron el mayor efecto en la mortalidad, 47.5 y 42.1 %, respectivamente. Dichos tratamientos tuvieron la mayor actividad insectistática. La emergencia de adultos a los 20 días fue menor con los conidios (6 %), mientras que con las enzimas fue de 100 %. Los metabolitos provocaron que 65 % de los adultos mostraran malformaciones.

Conclusión: Los metabolitos y conidios de *B. bassiana* podrían emplearse para el control de larvas y pupas de *B. impatiens*.

Palabras clave: hongos entomopatógenos, mosquito fungoso, conidios, enzimas, metabolitos.

Introduction

In Mexico, the *Bradysia impatiens* Johannsen (Diptera: Sciaridae) fungus gnats is considered a pest with forest and agricultural importance for nurseries and greenhouses in the center of the country, especially for the production of seedlings (Cibrián, García, & Don Juan, 2008; Marín-Cruz, Cibrián-Tovar, Méndez-Montiel, Pérez-Vera, & Cadena-Meneses, 2015a). *Bradysia impatiens* larvae feed on decaying organic matter, fungi and roots (Mohrig & Menzel, 2009). The root, being damaged, is exposed to the entry of pathogenic fungi, and larvae may carry spores of them (Shamshad, Clift, & Mansfield, 2009).

It has been reported that *B. impatiens* damages roots and bulbs, mainly in greenhouses and nurseries, ornamental, from vegetables and in gardens (Marín-Cruz et al., 2015a). The control is carried out by means of organosynthetic insecticides, growth regulators and biopesticides; however, some populations of *B. impatiens* are resistant to chemical treatments (Marín-Cruz et al., 2015a). An alternative is the use of entomopathogenic fungi (EF), which are found in the environment and have potential as insect controllers, causing fungal infections in arthropods (Motta-Delgado & Murcia-Ordoñez, 2011).

Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) is an EF with cosmopolitan distribution that attacks different orders of insects (Lozano-Tovar, Ortiz-Urquiza, Garrido-Jurado, Trapero-Casa, & Quesada-Moraga, 2013; Zibae, Bandani, Talaei-Hassanlouei, & Malagoli, 2011). The fungus infects insects from the order Diptera and has effective control of *Musca domestica* Linnaeus (Muscidae), *Ceratitis capitata* Wiedemann (Tephritidae) and *Aedes aegypti* Linnaeus (Culicidae) (Acharya, Seliga, Rojotte, Jenkins, & Matthew, 2015; Lozano-Tovar et al., 2013).

The fungus *B. bassiana* produces secondary metabolites that have insecticidal properties and important applications in biotechnology (Sánchez-Pérez, Barranco-Florido, Rodríguez-Navarro, Cervantes-Mayagoitia, & Ramos-López, 2014), including bassianolides, bassiacriin, bassianin, beauvericin, beauverolides and tenellin (Quesada-Moraga & Vey, 2004). Bassianolide affects populations of Lepidoptera such as *Galleria mellonella* Linnaeus (Pyralidae), *Helicoverpa zea* Boddie (Noctuidae) and *Spodoptera exigua* Hübner (Noctuidae) (Xu et al., 2009). The bassiacridin injected into *Locusta migratoria* Linnaeus (Orthoptera: Acrididae) causes alterations in the epithelial cells of the trachea and displacement of the integument (Quesada-Moraga & Vey, 2004). Secondary metabolites of *B. bassiana* disrupt the mechanisms of the insect's immune system, allowing the fungus to invade and kill its host (Zibae et al., 2011).

Introducción

En México, el mosco fungoso *Bradysia impatiens* Johannsen (Diptera: Sciaridae) se considera una plaga de importancia forestal y agrícola en viveros e invernaderos del centro del país, sobre todo en la producción de plántulas (Cibrián, García, & Don Juan, 2008; Marín-Cruz, Cibrián-Tovar, Méndez-Montiel, Pérez-Vera, & Cadena-Meneses, 2015a). Las larvas de *B. impatiens* se alimentan de materia orgánica en descomposición, hongos y raíces (Mohrig & Menzel, 2009). La raíz, al ser dañada, queda expuesta a la entrada de hongos patógenos, y las larvas pueden llevar esporas de los mismos (Shamshad, Clift, & Mansfield, 2009).

Se ha reportado que *B. impatiens* daña raíces y bulbos, principalmente en invernaderos y viveros forestales, ornamentales, de hortalizas y en jardines (Marín-Cruz et al., 2015a). El control se hace por medio de insecticidas organosintéticos, reguladores de crecimiento y bioplaguicidas; sin embargo, algunas poblaciones de *B. impatiens* son resistentes a los tratamientos químicos (Marín-Cruz et al., 2015a). Una alternativa es el uso de hongos entomopatógenos (HE), los cuales se encuentran en el medio ambiente y tienen potencial como controladores de insectos, provocando infecciones fúngicas en artrópodos (Motta-Delgado & Murcia-Ordoñez, 2011).

Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) es un HE de distribución cosmopolita que ataca diversas órdenes de insectos (Lozano-Tovar, Ortiz-Urquiza, Garrido-Jurado, Trapero-Casa, & Quesada-Moraga, 2013; Zibae, Bandani, Talaei-Hassanlouei, & Malagoli, 2011). El hongo infecta insectos del orden Diptera y controla *Musca domestica* Linnaeus (Muscidae), *Ceratitis capitata* Wiedemann (Tephritidae) y *Aedes aegypti* Linnaeus (Culicidae) de manera efectiva (Acharya, Seliga, Rojotte, Jenkins, & Matthew, 2015; Lozano-Tovar et al., 2013).

El hongo *B. bassiana* produce metabolitos secundarios que tienen propiedades insecticidas e importantes aplicaciones en la biotecnología (Sánchez-Pérez, Barranco-Florido, Rodríguez-Navarro, Cervantes-Mayagoitia, & Ramos-López, 2014), entre los que se encuentran bassianólidos, bassiacridin, bassianina, beauvericina, beauverolidos y tenellin (Quesada-Moraga & Vey, 2004). El bassianólido afecta poblaciones de lepidópteros como *Galleria mellonella* Linnaeus (Pyralidae), *Helicoverpa zea* Boddie (Noctuidae) y *Spodoptera exigua* Hübner (Noctuidae) (Xu et al., 2009). La bassiacridina inyectada en *Locusta migratoria* Linnaeus (Orthoptera: Acrididae) causa alteraciones en las células epiteliales de la tráquea y desplazamiento del integumento (Quesada-Moraga & Vey, 2004). Los metabolitos secundarios de *B. bassiana* inhabilitan los mecanismos del sistema inmune del insecto,

The present study evaluated the insecticidal and insectistatic potential of strain 11 *B. bassiana* using conidia, crude extract (CE) and lyophilized (enzymes and metabolites) in third instar larvae of *B. impatiens*.

Materials and methods

Biological material

Collection and breeding of *B. impatiens* insects

In the forest nursery of Temamatla, Estado de México, larvae and adult *B. impatiens* were collected from 200 seedlings of *Pinus montezumae* (Lamb) (Pinales: Pinaceae) during November 2014. *B. impatiens* adults were collected using a bee vacuum pump and larvae were collected with a brush directly from the root and growth substrate of the pine.

The insects collected were taken to the insectarium laboratory of the Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (UAM-X), and were maintained under photoperiod conditions at 12:12 h, relative humidity (RH) of 75 %, temperature 23 ± 2 °C, with 2 g of potato slices as food (Marín-Cruz et al., 2015b).

Activation of *B. bassiana*

Strain 11 *B. bassiana* from the biotechnology laboratory of UAM-X was grown on Dextrose-Saboraud agar for 15 days at 25 °C. Conidia were harvested with 0.05 % of Tween 80 by means of gentle scraping and were counted with a hemocytometer; the concentration was adjusted to 10^7 conidia·mL⁻¹ (Barranco et al., 2009).

Conidia and crude enzymatic extract of *B. bassiana*

A solid state medium consisting of shrimp shell, sugar cane bagasse, mineral salts (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, NaCl, KH₂PO₄, FeSO₄·7H₂O, ZnSO₄ and MnSO₄ was prepared using Erlenmeyer flasks (Barranco et al., 2009). *B. bassiana* EF was inoculated at a concentration of 10^7 conidia·mL⁻¹. Growing conditions were pH 5.0 and 25 °C (Barranco-Florido, Alatorre-Rosas, Gutiérrez-Rojas, Viniestra-González, & Saucedo-Castañeda, 2002). Conidia were harvested at 15 days using 0.05 % of Tween 80 1:10 (v/v), the count was carried out using a hemocytometer and the concentration was adjusted to 10^7 conidia·mL⁻¹. The enzymatic crude extract was obtained at 5 days with distilled water in a ratio of 1:1 (v/v) (Barranco-Florido et al., 2002).

Semipurification of crude enzymatic extract

The crude extract was centrifuged at 10 000 rpm for 10 min (Sorvall® model RC-5B, USA). Subsequently a second centrifugation was carried out to separate the

permitiendo que el hongo se establezca y mate a su hospedero (Zibae et al., 2011).

El presente trabajo evaluó el potencial insecticida e insectistático de *B. bassiana* cepa 11, usando conidios, extracto crudo (EC) y liofilizados (enzimas y metabolitos) en larvas de tercer estadio de *B. impatiens*.

Materiales y métodos

Material biológico

Recolecta y cría de insectos de *B. impatiens*

En el vivero forestal de Temamatla, Estado de México, se recolectaron larvas y adultos de *B. impatiens* en 200 plántulas de *Pinus montezumae* (Lamb) (Pinales: Pinaceae), durante noviembre de 2014. Los adultos de *B. impatiens* se capturaron con un aspirador manual y las larvas se recolectaron con un pincel directamente de la raíz y del sustrato de crecimiento del pino.

Los insectos recolectados se establecieron en una cría en el laboratorio del insectario de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (UAM-X), y se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo 12:12 h, humedad relativa (HR) de 75 %, temperatura 23 ± 2 °C, con 2 g de rodajas de papa como alimento (Marín-Cruz et al., 2015b).

Activación de *B. bassiana*

La cepa 11 de *B. bassiana*, del cepario del laboratorio de Biotecnología de la UAM-X, se cultivó en agar Dextrosa-Saboraud durante 15 días a 25 °C. Los conidios se cosecharon con Tween 80 al 0.05 %, por medio de un raspado suave y se contaron con un hemocitómetro; la concentración se ajustó a 10^7 conidios·mL⁻¹ (Barranco et al., 2009).

Obtención de conidios y extracto enzimático crudo de *B. bassiana*

En matraces Erlenmeyer se preparó un medio de cultivo sólido que consistió en caparazón de camarón, bagazo de caña, sales minerales (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, NaCl, KH₂PO₄, FeSO₄·7H₂O, ZnSO₄ y MnSO₄ (Barranco et al., 2009). El HE *B. bassiana* se inoculó a una concentración de 10^7 conidios·mL⁻¹. Las condiciones de cultivo fueron pH 5.0 y 25 °C (Barranco-Florido, Alatorre-Rosas, Gutiérrez-Rojas, Viniestra-González, & Saucedo-Castañeda, 2002). Los conidios se cosecharon a los 15 días con Tween 80 al 0.05 % 1:10 (v/v), el conteo se realizó con un hemocitómetro y la concentración se ajustó a 10^7 conidios·mL⁻¹. El extracto crudo enzimático se obtuvo a los cinco días con agua destilada en proporción 1:1 (v/v) (Barranco-Florido et al., 2002).

molecular size from the supernatant (BECKMAN®, GPR model, USA) using 10 kDa Centricon tubes (BioRad®, Ireland) at 3 000 rpm for 30 min (Ali, Ren, Huang, & Wu, 2010). The upper extract, greater than 10 kDa, corresponds to the enzymes; and the lower, less than 10 kDa, to metabolites. For application in the treatments, metabolites and enzymes were lyophilized (Labconco®, model 7753022, USA) and resuspended in distilled water at a dose of 10 000 ppm.

Bioassay of insecticidal and insectistatic activity of *B. bassiana*

Products from the purification of enzymatic extract and conidia of *B. bassiana* were evaluated in third instar *B. impatiens* larvae, deposited in transparent plastic boxes (1.5 cm diameter) with cover, to avoid dehydration; a piece of 1 x 1 cm adsorbent paper containing the treatments was placed in each box. The larvae were fed with 20 µg of potato flour, used for the consumption of treatments (Table 1). The dose was a single application of 130 µL of each treatment and distilled water was applied to the control treatment. As for the conditions, a temperature of 23 ± 3 °C was maintained and RH of 60 to 70 %. A total of 20 µL of distilled water was added to the plastic boxes every 72 h to conserve moisture, with checks every 24 hours. The experimental design was completely randomized with five replications per treatment; each replication consisted of 10 larvae, using 50 larvae in total per treatment.

Evaluated variables

Insecticidal activity (mortality) of *B. bassiana*

The number of dead larvae and pupae was recorded every 24 h for eight days; with these data mortality

Semipurificación del extracto crudo enzimático

El extracto crudo se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min (Sorvall® modelo RC-5B, EUA). Posteriormente se hizo una segunda centrifugación para la separación por tamaño molecular del sobrenadante (BECKMAN®, modelo GPR, EUA), utilizando tubos Centricon (BioRad®, Irlanda) de 10 kDa a 3 000 rpm durante 30 min (Ali, Ren, Huang, & Wu, 2010). El extracto superior, mayor de 10 kDa, corresponde a las enzimas; y el inferior, menor de 10 kDa, a los metabolitos. Para su aplicación en los tratamientos, las enzimas y metabolitos liofilizados (Labconco®, modelo 7753022, EUA) se resuspendieron en agua destilada en una dosis de 10 000 ppm.

Bioensayo de actividad insecticida e insectistática de *B. bassiana*

Los productos de la purificación del extracto enzimático y conidios de *B. bassiana* se evaluaron en larvas de *B. impatiens* de tercer estadio, depositadas en cajas de plástico transparentes (1.5 cm de diámetro) con tapa, para evitar la deshidratación; en cada caja se colocó un trozo de papel adsorbente de 1 x 1 cm que contenía los tratamientos. Las larvas se alimentaron con 20 µg de harina de papa, utilizada como conducto para el consumo de los tratamientos (Cuadro 1). La dosis fue una sola aplicación de 130 µL de cada tratamiento y al testigo se le aplicó agua destilada. En cuanto a las condiciones, se mantuvo una temperatura de 23 ± 3 °C y HR de 60 a 70 %. En las cajas de plástico se agregaron 20 µL de agua destilada cada 72 h para conservar la humedad, con revisiones cada 24 h. El diseño experimental fue completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento; cada repetición consistió en 10 larvas, utilizando 50 larvas en total por tratamiento.

Table 1. Treatments and doses of *Beauveria bassiana* applied to larvae of *Bradysia impatiens* to determine the insecticidal and insectistatic activity of the fungus.

Cuadro 1. Tratamientos y dosis de *Beauveria bassiana* aplicados a larvas de *Bradysia impatiens* para determinar la actividad insecticida e insectistática del hongo.

Treatment / Tratamiento	Dose on adsorbent paper (µL) / Dosis en papel adsorbente (µL)	Dose in food (µg·µL ⁻¹) / Dosis en alimento (µg·µL ⁻¹)
Conidia (10 ⁷ conidia·mL ⁻¹) / Conidios (10 ⁷ conidios·mL ⁻¹)	130	5.7
Crude extract / Extracto crudo	130	5.7
Enzymes (10 000 ppm) / Enzimas (10 000 ppm)	130	5.7
Metabolites (10 000 ppm) / Metabolitos (10 000 ppm)	130	5.7
Control / Testigo	130	5.7

corrected by means of the Abbott equation (1925) was calculated to eliminate the natural mortality obtained in the control:

$$CM = \frac{Mtr - Mte}{100 - Mte} * 100$$

where:

CM = corrected mortality (%)

Mtr = mortality in treatment (%)

Mte = mortality in control (%).

Insectistatic activity of *B. bassiana*

The criteria for defining insectistatic activity were: 1) duration of *B. impatiens* pupa, 2) relative emergence of adults from pupa, and 3) morphological alterations in larvae, pupae and adults. Revisions were made every 24 h for 20 days, and relative emergence was calculated using the following formula (Aguilera, 2001):

$$E = \frac{Etr}{Ete} * 100$$

where:

E = emergence (%)

Etr = emergence in treatment (%)

Ete = emergence in control (%).

Statistical analysis

The percentage of corrected mortality and relative emergence had a binomial distribution; to normalize them we used the formula of angular or arcsine transformation ($\arcsine \sqrt{\text{percentage}/100}$). The transformed data were subjected to an analysis of variance (ANOVA) and a Tukey mean comparison test ($P < 0.05$) was carried out using the program JMP version 8 (Statistical Analysis System, [SAS Institute Inc.], 2009).

Results and Discussion

Insecticidal activity of *B. bassiana*

Table 2 shows the results of corrected mortality of *B. impatiens* (larvae and pupae) ($F_{3,16} = 311.58, P < 0.001$). Figure 1 shows that conidia and crude extract treatments had an effect on the mortality rate after 48 h, while metabolites and enzymes showed effect until the sixth and eighth day, respectively.

According to the results, at eight days, mortality is less than 40 % in all treatments, therefore, insecticidal activity is considered reduced. The effect of treatments

Variabes evaluadas

Actividad insecticida (mortalidad) de *B. bassiana*

El número de larvas y pupas muertas se registró cada 24 h durante ocho días; con estos datos se calculó la mortalidad corregida mediante la ecuación de Abbott (1925), para eliminar la mortalidad natural obtenida en el testigo:

$$MC = \frac{Mtr - Mte}{100 - Mte} * 100$$

donde:

MC = mortalidad corregida (%)

Mtr = mortalidad en el tratamiento (%)

Mte = mortalidad en el testigo absoluto (%).

Actividad insectistática de *B. bassiana*

Los criterios para definir la actividad insectistática fueron: 1) duración del estado de pupa de *B. impatiens*, 2) emergencia relativa de adultos a partir de la pupa, y 3) alteraciones morfológicas en larvas, pupas y adultos. Las revisiones se hicieron cada 24 h durante 20 días, y la emergencia relativa se calculó utilizando la siguiente fórmula (Aguilera, 2001):

$$E = \frac{Etr}{Ete} * 100$$

donde:

E = emergencia (%)

Etr = emergencia en el tratamiento (%)

Ete = emergencia en el testigo absoluto (%).

Análisis estadístico

Los datos de porcentaje de mortalidad corregida y emergencia relativa tuvieron una distribución binomial; para normalizarlos se utilizó la fórmula de transformación angular o arcoseno ($\arccoseno \sqrt{\text{porcentaje}/100}$). Los datos transformados se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) y se hizo una prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$) con el programa JMP versión 8 (Statistical Analysis System, [SAS Institute Inc.], 2009).

Resultados y discusión

Actividad insecticida de *B. bassiana*

El Cuadro 2 muestra los resultados obtenidos de mortalidad corregida de *B. impatiens* (larvas y pupas) ($F_{3,16} = 311.58, P < 0.001$). En la Figura 1 se observa que los

at 20 days was statistically different ($F_{3,16} = 73.02, P < 0.001$). From day 8 to 20, metabolites significantly (31.95 units) increased mortality compared to conidia (10.99 units) (Table 2). Crude extract did not increase mortality in that period (Figure 1).

The insecticidal activity of *B. bassiana*, per contact, has been demonstrated in larvae of the orders Coleoptera and Lepidoptera (Ahmed & El-Katatny, 2007; Guzmán-Franco et al., 2012; Michelle et al., 2013). Also Acharya et al. (2015) evaluated the insecticidal activity of *B. bassiana* in adults of *M. domestica* (Diptera) and reported 100 % of mortality in a period of six to 10 days after application. There is few information regarding the ingestion of *B. bassiana* conidia by diptera larvae.

tratamientos conidios y extracto crudo tuvieron efecto en el porcentaje de mortalidad a partir de las 48 h, mientras que los metabolitos y las enzimas mostraron efecto hasta el sexto y octavo día, respectivamente.

De acuerdo con los resultados, a los ocho días, la mortalidad es menor de 40 % en todos los tratamientos, por tanto, la actividad insecticida se considera reducida. El efecto de los tratamientos a los 20 días fue estadísticamente diferente ($F_{3,16} = 73.02, P < 0.001$). Del día 8 al 20, los metabolitos incrementaron significativamente (31.95 unidades) la mortalidad en comparación con los conidios (10.99 unidades) (Cuadro 2). El extracto crudo no incrementó la mortalidad en ese periodo (Figura 1).

Table 2. Corrected and transformed mortality of larvae and pupae of *Bradysia impatiens*, evaluated at 8 and 20 days after the application of *Beauveria bassiana* treatments.

Cuadro 2. Mortalidad corregida y transformada de larvas y pupas de *Bradysia impatiens*, evaluada a los ocho y 20 días después de la aplicación de los tratamientos de *Beauveria bassiana*.

Period (days)/ Periodo (días)	Treatment/Tratamiento	Corrected mortality (%)/ Mortalidad corregida (%)	Arcsine transformation/ Transformación Arcoseno
8	Control/Testigo	0.0	0.0 ^d
	Metabolites/Metabolitos	15.5	23.22 ^c
	Enzymes/Enzimas	0.0	0.0 ^d
	Conidia/Conidios	31.1	33.90 ^a
	Crude extract/Extracto crudo	22.2	28.12 ^b
20	Control/Testigo	0.0	0.0 ^d
	Metabolites/Metabolitos	47.5	43.56 ^a
	Enzymes/Enzimas	4.4	12.16 ^c
	Conidia/Conidios	42.1	40.45 ^a
	Crude extract/Extracto crudo	22.2	28.12 ^b

Different letters in a same period indicate significant difference ($P < 0.05$) in the effect of treatments, according to the Tukey test (HSD, $n = 50$).

Letras diferentes en un mismo periodo indican diferencia significativa ($P < 0.05$) en el efecto de los tratamientos, de acuerdo con la prueba de Tukey (HSD, $n = 50$).

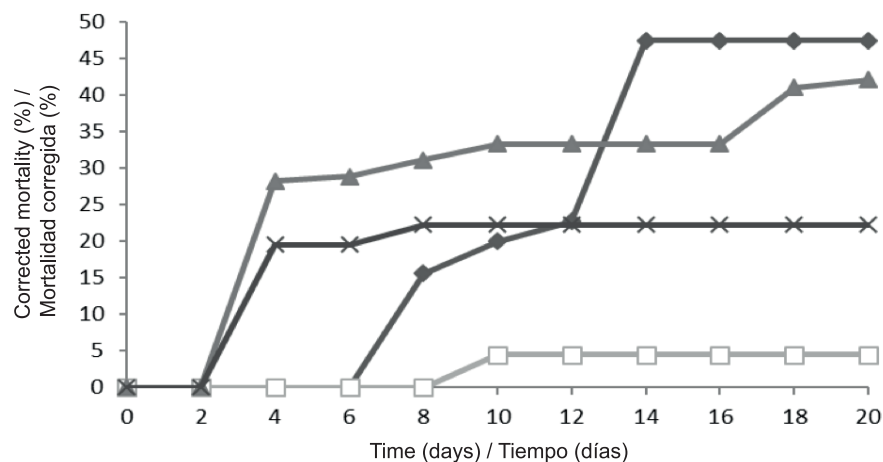


Figure 1. Mortality of larvae and pupae of *Bradysia impatiens*, after application of conidia (▲), crude extract (X), metabolites (◆) and enzymes (□) of *Beauveria bassiana*.

Figura 1. Mortalidad de larvas y pupas de *Bradysia impatiens*, después de la aplicación de conidios (▲), extracto crudo (X), metabolitos (◆) y enzimas (□) de *Beauveria bassiana*.

Insectistatic activity of *B. bassiana*

Metabolites did not cause mortality of *B. impatiens* larvae in the first six days, but produce mortality in the following days. This may be because toxicity was cumulative, due to feeding, causing death. It should be noted that after 14 days mortality ceases, but the effect of metabolites continues at physiological level interfering in the development of *B. impatiens*, which is denominated insectistatic effect.

The insectistatic effect is manifested in the inhibition of feeding, growth, development and oviposition of the insect (Rodríguez, 2003). In our study, low molecular weight metabolites had higher insectistatic effect than insecticidal activity. The insectistatic effect was demonstrated with the inhibition of the growth of larvae, causing their death.

Pupae of *B. impatiens*

Figure 2 shows the percentage of larvae that passed to the pupal stage in the different treatments, with significant difference among them ($F_{4,20} = 175.32$, $P < 0.001$). As effect of the insectistatic activity, mortality of the pupae in treatments was: control 12 % (5); Low molecular metabolites 44 % (16); Enzymes 8 % (6); Conidia 71 % (5) and CE 14 % (6). The number of dead pupae and malformed adults is evidence of inhibition of development as a result of insectistatic

La actividad insecticida de *B. bassiana*, por contacto, ha sido demostrada en larvas de las órdenes Coleoptera y Lepidoptera (Ahmed & El-Katatny, 2007; Guzmán-Franco et al., 2012; Michelle et al., 2013). También Acharya et al. (2015) evaluaron la actividad insecticida de *B. bassiana* en adultos de *M. domestica* (Diptera) y reportaron 100 % de mortalidad en un periodo de seis a 10 días después de la aplicación. Existe poca información respecto a la ingestión de conidios de *B. bassiana* por larvas de dípteros.

Actividad insectistática de *B. bassiana*

Los metabolitos no causaron mortalidad de larvas de *B. impatiens* en los primeros seis días, pero sí en los siguientes. Esto puede deberse a que la toxicidad fue acumulativa, debido a la alimentación, ocasionando posteriormente la muerte. Cabe destacar que después de los 14 días cesa la mortalidad, pero el efecto de los metabolitos continúa a nivel fisiológico interfiriendo en el desarrollo de *B. impatiens*, a lo que se le denomina efecto insectistático.

El efecto insectistático se manifiesta en la inhibición de la alimentación, crecimiento, desarrollo y oviposición del insecto (Rodríguez, 2003). En nuestro estudio, los metabolitos de bajo peso molecular tuvieron un efecto insectistático mayor que la actividad insecticida. El efecto insectistático se demostró con la inhibición del crecimiento de larvas, provocando su muerte.

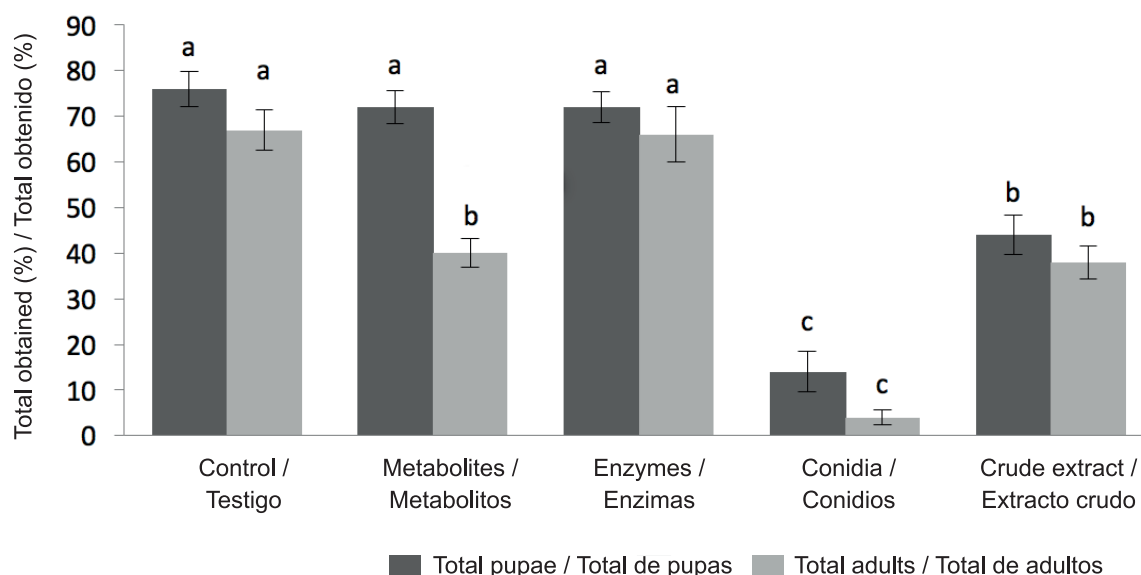


Figure 2. Pupae obtained and adult emergence of *Bradysia impatiens*. Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$) according to the Tukey's test (HSD).

Figura 2. Pupas obtenidas y emergencia de adultos de *Bradysia impatiens*. Letras distintas indican diferencia significativa ($P < 0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey (HSD).

activity, and may be related to juvenile hormones, which cause insect larvae to continue molting. If the production of these hormones ceases during the last larval or nymphal stage, then transformation occurs to pupal stage and later to adult (Rodríguez, 2003). The insectistatic effect of metabolites of EF has not been demonstrated, only the effect of extracts of plants have been mentioned, where the main result is the extension of the larval and pupal stages of *Spodoptera frugiperda* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) (Zavala-Sánchez, Pérez-Gutiérrez, Romo-Asunción, Cárdenas-Ortega, & Ramos-López, 2013).

Moreover, it was observed that, at the end of the treatment with metabolites, there was no presence of *B. impatiens* larvae and pupae. The results obtained in this study are similar to those reported by Lozano-Tovar et al. (2013), who obtained 45 % of maximum mortality caused by *B. bassiana* in pupae of *C. capitata*.

Emergence of adults of *B. impatiens*

Table 3 shows the relative emergence results for adults at 8 and 20 days ($F_{4,20} = 158.70, P < 0.001$). Of the 20 adults who emerged in the treatment with low molecular metabolites, 13 (65 %) showed malformations, representing 26 % of the total of 50 treated insects; in addition, only seven adults, 14 % of the total larvae, emerged with reproduction capacity.

The emergence of malformed adults reduces the number of adults adequate for reproduction; this symptom is consistent with that reported by Abd El-Ghany, El-Sheikh, Abd El-Rahman, and Abd El-Nasser (2012), who observed malformations in adults of *G. mellonella* after application of crude extract of *B. bassiana*. These malformations may be caused by cyclic depsipeptides nature called beauvericin. This toxin also produces alterations in the processes of moulting and metamorphosis (Ferron, 1978).

The insecticidal activity of the crude extracts of EF has been evaluated in several genera of insects, mainly in the orders Coleoptera and Lepidoptera (Guzmán-Franco et al. 2012; Zibae et al., 2011). Ortiz-Urquiza, Garrido-Jurado, Santiago-Álvarez, and Quesada-Moraga (2009) had 80 % of mortality five days after the application of crude enzymatic extract of *Metarhizium anisopliae* (Mestch) in the adult food of *C. capitata*. Regarding the purified metabolites, Quesada-Moraga and Vey (2004) reported the insecticidal effect of bassiacridin on *L. migratoria*; however, in this study there was lower mortality in the treatments with enzymes and crude extract, compared to those obtained by these authors. This can be attributed to the survival capacity of *B. impatiens* (Marín-Cruz et al., 2015b), as dipterans have evolved into niches where pathogens, such as fungi and bacteria, abound (Kuraishi, Hori, & Kurata,

Pupas de *B. impatiens*

La Figura 2 muestra el porcentaje de larvas que pasaron al estado de pupa en los diferentes tratamientos, con diferencia significativa entre ellos ($F_{4,20} = 175.32, P < 0.001$). Como efecto de la actividad insectistática, la mortalidad de las pupas en los tratamientos fue: testigo 12 % (5); metabolitos de bajo peso molecular 44 % (16); enzimas 8 % (6); conidios 71 % (5) y EC 14 % (6). El número de pupas muertas y adultos malformados es evidencia de la inhibición del desarrollo como resultado de la actividad insectistática, y puede estar relacionado con las hormonas juveniles, las cuales provocan que las larvas de insectos continúen mudando. Si la producción de estas hormonas cesa durante el último estadio larvario o ninfal, entonces ocurre la transformación a pupa y posteriormente a adulto (Rodríguez, 2003). El efecto insectistático de los metabolitos de HE no ha sido demostrado, solo se ha mencionado el de extractos de plantas, donde el resultado principal es la prolongación de la fase de los estados de larva y pupa de *Spodoptera frugiperda* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) (Zavala-Sánchez, Pérez-Gutiérrez, Romo-Asunción, Cárdenas-Ortega, & Ramos-López, 2013).

Por otra parte, se observó que, al final del tratamiento con los metabolitos, no hubo presencia de larvas y pupas de *B. impatiens*. Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los reportados por Lozano-Tovar et al. (2013), quienes obtuvieron 45 % de mortalidad máxima ocasionada por *B. bassiana* en pupas de *C. capitata*.

Emergencia de adultos de *B. impatiens*

El Cuadro 3 presenta los resultados de emergencia relativa de adultos a los 8 y 20 días ($F_{4,20} = 158.70, P < 0.001$). De los 20 adultos que emergieron en el tratamiento con metabolitos de bajo peso molecular, 13 (65 %) presentaron malformaciones, representando 26 % del total de los 50 insectos tratados; además, únicamente siete adultos, 14 % del total de larvas, emergieron con capacidad de reproducción.

La emergencia de adultos malformados disminuye la cantidad de adultos aptos para la reproducción; este síntoma concuerda con lo reportado por Abd El-Ghany, El-Sheikh, Abd El-Rahman, y Abd El-Nasser (2012), quienes observaron malformaciones en adultos de *G. mellonella* después de la aplicación de extracto crudo de *B. bassiana*. Estas malformaciones pueden ser ocasionadas por la toxina de naturaleza peptídica cíclica denominada beauvericina. Esta toxina también produce alteraciones en los procesos de muda y metamorfosis (Ferron, 1978).

La actividad insecticida de los extractos crudos de los HE se ha evaluado en diversos géneros de

2013). In addition to the above, dipterans have defense mechanisms such as physical barriers (peritrophic membrane type II) and regeneration of damaged cells in the epithelium, which are very efficient in detecting and counteracting the effect of foreign agents (Kuraishi et al., 2013).

Symptomatology of *B. impatiens* treated with extracts of *B. bassiana*

Due to treatments, dead larvae showed rigidity and melanization in all the treatments, in contrast to dead larvae of the control, which were flaccid and kept a light color. This symptomatology agrees with what has been pointed out by other authors. Chávez, Rodríguez, Sánchez, Hamdan, and Barranco (2014) reported that the application of crude extract of *B. bassiana* in larvae of *Phyllophaga* spp. Harris (Coleoptera: Melolonthidae) causes melanization of them self. Melanization is a response process from the insect humoral immune system to the presence of some external agent (González-Sántoyo & Córdoba-Aguilar, 2012); the change of color, characteristic of the *B. impatiens* pupae, may be due to this process. The insectistatic effect is manifested by the prolongation of the time that a larva or pupa remains in a stage; in the case of *B. impatiens* pupae, this effect has an average duration of four days (Marín-Cruz et al. 2015b). In the present study, pupae from which no

insectos, principalmente en las órdenes Coleoptera y Lepidoptera (Guzmán-Franco et al. 2012; Zibae et al., 2011). Ortiz-Urquiza, Garrido-Jurado, Santiago-Álvarez, y Quesada-Moraga (2009) obtuvieron 80 % de mortalidad a los cinco días de la aplicación de extracto enzimático crudo de *Metarhizium anisopliae* (Mestch) en el alimento de adultos de *C. capitata*. Respecto a los metabolitos purificados, Quesada-Moraga y Vey (2004) reportaron el efecto insecticida de la basiacridina sobre *L. migratoria*; sin embargo, en el presente estudio hubo menor mortalidad en los tratamientos con enzimas y extracto crudo, respecto a los obtenidos por dichos autores. Esto se puede atribuir a la capacidad de supervivencia de *B. impatiens* (Marín-Cruz et al. 2015b), pues los dípteros han evolucionado en nichos donde los agentes patógenos, como hongos y bacterias, abundan (Kuraishi, Hori, & Kurata, 2013). Aunado a lo anterior, los dípteros presentan mecanismos de defensa tales como barreras físicas (membrana peritrófica tipo II) y regeneración de células dañadas en el epitelio, las cuales son muy eficientes para detectar y contrarrestar el efecto de agentes extraños (Kuraishi et al., 2013).

Sintomatología de *B. impatiens* tratado con extractos de *B. bassiana*

Debido a los tratamientos, las larvas muertas presentaron rigidez y melanización en todos los

Table 3. Relative emergence of adults of *Bradysia impatiens* treated with *Beauveria bassiana*.

Cuadro 3. Emergencia relativa de adultos de *Bradysia impatiens* tratados con *Beauveria bassiana*.

Period (days)/ Periodo (días)	Treatment/ Tratamiento	Adults (%)/ Adultos (%)	Relative emergence (%)/ Emergencia relativa (%)	Arcsine transformation/ Transformación Arcoseno
8	Control/Testigo	46	100	90a
	Metabolites/Metabolitos	13	28	32b
	Enzymes/Enzimas	46	100	90a
	Conidia/Conidios	0	0	0d
	Crude extract/ Extracto crudo	2	4	12c
20	Control/Testigo	67	100	90a
	Metabolites/Metabolitos	40	60	51b
	Enzymes/Enzimas	67	100	90a
	Conidia/Conidios	4	6	14c
	Crude extract/ Extracto crudo	38	57	49b

*Different letters in the same period indicate significant difference ($P < 0.05$) according to the Tukey Means Test (HSD).

*Letras distintas en un mismo periodo indican diferencia significativa ($P < 0.05$) de acuerdo con la prueba de medias de Tukey (HSD).

adult emerged, after seven days, began to decompose and become dark in color. The treatment of conidia generated mycelium of *B. bassiana* in some cases. Dead larvae due to low molecular weight metabolites were rigid; in addition, 13 adults had malformations in the wings that prevented them to spread their wings and flying. In the case of malformed pupae there was no adult emergence. This insectistatic effect is important because, although it does not have an immediate effect or in the first days, its action of inhibiting the growth and normal development of larvae and pupae of *B. impatiens* causes that they do not complete their cycle.

Conclusions

Conidia and extracts of *Beauveria bassiana* (enzymes, metabolites and crude extract) had different effects on larvae and pupae of *Bradysia impatiens*. Conidia (ingestion-topical application) produced greater insecticidal action than insectistatic activity. Metabolites of *B. bassiana* had an insectistatic effect on the larvae; this mode of action is reported for the first time in this entomopathogenic fungus. Therefore, metabolites and conidia of *B. bassiana* have potential as biocontrol agents of *B. impatiens* populations.

Acknowledgments

The authors thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the PhD scholarship granted to M. C. Victor Hugo Marín Cruz, and to the Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM-X) for funding to develop this study.

End of English version

References / Referencias

- Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265–267.
- Abd El-Ghany, T. M., El-Sheikh, H. H., Abd El-Rahman, G. A., & Abd El-Nasser, A. M. (2012). Biodiversity of entomopathogenic fungi new cultivated soil with their using to control of *Galleria mellonella*. *International Journal of Current Research and Review*, 4(24), 17–31. Retrieved from <http://www.scopemed.org/fulltextpdf.php?mno=31051>
- Acharya, N., Seliga, A. R., Rojotte, G. E., Jenkins, E. N., & Matthew, B. T. (2015). Persistence and efficacy of a *Beauveria bassiana* biopesticide against the house fly, *Musca domestica*, on typical structural substrates of poultry houses. *Biocontrol Science and Technology*, 25(6), 697–715. doi: 10.1080/09583157.2015.1009872
- Aguilera, M. (2001). Estudios de efectividad biológica con plagas de granos almacenados. En N. Bautista, & Y. O. Díaz (Eds.), *Bases para realizar estudios de efectividad*

tratamientos, en contraste con las larvas muertas del testigo que se mostraron flácidas y conservaron un color claro. Esta sintomatología concuerda con lo señalado por otros autores. Chávez, Rodríguez, Sánchez, Hamdan, y Barranco (2014) reportaron que la aplicación de extracto crudo de *B. bassiana* en larvas de *Phyllophaga* spp. Harris (Coleoptera: Melolonthidae) ocasiona melanización de las mismas. La melanización es un proceso de respuesta del sistema inmune humoral de los insectos ante la presencia de algún agente externo (González-Sántoyo & Córdoba-Aguilar, 2012); el cambio de coloración, característico de las pupas de *B. impatiens*, puede deberse a dicho proceso. El efecto insectistático se manifiesta con la prolongación del tiempo que una larva o pupa permanece en un estadio o estado; en el caso de las pupas de *B. impatiens* tiene una duración promedio de cuatro días (Marín-Cruz et al. 2015b). En el presente estudio, las pupas de las que no emergieron adultos, después de siete días, comenzaron a descomponerse y a tornarse de un color oscuro. El tratamiento de conidios generó micelio de *B. bassiana* en algunos casos. Las larvas muertas debido a los metabolitos de bajo peso molecular estuvieron rígidas; además, 13 adultos presentaron malformaciones en las alas que les impidió desplegar y volar. En el caso de las pupas malformadas no hubo emergencia de adultos. Este efecto insectistático es importante debido a que, si bien no se tiene un efecto inmediato o en los primeros días, su acción de inhibición del crecimiento y desarrollo normal de las larvas y pupas de *B. impatiens* provoca que no completen su ciclo.

Conclusiones

Los conidios y extractos de *Beauveria bassiana* (enzimas, metabolitos y extracto crudo) tuvieron diferentes efectos en larvas y pupas de *Bradysia impatiens*. Los conidios (aplicación ingestión-tópica) produjeron mayor acción insecticida que insectistática. Los metabolitos de *B. bassiana* tuvieron efecto insectistático en las larvas; este modo de acción es reportado por primera vez en este hongo entomopatógeno. Por lo anterior, los metabolitos y conidios de *B. bassiana* tienen potencial como agentes de biocontrol de las poblaciones de *B. impatiens*.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de estudios de doctorado otorgada al M. C. Víctor Hugo Marín Cruz, y a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM-X) por el financiamiento para desarrollar el presente trabajo.

Fin de la versión en español

- biológica de plaguicidas (pp. 43–50). Montecillo, Texcoco, México: Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas.
- Ahmed, A. M., & El-Katatny, M. H. (2007). Entomopathogenic fungi as biopesticides against the Egyptian cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis*: between biocontrol promise and immune-limitation. *Journal of the Egyptian Society of Toxicology*, 37, 39–51. Retrieved from http://fac.ksu.edu.sa/sites/default/files/ahmed_el-katatny-2007.pdf
- Ali, S., Ren, S. X., Huang, Z., & Wu, J. H. (2010). Purification of enzymes related to host penetration and pathogenesis from entomopathogenic fungi. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2(1), 15–22. Retrieved from <http://www.formatex.info/microbiology2/isbn1-contents.pdf>
- Barranco-Florado, J. E., Alatorre-Rosas, R., Gutiérrez-Rojas, M., Viniestra-González, G., & Saucedo-Castañeda, G. (2002). Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 910–915. doi: 10.1016/S0141-0229(02)00032-7
- Barranco, F. J. E., Bustamante, C. P., Mayorga, R. L., González, C. R., Martínez, C. P., & Azaola, A. (2009). β -N Acetylglucosaminidase production by *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* ATCC 26854 by solid state fermentation utilizing shrimp shell. *Interciencia*, 34(5), 356–360. Retrieved from <http://www.scielo.org.ve/pdf/inci/v34n5/art11.pdf>
- Chávez, I. E., Rodríguez, N. S., Sánchez, P. Ll. C., Hamdan, P. A., & Barranco, F. J. A. (2014). Actividad insecticida *in vitro* de extracto crudo de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin sobre larvas de *Phyllophaga* spp. (Harris). *Revista Protección Vegetal*, 29(3), 226–230. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v29n3/rpv12314.pdf>
- Cibrián, T. D., García, D. S., & Don Juan, M. B. (2008). *Manual de identificación y manejo de plagas y enfermedades en germoplasma y planta producida en viveros*. México: Comisión Nacional Forestal.
- Ferron, P. (1978). Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Reviews Entomology*, 23, 409–442. doi: 10.1146/annurev.en.23.010178.002205
- González-Sántoyo, I., & Córdoba-Aguilar, A. (2012). Phenoloxidase: A key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 142, 1–16. doi: 10.1111/j.1570-7458.2011.01187.x
- Guzmán-Franco, A. W., Hernández-López, J., Enríquez-Vara, J. N., Alatorre-Rosas, R., Tamayo-Mejía, F., & Ortega-Areñas, L. D. (2012). Susceptibility of *Phyllophaga polyphylla* and *Anomala cincta* larvae to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates, and the interaction with soil properties. *BioControl*, 57, 553–563. doi: 10.1007/s10526-011-9421-3
- Kuraishi, T., Hori, A., & Kurata, S. (2013). Host-microbe interactions in the gut of *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Physiology*, 4(375), 1–8. doi: 10.3389/fphys.2013.00375
- Lozano-Tovar, M. D., Ortiz-Urquiza, A., Garrido-Jurado, I., Traperro-Casa, A., & Quesada-Moraga, E. (2013). Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil-dwelling pest and soil-borne pathogens of olive. *Biological Control*, 67, 409–420. doi: 10.1016/j.biocontrol.2013.09.006
- Marín-Cruz, V. H., Cibrián-Tovar, D., Méndez-Montiel, J. T., Pérez-Vera, O. A., & Cadena-Meneses, J. A. (2015a). Control del mosco fungoso negro *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1839) y *Bradysia impatiens* (Johannsen, 1912) (Diptera: Sciaridae) en *Pinus montezumae* Lamb. *Revista Mexicana Ciencias Forestales*, 6(27), 90–100. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/remcf/v6n27/v6n27a8.pdf>
- Marín-Cruz, V. H., Cibrián-Tovar, D., Méndez-Montiel, J. T., Pérez-Vera, O. A., Cadena-Meneses, J. A., Huerta, H., ... Cruz-Rodríguez, J. A. (2015b). Biología de *Lycoriella ingenua* y *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). *Madera y Bosques*, 21(1), 113–128. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/mb/v21n1/v21n1a9.pdf>
- Michelle, S. V., Vieira, T. P., Pereira, B. J. D., Mesquita, P. L., Alves, L. E. A. L., & Figueiredo, P. A. L. (2013). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and production of cuticle-degrading enzymes in the presence of *Diatraea saccharalis* cuticle. *African Journal of Biotechnology*, 2(46), 6491–6497. doi: 10.5897/AJB2013.11972
- Mohrig, W., & Menzel, F. (2009). Sciaridae (Black fungus gnats). In B. V. Brown, A. Borkent, J. M. Cumming, D. M. Wood, N. E. Woodley, & M. A. Zumbado (Eds.), *Manual of Central American Diptera* vol. 1 (pp. 279–292). Canada: National Research Council of Canada.
- Motta-Delgado, P. A., & Murcia-Ordoñez, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambi-Agua*, 6, 77–90. doi: 10.4136/1980-993X
- Ortiz-Urquiza, A. I., Garrido-Jurado, C., Santiago-Álvarez, C., & Quesada-Moraga, E. (2009). Purification and characterisation of proteins secreted by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with insecticidal activity against adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Pest Management Science*, 65, 1130–1139. doi: 10.1002/ps.1803
- Quesada-Moraga, E., & Vey, A. (2004). Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycological Research*, 108, 441–452. doi: 10.1017/S0953756204009724
- Rodríguez, H. C. (2003). Cuantificación de la inhibición del crecimiento en insectos, provocada por sustancias naturales. En C. M. Tornero, J. F. López-Olguín, & A. Aragón (Eds.), *Agricultura, ambiente y desarrollo sustentable* (pp. 223–242). México: Benemérita Universidad de Puebla.
- Sánchez-Pérez, Ll. C., Barranco-Florado, J. E., Rodríguez-Navarro, S., Cervantes-Mayagoitia, J. F., & Ramos-López, M. A. (2014). Enzymes of entomopathogenic fungi, advances and insights. *Advances in Enzyme Research*, 2, 65–76. doi: 10.4236/aer.2014.22007

- Shamshad, A., Clift, A. D., & Mansfield, S. (2009). The effect of tibia morphology on vector competency of mushroom sciarid flies. *Journal of Applied Entomology*, 133(6), 484–490. doi: 10.1111/j.1439-0418.2008.01362.x
- Statistical Analysis System, [SAS Institute Inc]. (2009). JMP version 8. Statistical Discovery. From SAS. USA: Author.
- Xu, Y., Orozco, R., Kithsiri, W. E. M., Espinosa-Artiles, P., Gunatilaka, L. A. A., Stock, P. S., & Molnar, I. (2009). Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide bassianolide, an insecticidal virulence factor of *Beauveria bassiana*. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 353–364. doi: 10.1016/j.fgb.2009.03.001
- Zavala-Sánchez, M., Pérez-Gutiérrez, S., Romo-Asunción, D., Cárdenas-Ortega, N. C., & Ramos-López, A. (2013). Activity of four *Salvia* species against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Southwestern Entomologist*, 38(1), 67–73. doi: 10.3958/059.038.0107
- Zibae, A., Bandani, A. R., Talaie-Hassanlouei, R., & Malagoli, D. (2011). Cellular immune reactions of the sunn pest, *Eurygaster integriceps*, to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and its secondary metabolites. *Journal of Insect Science*, 11, 138. doi: 10.1673/031.011.13801