



# Native isolates of *Metarhizium brunneum* Petch with biocontrol potential against the black stink bug (*Antiteuchus tripterus* Fabricius) in cacao

## Aislamientos nativos de *Metarhizium brunneum* Petch con potencial de biocontrol sobre la chinche negra (*Antiteuchus tripterus* Fabricius) del cacao

Miguel A. Mayo-Hernández<sup>1</sup>; Magdiel Torres-de-la-Cruz<sup>1\*</sup>; Manuel Pérez-de-la-Cruz<sup>1</sup>; Ángel F. Huamán-Pilco<sup>2</sup>; Aracely de la Cruz-Pérez<sup>1</sup>; Lenin Arias-Rodríguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas. km 0.5 carretera Villahermosa-Cárdenas. C. P. 86150. Villahermosa, Tabasco, México.

<sup>2</sup>Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva. Calle Higos Urco, Chachapoyas. C. P. 01001. Amazonas, Perú.

\*Corresponding author: biomag75@hotmail.com; tel.: +52914 1192428.

### Abstract

**Introduction.** Cacao is a perennial crop of economic importance in southeastern Mexico, where the black stink bug (*Antiteuchus tripterus* Fabricius) has been reported as a pest. Control of this insect through entomopathogenic fungi represents a sustainable alternative.

**Objective.** To characterize and select native isolates of *Metarhizium brunneum* Petch with biocontrol potential against the black stink bug (*A. tripterus*) in Tabasco, Mexico.

**Materials and methods.** Five fungal strains were isolated and characterized based on morphological, molecular, physiological, and pathogenic traits. Phylogenetic analysis was conducted using IQ-TREE v2. Mycelial growth (MG), conidial germination (CG), and conidial production (CP) were evaluated at 25, 30, and 35 °C. These variables, along with pathogenicity, were analyzed using ANOVA and Tukey's HSD test ( $P < 0.05$ ). The time required to reach 50 % (GT<sub>50</sub>) and 90 % (GT<sub>90</sub>) conidial germination was estimated using Probit analysis.

**Results and discussion.** All isolates were identified as *Metarhizium brunneum*. Significant differences ( $P < 0.05$ ) were observed in MG, CP, and pathogenicity. The most favorable temperature range for the fungus was 25 to 30 °C. GT<sub>50</sub> ranged from 7.8 to 21.9 h, and GT<sub>90</sub> from 9.5 to 27.7 h. Pathogenic effectiveness ranged from 72 to 96 %. Isolates TCCH5 and TCCH8 showed the greatest potential as biological control agents against *A. tripterus*.

**Conclusions.** This study reports, for the first time, the pathogenicity of *M. brunneum* against *A. tripterus*. Field studies are necessary to evaluate the most promising isolates under natural conditions.

**Keywords:** phylogenetic analysis; biological control; entomopathogens; pest; *Theobroma cacao*.

### Resumen

**Introducción.** El cacao es un cultivo perenne de importancia en el sureste de México, donde la chinche negra del cacao (*Antiteuchus tripterus* Fabricius) se ha reportado como plaga. El control del insecto mediante hongos entomopatógenos constituye una alternativa sustentable.

**Objetivo.** Caracterizar y seleccionar aislamientos nativos de *Metarhizium brunneum* Petch con potencial de biocontrol de la chinche negra del cacao (*A. tripterus*) en Tabasco, México.

**Materiales y métodos.** Se aislaron cinco cepas y se caracterizaron con base en variables morfológicas, moleculares, fisiológicas y patogénicas. El análisis filogenético se realizó con IQ-TREE v2. El crecimiento micelial (CM), la germinación (GdC) y la producción (PdC) de conidios se evaluaron a 25, 30 y 35 °C. Estas variables y la patogenicidad se analizaron con análisis de varianza y separación de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ). El tiempo en que ocurrió el 50 (TG<sub>50</sub>) y 90 % de la germinación (TG<sub>90</sub>) de conidios se estimó mediante análisis Probit.

**Resultados y discusión.** Los aislamientos se identificaron como *Metarhizium brunneum*. Existieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el CM, PdC y patogenicidad. El rango de temperatura favorable para el hongo fue de 25 a 30 °C. El TG<sub>50</sub> varió de 7.8 a 21.9 h y el TG<sub>90</sub> de 9.5 a 27.7 h. La efectividad patogénica fue de 72 a 96 %. Los aislamientos TCCH5 y TCCH8 resultaron los más promisorios como agentes de control biológico en *A. tripterus*.

**Conclusiones.** Se reporta por primera ocasión la patogenicidad de *M. brunneum* sobre *A. tripterus*. Estudios en campo deberán realizarse para la evaluación de los aislamientos más promisorios.

**Palabras clave:** análisis filogenético; control biológico; entomopatógenos; plaga; *Theobroma cacao*.

Please cite this article as follows (APA 7): Mayo-Hernández, M. A., Torres-de-la-Cruz, M., Pérez-de-la-Cruz, M., Huamán-Pilco, A. F., de la Cruz-Pérez, A., & Arias-Rodríguez, L. (2025). Native isolates of *Metarhizium brunneum* Petch with biocontrol potential against the black stink bug (*Antiteuchus tripterus* Fabricius) in cacao. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 31, e24032. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2024.08.032>



## Introduction

Cacao (*Theobroma cacao* L.) is a perennial crop of great importance in Mexico and across tropical regions worldwide. In Mexico, 52 449 ha are cultivated in the southeastern region, specifically in the states of Oaxaca, Chiapas, and Tabasco, the latter accounting for 61 % of national production (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2023).

In Tabasco, several insect pests have been reported affecting *T. cacao*. Among the most prominent are the hibiscus mealybug (*Maconellicoccus hirsutus* Green) (Torres de la Cruz et al., 2019), the spittlebug (*Clastoptera laenata* Fowler), the whitefly (*Lecanoideus floccissimus* Martin), the cacao moth (*Hemeroblemma mexicana* Guenée), the red-banded thrips (*Selenothrips rubrocinctus* Giard), the black aphid (*Toxoptera aurantii* Boyer de Fonscolombe), and the borer *Xyleborus vulvulus* Fabricius (Sánchez-Soto & Cortez-Madrigal, 2000). These pests reduce both the quality and yield of cacao production.

Recently, the black stink bug (*Antiteuchus tripterus* Fabricius, 1787) (Hemiptera: Pentatomidae) has been reported in cacao plantations in Tabasco. This insect is a significant pest of cacao in several Caribbean and South American countries, including Trinidad and Tobago, Brazil, Ecuador, and Peru (Castillo-Carrillo et al., 2020). Damage is caused by both nymphs and adults, which feed by sucking sap from the peduncles and the base of the fruits. During feeding, the black stink bug injects toxins that lead to wilting and death of fertilized flowers, known locally as *chillos*. In developing fruits, the bug causes shallow lesions that can extend from the peduncle to the apex, potentially creating entry points for phytopathogenic fungi. Additionally, Castillo-Carrillo et al. (2020) reported that this insect acts as a mechanical vector of cacao frosty pod rot (*Moniliophthora roreri* [Cif. & Par.] Evans et al., 2003). Consequently, the development of effective and sustainable management strategies for this pest is urgently needed.

Chemical control of *A. tripterus* can significantly reduce insect populations; however, the use of synthetic insecticides may contribute to resistance development, leave harmful residues on the fruit, and negatively impact key cacao pollinators (Pu & Chung, 2024). In the search for environmentally friendly alternatives, biological control offers a sustainable option. In this regard, entomopathogenic fungi such as *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin, *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., and *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson have demonstrated effectiveness against *A. tripterus* in Colombia (Yepes-Rodríguez, 2019). Despite the presence of *A. tripterus* in Mexican cacao plantations, there are no reports of native entomopathogenic fungi with proven

## Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo perenne de gran importancia en México y en todas las regiones tropicales del mundo. En México se cultivan 52 449 ha en la región sursureste, específicamente en Oaxaca, Chiapas y Tabasco; este último con 61 % de la producción (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2023).

En Tabasco se han reportado plagas insectiles que atacan a *T. cacao*. Entre ellas sobresalen la cochinilla rosada del hibisco (*Maconellicoccus hirsutus* Green) (Torres de la Cruz et al., 2019), el salivazo (*Clastoptera laenata* Fowler), la mosca blanca (*Lecanoideus floccissimus* Martin), el gusano lagarta (*Hemeroblemma mexicana* Guenée), el trips de banda roja (*Selenothrips rubrocinctus* Giard), el pulgón negro (*Toxoptera aurantii* Boyer de Fonscolombe) y el barrenador *Xyleborus vulvulus* Fabricius (Sánchez-Soto & Cortez-Madrigal, 2000), las cuales reducen la calidad y el rendimiento de la producción.

Recientemente, en plantaciones de cacao de Tabasco se ha reportado a la chinche negra (*Antiteuchus tripterus* Fabricius 1787) (Hemiptera: Pentatomidae). Esta es una plaga importante del cacao en países del Caribe y América del Sur, tales como Trinidad y Tobago, Brasil, Ecuador y Perú (Castillo-Carrillo et al., 2020). El daño lo provocan las ninfas y adultos que se alimentan succionando savia de los pedúnculos y de la base de los frutos. Durante la alimentación, la chinche negra inyecta toxinas que ocasionan la marchitez y muerte de las flores fecundadas o 'chillos'. En frutos desarrollados, la chinche ocasiona lesiones poco profundas que pueden extenderse desde el pedúnculo hacia el ápice, las cuales pueden facilitar la entrada de hongos fitopatógenos. Por otro lado, Castillo-Carrillo et al. (2020) reportaron que este insecto actúa como un vector mecánico de la moniliasis del cacao (*Moniliophthora roreri* [Cif. y Par.] Evans et al., 2003). Por lo anterior, se requiere del desarrollo de estrategias eficaces y sustentables para el control de esta plaga.

El control químico de *A. tripterus* reduce significativamente las poblaciones del insecto; sin embargo, el uso de insecticidas sintéticos podría favorecer la resistencia, el efecto residual en los frutos y la disminución de poblaciones de los principales polinizadores del cacao (Pu & Chung, 2024). En la búsqueda de estrategias de control amigables con el ambiente, el control biológico constituye una alternativa sustentable. Al respecto, se ha reportado efectividad de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin, *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. y *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson sobre *A. tripterus* en Colombia (Yepes-Rodríguez, 2019). A pesar de la presencia de *A. tripterus* en plantaciones de cacao en México, no existen reportes de hongos entomopatógenos

biological efficacy for controlling this insect. Therefore, the objective of this study was to characterize and select native isolates of *Metarhizium* spp. for the biological control of the black stink bug (*A. tripterus*) in cacao plantations in Tabasco, Mexico. This research contributes to the understanding of entomopathogenic fungal diversity and proposes a biological control alternative for managing *A. tripterus* in cacao crops in Tabasco.

## Materials and Methods

### Collection site

Adults of *A. tripterus* infected with entomopathogenic fungi were obtained through targeted sampling in a cacao plantation located in the community of José María Morelos y Pavón (Las Delicias), Teapa, Tabasco. The collection site is located at coordinates 17° 38' 5.1" N, 92° 55' 48.2" W, an elevation of 10 meters. Micosed cadavers were transferred into sterile vials, placed in thermal containers, and transported to the Entomopathogen Laboratory at the Academic Division of Biological Sciences, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

### Isolation of fungal strains

*A. tripterus* cadavers were sterilized in a 0.5 % sodium hypochlorite solution for 5 minutes, following the protocol described by Gerónimo-Torres et al. (2016). They were then rinsed with sterile distilled water (SDW) and individually placed in humid chambers at 25 °C for 8 days for sporulation. Sporulating cadavers were used to inoculate Sabouraud Dextrose Agar supplemented with 0.1 % yeast extract (SDA + YE). Monospore isolates were obtained from polysporic cultures using the method described by SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2016). The isolates were stored under refrigeration until specific characterization assays.

### Morphological identification

The fungal isolates were identified to the species level based on their reproductive structures, following the criteria described by Barnett and Hunter (1998) and Bischoff et al. (2009). For morphological characterization, the isolates were grown on Petri dishes containing SDA + YE medium for 14 days. Colony characteristics such as size, morphology, and conidiation were recorded for each isolate. Additionally, a spore suspension was inoculated onto 0.5 cm SDA discs placed under sterile coverslips to observe the microscopic structures of each isolate. The inoculated discs were incubated in a humid chamber at 25 °C for 3 to 5 days. Microscopic characteristics of

de origen nativo con eficacia biológica para el control del citado insecto. Por ello, el objetivo de esta investigación fue caracterizar y seleccionar aislamientos nativos de *Metarhizium* sp. para el control biológico de la chinche negra del cacao (*A. tripterus*) en Tabasco, México. Esta investigación aporta al conocimiento de la diversidad de hongos entomopatógenos y propone una alternativa de control biológico contra *A. tripterus* en el cultivo de cacao en Tabasco.

## Materiales y métodos

### Sitio de recolecta

Adultos de la chinche *A. tripterus* micosados se obtuvieron mediante un muestreo dirigido en una plantación de cacao, ubicada en la rancharía José María Morelos y Pavón (Las Delicias), Teapa, Tabasco. El sitio de recolecta se ubica en las coordenadas 17° 38' 5.1" N, 92° 55' 48.2" O a una elevación de 10 m. Los cadáveres micosados se transfirieron a viales estériles, se colocaron en contenedores térmicos y se transportaron al Laboratorio de Entomopatógenos de la División Académica de Ciencias Biológicas en la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

### Obtención de los aislamientos

Los cadáveres de *A. tripterus* se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % durante 5 min, de acuerdo con Gerónimo-Torres et al. (2016). Posteriormente, se lavaron con agua destilada estéril (ADE) y se colocaron individualmente en cámaras húmedas a 25 °C durante 8 d, lo que permitió la esporulación para realizar la siembra en medio de cultivo Agar-Dextrosa Sabouraud + 0.1 de extracto de levadura (SDA + EL). De los cultivos poliespóricos se obtuvieron aislamientos monospóricos de acuerdo con el método propuesto por SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2016). Los aislamientos se conservaron en refrigeración hasta su empleo en las pruebas de caracterización específica.

### Identificación morfológica

Los aislamientos se identificaron a nivel específico con base en las estructuras reproductivas, de acuerdo con Barnett y Hunter (1998) y Bischoff et al. (2009). Para la caracterización, los aislamientos crecieron en cajas de Petri con el medio SDA + EL, durante 14 d. En cada aislamiento se determinó la característica de la colonia: tamaño, morfología y conidiación. Además, una suspensión de esporas se inoculó sobre discos de SDA de 0.5 cm de diámetro, bajo cubreobjetos estériles, para obtener estructuras microscópicas de cada aislamiento. Los discos inoculados se incubaron durante 3 a 5 días a 25 °C en cámara húmeda. Las características

the conidiophores and conidia were observed using an Axio Scope A1 brightfield optical microscope (Carl Zeiss, Microscopy GmbH®, Göttingen, Germany), and images were captured with an AxioCam ERc5s digital camera (Carl Zeiss®). Morphometric data of the reproductive structures were obtained using the measurement tools of the Zen/2011 software (Carl Zeiss Microscopy GmbH®). The isolates were deposited in the entomopathogenic fungi collection of the Entomopathogen Laboratory at the Academic Division of Biological Sciences, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, Mexico.

### Molecular identification

Genomic DNA was extracted from 7-day-old pure cultures using the CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) method, and DNA concentration was estimated with a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific®). For phylogenetic analysis, partial gene sequences from two regions were amplified by PCR: the nuclear rDNA ITS1–5.8S–ITS2 region and the  $\beta$ -tubulin gene. The ITS region was amplified using primers ITS5 (5'-gca agt aaa agt cgt aac aag g-3') and ITS4 (5'-tcc tcc gct tat tga tat gc-3'). Partial amplification of the  $\beta$ -tubulin gene was performed using primers Bt2a (5'-ggg aac caa atc ggt gct gct ttc-3') and Bt2b (5'-acc ctc agt gta gtg acc ctt ggc-3'). PCR reactions for both genes were carried out under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 2 min; 40 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 45 s, and 72 °C for 90 s; followed by a final extension at 72 °C for 4 min. Each 25  $\mu$ L PCR reaction contained 1X buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.4  $\mu$ M of each primer (Integrated DNA Technologies, Inc.), 1 U of Taq DNA polymerase (Promega), and 20 ng of genomic DNA. DNA quantification was performed using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®). Amplicons were submitted for sequencing to Psomagen Inc. (USA). The resulting sequences were compared with those available in GenBank using BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides) at the National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### Phylogenetic analysis

A total of 24 taxa previously downloaded from NCBI were used, including the sequences obtained from the isolates. DNA sequences were aligned using MUSCLE, implemented in MEGA-X (Kumar et al., 2018), and concatenated with SeaView 4.7 (Gouy et al., 2010). The best-fit nucleotide substitution model was determined using jModelTest v2 (Darriba et al., 2012), based on the Akaike Information Criterion (AIC). Phylogenetic analysis was conducted using IQ-TREE v2 (Minh et al., 2020), which implements a maximum likelihood algorithm, through the CIPRES Science Gateway

microscópicas de conidióforos y conidios se observaron bajo el microscopio óptico de campo claro Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Microscopy GmbH®, Göttingen, Germany) y las imágenes se digitalizaron con la cámara AxioCam ERc5s (Carl Zeiss®). La morfometría de las estructuras reproductivas se obtuvo con las herramientas del programa Zen/2011 (Carl Zeiss Microscopy GmbH®). Los aislamientos se depositaron en la colección de hongos entomopatógenos del Laboratorio de Entomopatógenos de la División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, México.

### Identificación molecular

El ADN se extrajo de cultivos puros de 7 d por el método del CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) y la concentración se estimó con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®). Para el análisis filogenético, secuencias parciales de genes se obtuvieron de dos regiones y se amplificaron por PCR: la región ITS1-5.8S-ITS2 del DNA nuclear y  $\beta$ -tubulina. La región ITS se amplificó con los iniciadores ITS5 (5'-gca agt aaa agt cgt aac aag g-3') e ITS4 (5'-tcc tcc gct tat tga tat gc-3'). La amplificación parcial del gen  $\beta$ -tubulina se hizo con los iniciadores Bt2a (5'-ggg aac caa atc ggt gct gct ttc-3') y Bt2b (5'-acc ctc agt gta gtg acc ctt ggc-3'). Ambos genes se amplificaron bajo las siguientes condiciones de PCR: 94 °C por 2 min; 40 ciclos de 94 °C- 30 s, 55 °C- 45 s, 72 °C- 90 s; y extensión final de 72 °C por 4 min. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en volúmenes de 25  $\mu$ L que contenían amortiguador (1X), MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), dNTP (0.2 mM), iniciadores (0.4  $\mu$ M de cada uno [Integrated DNA Technologies, Inc.]), enzima Taq DNA polimerasa (1 unidad, Promega) y ADN (20 ng). El ADN se cuantificó en un NanoDrop 2000, Thermo Scientific®. Los amplicones se enviaron para su secuenciación a la compañía Psomagen (EUA). Las secuencias se compararon con las disponibles en el GenBank (mediante comparación nucleotídica en BLASTn) del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### Análisis filogenético

Se usaron 24 taxones previamente descargados del NCBI, incluyendo las secuencias de los aislamientos. Las secuencias de ADN se alinearon con MUSCLE implementado en MEGA-X (Kumar et al., 2018) y se concatenaron con SeaView 4.7 (Gouy et al., 2010). Se utilizó jModelTest v2 (Darriba et al., 2012) para identificar el modelo de evolución de nucleótidos más apropiado según el criterio de información de Akaike. El análisis filogenético se realizó con IQ-TREE v2 (Minh et al., 2020) que implementa el algoritmo de máxima verosimilitud en el portal CIPRES Science Gateway v3.3 (<https://www.phylo.org/portal2/login!input.action>). El árbol filogenético se visualizó y editó con iTOL (Letunic et al., 2021).

v3.3 portal (<https://www.phylo.org/portal2/login!input.action>). The resulting phylogenetic tree was visualized and edited using iTOL (Letunic et al., 2021).

## Physiological characterization

### *Mycelial growth*

Five-day-old cultures of each isolate were used to transfer a 5 × 5 mm section from the edge of the colony onto a 90 mm Petri dish containing SDA + YE medium, using a sterile cork borer. The inoculated plates were incubated at 25, 30, and 35 ± 1 °C to evaluate the thermal tolerance of the fungus. Each treatment included five replicates per isolate and temperature. Mycelial growth (MG) was recorded every 2 days until one of the isolates fully covered the medium. The average radial growth (RG) on the final day was used for statistical analysis. The effect of temperature on RG was assessed by calculating the percentage of growth increase (INC) or inhibition (INH) using the following formulas: % (INH/INC) = [(RG at 30 °C × 100/RG at 25 °C) – 100], and % (INH/INC) = [(RG at 35 °C × 100/RG at 30 °C) – 100], according to Torres-de la Cruz et al. (2013).

### *Germination rate*

Eighteen-day-old cultures of each isolate were used to prepare a conidial suspension at a concentration of 5 × 10<sup>6</sup> conidia·mL<sup>-1</sup>. From this suspension, 30 µL were deposited onto Petri dishes containing SDA + YE medium. Four replicates were established per treatment. The plates were incubated at three temperatures: 25, 30 and 35 °C ± 1 °C. Germination was monitored by examining 100 conidia per replicate at hourly intervals under a light microscope, continuing until one of the isolates reached 90 % germination. Conidia were considered germinated when the germ tube length was at least half the length of the conidium (Figure 1).

### *Conidial production on SDA medium*

From each fungal isolate, 5 × 5 mm sections were taken from the actively growing edge of 8-day-old colonies using a sterile cork borer and transferred to Petri dishes containing SDA + YE medium. The plates were incubated at 25, 30, and 35 ± 1 °C for 16 days in the dark. Conidia were harvested by flooding the culture with sterile distilled water (SDW) containing 0.1 % Tween 80 and gently scraping the spores with a stainless steel micro-spatula. The resulting conidial suspension was homogenized for 1 min using a magnetic stirrer. To separate conidia from mycelial fragments, the suspension was filtered through sterile medical gauze (Protec®, 20 × 12 pads). Conidial production (CP) per isolate (five replicates) was estimated with a Neubauer

## Caracterización fisiológica

### *Crecimiento micelial*

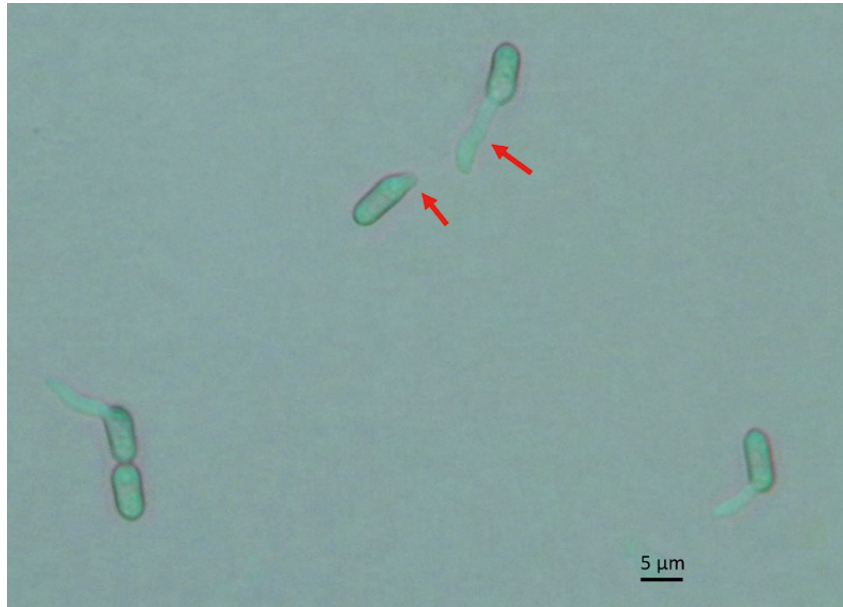
Cultivos de cada aislamiento de 5 d de crecimiento se utilizaron para transferir, con un sacabocados, una fracción de 5 × 5 mm del extremo de la colonia a una caja Petri (90 mm) con medio SDA + EL. Las cajas con el inóculo se incubaron a 25, 30 y 35 ± 1 °C, para evaluar la tolerancia térmica del hongo, y se consideraron cinco repeticiones por aislamiento y temperatura. El crecimiento micelial (CM) se registró cada 2 d hasta que un aislamiento cubrió todo el medio. La media del crecimiento radial (CR) del último día se utilizó para el análisis estadístico. El efecto de la temperatura sobre el CR se evaluó midiendo el porcentaje de incremento (INC) o inhibición (INH) del CR con la fórmula: % (INH/INC) = [(CR a 30 °C × 100/CR a 25 °C) – 100], y % (INH/INC) = [(CR a 35 °C × 100/CR a 30 °C) – 100], de acuerdo con Torres-de la Cruz et al. (2013).

### *Velocidad de germinación*

Cultivos de cada aislamiento de 18 d de crecimiento se utilizaron para obtener una suspensión de 5 × 10<sup>6</sup> conidios·mL<sup>-1</sup>. De esta suspensión se depositaron 30 µL en cajas Petri con medio SDA + EL. Se establecieron cuatro repeticiones. Las cajas Petri con las alícuotas de conidios se incubaron a tres temperaturas: 25, 30 y 35 °C ± 1 °C. El registro de germinación consistió en lecturas de 100 conidios cada hora, en un microscopio óptico, hasta el tiempo en que un aislamiento alcanzó 90 % de germinación; se determinó que estos habían germinado cuando el tubo germinativo alcanzó la mitad de la longitud del conidio (Figura 1).

### *Producción de conidios en medio SDA*

De cada aislamiento fúngico con 8 d de crecimiento, se obtuvieron secciones de 5 × 5 mm del borde de colonias con ayuda de un sacabocado y se transfirieron a cajas de Petri con SDA + EL, las cuales se incubaron a 25, 30 y 35 °C ± 1 °C durante 16 d en oscuridad. Los conidios se cosecharon inundando el cultivo con ADE + tween 80 (0.1 %) y raspando las esporas con una microespátula de acero inoxidable. La suspensión de conidios se homogenizó durante 1 min con un agitador magnético. Para separar las esporas del micelio, la suspensión se filtró con gasa clínica estéril (Protec®, tejido 20 × 12). La producción de conidios (PdC) por aislamiento (cinco repeticiones) se estimó con una cámara de Neubauer. El número de conidios·mL<sup>-1</sup> se calculó a través de la fórmula: C = (Cc) (4 × 10<sup>6</sup>) (Fd/80); donde, Cc = número promedio de conidios contados en cinco cuadrantes de la cámara de Neubauer y Fd = factor de dilución.



**Figure 1. Conidia of *Metarhizium brunneum* showing germ tube formation.**

**Figura 1. Conidios de *Metarhizium brunneum* mostrando tubo germinativo.**

chamber. The number of conidia·mL<sup>-1</sup> was calculated by the formula.  $C = (C_c) (4 \times 10^6) (F_d/80)$ ; where,  $C_c$  = the average number of conidia counted in five quadrants of the Neubauer chamber, and  $F_d$  = dilution factor.

The effect of temperature on CP in SDA medium was evaluated by calculating the percentage of inhibition or increase in CP when shifting from 25 to 30 °C and from 25 to 35 °C, using the following formulas: % INH/INC =  $[(CP \text{ at } 30 \text{ °C} \times 100 / CP \text{ at } 25 \text{ °C}) - 100]$  and % INH/INC =  $[(CP \text{ at } 35 \text{ °C} \times 100 / CP \text{ at } 25 \text{ °C}) - 100]$  (Torres-de la Cruz et al., 2013).

#### **Conidial production on rice**

Thirty grams of rice were placed in a polypaper bag and moistened with 7 mL of distilled water. The bags were then sterilized at 121 °C for 20 minutes. After cooling, each bag was inoculated with 5 mL of a conidial suspension at a concentration of  $1 \times 10^7$  conidia·mL<sup>-1</sup> and incubated for 16 days at  $25 \pm 1$  °C under a 12:12 h light:dark photoperiod. Five replicates were established per isolate. At the end of the incubation period, the 30 g of rice were transferred to 150 mL of sterile distilled water containing 0.1% Tween 80. The mixture was agitated for 10 minutes and filtered through sterile medical gauze. The total number of conidia per isolate was estimated using a Neubauer hemocytometer. Conidial production per gram of rice was calculated using the same formula applied for conidial production on SDA medium (Torres-de la Cruz et al., 2013).

El efecto de la temperatura sobre la PdC en medio de cultivo SDA se evaluó a través del porcentaje de inhibición o incremento de la PdC al pasar de 25 a 30 °C y de 25 a 35 °C, los cuales se obtuvieron con la fórmula: % INH/INC =  $[(PdC \text{ a } 30 \text{ °C} \times 100 / PdC \text{ a } 25 \text{ °C}) - 100]$  y % INH/INC =  $[(PdC \text{ a } 35 \text{ °C} \times 100 / PdC \text{ a } 25 \text{ °C}) - 100]$  (Torres-de la Cruz et al., 2013).

#### **Producción de conidios en arroz**

Se utilizaron 30 g de arroz contenidos en bolsa de polipapel. El arroz se humedeció con 7 mL de agua destilada y las bolsas con el arroz se esterilizaron a 121 °C durante 20 min. Las bolsas con arroz se inocularon con 5 mL de una suspensión de  $1 \times 10^7$  conidios·mL<sup>-1</sup> y se incubaron por 16 d a  $25 \pm 1$  °C, con fotoperiodo 12:12. Cinco repeticiones por aislamiento se establecieron. Cumplido el tiempo, los 30 g de arroz se transfirieron a 150 mL de ADE + tween 80. Se agitó la suspensión durante 10 min y se filtró con gasa clínica estéril. El total de conidios por aislamiento se determinó con una cámara de Neubauer. La producción de conidios por gramo se estimó con la misma fórmula utilizada para estimar la producción de conidios en medio SDA (Torres-de la Cruz et al., 2013).

#### **Caracterización patogénica**

Adultos de *A. tripterus* se capturaron con redes pequeñas en la misma plantación de cacao donde se obtuvieron las chinches micosadas. Los ejemplares capturados se colocaron en envases de plástico con tapa de tela.

## Pathogenic characterization

Adults of *A. tripterus* were collected using small sweep nets in the same cacao plantation where the mycosed insects had previously been found. Captured insects were placed in plastic containers covered with mesh lids. As a food source, an immature *T. cacao* fruit approximately 8 cm in length was placed inside each container. The insects were then transported to the Entomopathogen Laboratory at the Academic Division of Biological Sciences, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

In the laboratory, live insects were immersed for 1 minute in a conidial suspension of  $1 \times 10^7$  conidia·mL<sup>-1</sup> + 0.1 % Tween 80. Five *Metarhizium* isolates and one control treatment were evaluated. For the control group, insects were submerged in sterile distilled water (SDW) containing 0.1 % Tween 80. Treated adults were placed in plastic containers with mesh lids. Ten *A. tripterus* adults constituted one experimental unit, with five replicates per fungal isolate. A juvenile cacao pod measuring 8 cm was placed inside each container as a food source. The treated specimens were maintained at  $25 \pm 1$  °C, and humidity was regulated using ADE-moistened cotton wads. Mortality was recorded daily, and dead insects were transferred to a humid chamber to promote sporulation. The effectiveness (EF) of each fungal isolate was determined using mortality data and the formula: % EF = [(Mtest - Mtrat) / Mtest] x 100; where Mtest and Mtrat represent mortality in the control and *Metarhizium* treatment, respectively. Mortality in the control treatment was factored into the formula.

## Statistical analysis

Data on mycelial growth, conidial production on SDA medium and rice, and pathogenicity (effectiveness) were analyzed using a completely randomized design with five treatments (isolates). Prior to analysis, mortality data were transformed using the arcsine square root of the proportion. Mycelial growth and conidial production data (on SDA and rice) were log-transformed using the formula  $\log(x + 1)$ . Subsequently, treatments were compared through ANOVA ( $P \leq 0.05$ ), followed by Tukey's multiple comparison test using SAS software, version 9.0 (SAS Institute Inc.). The time required to reach 50 and 90 % conidial germination (TG<sub>50</sub> and TG<sub>90</sub>) was estimated using Probit analysis (SAS Institute Inc.).

## Results and Discussion

### Morphological and molecular characterization

A total of five fungal isolates were obtained from *A. tripterus* adults naturally infected under field conditions: TCCH2, TCCH5, TCCH7, TCCH8, and

Como alimento, un fruto juvenil de *T. cacao* de 8 cm se colocó dentro del frasco. Las chinches se transportaron al Laboratorio de Entomopatógenos de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

En el laboratorio, los insectos vivos se sumergieron en una suspensión de  $1 \times 10^7$  conidios·mL<sup>-1</sup> + tween 80 (0.1 %) por 1 min. Cinco aislamientos de *Metarhizium* más un tratamiento testigo se evaluaron. Las chinches del tratamiento testigo se sumergieron en ADE + tween 80 (0.1 %). Los adultos tratados se depositaron en envases de plástico con tapas de tela. Diez adultos de *A. tripterus* conformaron una unidad experimental con cinco repeticiones por cepa. Como alimento, un fruto juvenil de 8 cm de *T. cacao* se colocó dentro del frasco. Los especímenes tratados se mantuvieron a  $25 \pm 1$  °C y la humedad se mantuvo con ADE en una torunda de algodón. La mortalidad se registró diariamente y los insectos muertos se colocaron en una cámara húmeda para obtener esporulación. La efectividad (EF) de cada aislamiento se determinó con los datos de mortalidad mediante la fórmula % EF = [(Mtest - Mtrat) / Mtest] x 100; donde, Mtest y Mtrat son la mortalidad en el testigo y tratamiento con *Metarhizium*, respectivamente. La mortalidad en el tratamiento testigo fue integrada en la fórmula.

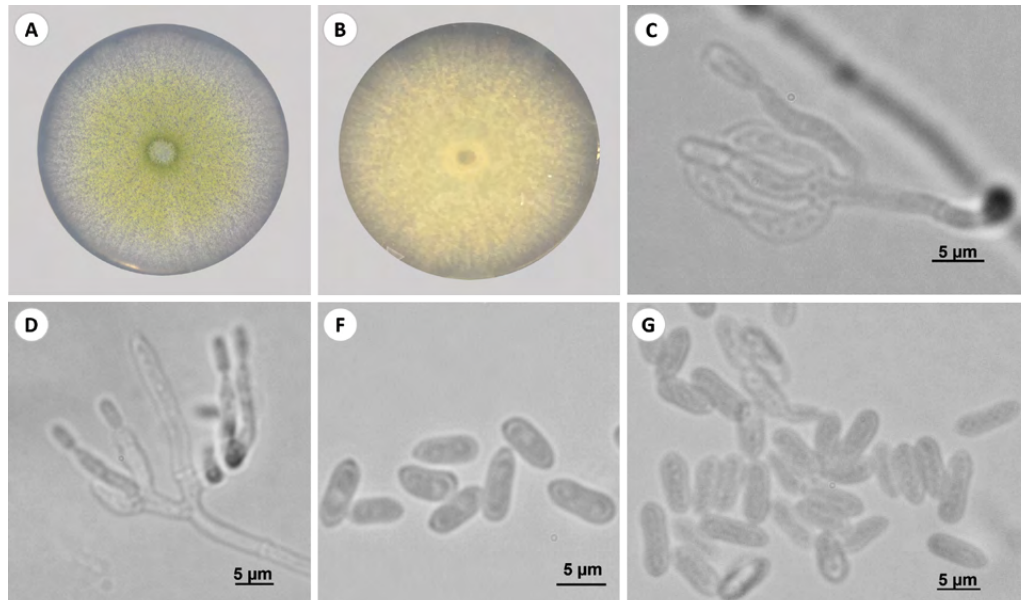
### Análisis estadístico

Los datos de crecimiento micelial, producción de conidios en medio SDA y en arroz, y de patogenicidad (efectividad) se analizaron bajo un diseño completamente al azar con cinco tratamientos (aislamientos). Antes del análisis, los datos de mortalidad se transformaron al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción. Los datos del crecimiento micelial y producción de conidios en medio SDA y en arroz se transformaron a  $\log(x + 1)$ . Posteriormente, se realizó la comparación de tratamientos mediante análisis de varianza ( $P \leq 0.05$ ) y una prueba de comparación de medias de Tukey con el programa SAS versión 9.0 (SAS Institute Inc.). El tiempo en que ocurrió el 50 y el 90 % de la germinación de conidios (TG<sub>50</sub> y TG<sub>90</sub>) se estimó mediante análisis Probit (SAS Institute Inc.).

## Resultados y discusión

### Caracterización morfológica y molecular

En total se obtuvieron cinco aislamientos fúngicos a partir de los adultos de *A. tripterus* micosados en condiciones de campo: TCCH2, TCCH5, TCCH7, TCCH8, TCCH9. La Figura 2 muestra algunas características morfológicas del hongo. Todos los aislamientos presentaron colonias circulares con superficie de aspecto plano de textura variable y de coloración blanca que se tornó de verde oliva hasta verde oscuro, debido a la maduración de los conidios (Figura 2 A-B). Los conidióforos se observaron hialinos y ramificados con fiálides solitarias, en pares o



**Figure 2. Morphology of *Metarhizium brunneum*.** A) Colony on Sabouraud Dextrose Agar supplemented with 0.1 % yeast extract (SDA + YE) after 7 days of growth, B) reverse view, C and D) conidiophores, F and G) conidia.

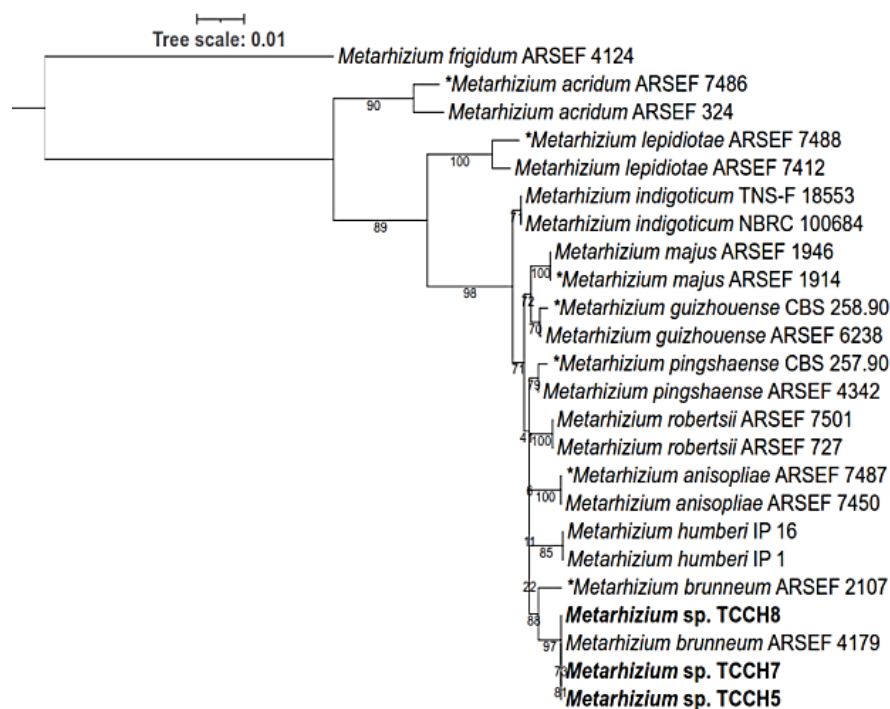
**Figura 2. Morfología de *Metarhizium brunneum*.** A) Colonia en medio Agar-Dextrosa Sabouraud + 0.1 de extracto de levadura (SDA + EL) de 7 días de crecimiento, B) reverso, C y D) conidióforos, F y G) conidios.

TCCH9. Figure 2 shows some morphological features of the fungus. All isolates formed circular colonies with a flat surface, variable texture, and initially white coloration that turned olive green to dark green as the conidia matured (Figure 2A–B). The conidiophores were hyaline and branched, bearing phialides singly, in pairs, or in whorls (Figure 2C–D). Conidia were produced in basipetal chains, cylindrical in shape, hyaline or slightly pigmented, and aggregated in olive-green masses (Figure 2E–F). These characteristics are consistent with descriptions for the genus *Metarhizium* as reported by Barnett and Hunter (1998). The conidia measured  $5\text{--}8.15 \times 2\text{--}3.08 \mu\text{m}$  (Table 2), which falls within the range described for *M. anisopliae* by Bischoff et al. (2009). However, these authors noted that five *Metarhizium* species – *M. anisopliae*, *M. brunneum* Petch, *M. lepidiotae* (Driver & Milner) J. F. Bisch., S. A. Rehner & Humber, *M. pingshaense* Q. T. Chen & H. L. Guo, and *M. robertsii* J. F. Bisch., S. A. Rehner & Humber – overlap in conidial size and morphology. Therefore, species-level identification cannot be reliably determined based on conidial morphology alone.

Isolates TCCH5, TCCH7, and TCCH8 were identified through sequencing of ITS and  $\beta$ -tubulin. The sequences for these isolates were deposited in GenBank: TCCH5 (accession number: PP948902), TCCH7 (accession numbers: PP938692 and PP948903), and TCCH8 (accession number: PP938693). The phylogenetic tree constructed with sequences from the three *Metarhizium* isolates and additional *Metarhizium* species sequences retrieved from GenBank is shown in

en verticilos (Figura 2 C-D). Los conidios se produjeron en cadenas basipétalas, cilíndricos, hialinos o ligeramente pigmentados, en masas de color verde olivo (Figura 2 E-F). Lo anterior coincidió con los señalamientos de Barnett y Hunter (1998) para el género *Metarhizium*. Los conidios midieron  $5\text{--}8.15 \times 2\text{--}3.08 \mu\text{m}$  (Cuadro 2), lo cual coincidió con la especie *M. anisopliae* estudiada por Bischoff et al. (2009); sin embargo, estos autores encontraron que cinco especies de *Metarhizium* se superponen en tamaño y forma: *M. anisopliae*, *M. brunneum* Petch, *M. lepidiotae* (Driver & Milner) J. F. Bisch., S. A. Rehner & Humber, *M. pingshaense* Q. T. Chen & H. L. Guo y *M. robertsii* J. F. Bisch., S. A. Rehner & Humber. Por lo tanto, no es posible distinguir la identidad específica con base solo en la morfología de los conidios.

Los aislamientos TCCH5, TCCH7 y TCCH8 se identificaron mediante secuenciación de ITS y  $\beta$ -tubulina. Las secuencias de estos aislamientos se registraron en el GenBank: TCCH5 (número de acceso: PP948902), TCCH7 (número de acceso: PP938692 y PP948903) y TCCH8 (número de acceso: PP938693). El árbol filogenético con las secuencias de los tres aislamientos de *Metarhizium* y otras secuencias de especies de *Metarhizium* obtenidas del GenBank se muestran en la Figura 3. El análisis *bootstrap* mostró ramas principales que separaron significativamente las secuencias de las especies utilizadas. Con base en los valores significativos de *bootstrap*, las secuencias de tres aislamientos nativos de *Metarhizium*, del presente estudio, se agruparon en un solo clado con la especie tipo y especies de referencia de *M. brunneum*, con un soporte *bootstrap* del 88 %. La especie *M. brunneum* ha sido identificada también



**Figure 3.** Maximum likelihood phylogenetic analysis of concatenated ITS and  $\beta$ -tubulin sequences from *Metarhizium* spp., based on the TIM2 + G model (Transition model with unequal base frequencies and discrete gamma distribution). Type strains of entomopathogenic fungi are marked with an asterisk. Isolates TCCH5, TCCH7, and TCCH8 clustered with *M. brunneum* reference sequences, supported by a high bootstrap value of 88 %.

**Figura 3.** Análisis filogenético de máxima verosimilitud de secuencias concatenadas (ITS y  $\beta$ -tubulina) de especies de *Metarhizium* spp., con base en el modelo (TIM2 + G: Transition model and unequal base freq + Discrete gamma model). Las especies tipo de hongos entomopatógenos están marcados con asterisco. Los aislados TCCH5, TCCH7 y TCCH8 se agrupan con especies de *M. brunneum* con un alto porcentaje de soporte de 88 %.

Figure 3. The bootstrap analysis revealed well-supported main branches that clearly separated the sequences of the species used. Based on significant bootstrap values, the sequences from the three native *Metarhizium* isolates in this study grouped into a single clade with the type and reference strains of *M. brunneum*, with a bootstrap support of 88 %. The species *M. brunneum* has also been reported in other countries and from insect hosts across various orders, including Coleoptera, Diptera, Isoptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Orthoptera, and Hemiptera (Bischoff et al., 2009). Within Hemiptera, *M. brunneum* has been reported on the stink bug *Euschistus heros* (Pentatomidae) (Resquín-Romero et al., 2020), the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) (Yousef et al., 2013), and the wireworm *Agriotes* spp. (Razinger et al., 2018). This is the first report of *M. brunneum* infecting *A. tripterus* (Pentatomidae).

## Physiological characterization

### Mycelial growth

Table 1 shows the results of mycelial growth for the fungal isolates at the three tested temperatures. At

en otros países y en insectos hospederos de varias órdenes: Coleoptera, Diptera, Isoptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Orthoptera y Hemiptera (Bischoff et al., 2009). En el orden Hemiptera, *M. brunneum* ha sido reportado sobre la chinche *Euschistus heros* (Pentatomidae) (Resquín-Romero et al., 2020), la mosca *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) (Yousef et al., 2013) y el escarabajo *Agriotes* spp. (Razinger et al., 2018). Este es el primer reporte de *M. brunneum* sobre *A. tripterus* (Pentatomidae).

## Caracterización fisiológica

### Crecimiento micelial

El Cuadro 1 muestra los resultados del crecimiento micelial de los aislamientos en las tres temperaturas de evaluación. A 25 °C se registraron diferencias significativas ( $P < 0.0085$ ); los aislamientos con mayor crecimiento micelial fueron TCCH8 (17.27 mm) y TCCH9 (17.21 mm) y el aislamiento con menor crecimiento fue TCCH5 con 16.32 mm, sin diferencias con los aislamientos TCCH7 y TCCH2. A 30 °C, el rango de crecimiento fue de 5.17 a 5.81 mm. A esta temperatura, el crecimiento no mostró variación significativa entre

**Table 1. Physiological characterization of native strains of *Metarhizium brunneum* isolated from adults of *Antiteuchus tripterus* in a cacao agroecosystem in Tabasco, Mexico.****Cuadro 1. Caracterización fisiológica de cepas nativas de *Metarhizium brunneum*, obtenidas de adultos de *Antiteuchus tripterus* en el agroecosistema de cacao en Tabasco, México.**

Strains/ Cepas	Mycelial growth (mm)/ Crecimiento micelial (mm)			Inhibition (-) or increase (+) (%)/ Inhibición (-) o Incremento (+) (%)	
	25 °C	30 °C	35 °C	25-30 °C	25-35 °C
TCCH2	16.46 ± 0.24 ab	5.81 ± 0.77 a	0	-64.70	-100
TCCH5	16.32 ± 0.30 b	5.42 ± 0.44 a	0	-66.79	-100
TCCH7	16.75 ± 0.49 ab	5.17 ± 0.19 a	0	-69.13	-100
TCCH8	17.27 ± 0.69 a	5.33 ± 0.17 a	0	-69.14	-100
TCCH9	17.21 ± 0.35 a	5.80 ± 0.34 a	0	-66.30	-100

Means (± standard deviation) followed by different letters in a column are statistically different according to Tukey's test ( $P < 0.05$ )

Medias (± desviación estándar) con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

25 °C, significant differences were observed among isolates ( $P < 0.0085$ ); the highest mycelial growth was recorded for isolates TCCH8 (17.27 mm) and TCCH9 (17.21 mm), while TCCH5 showed the lowest growth (16.32 mm), although it was not significantly different from TCCH7 and TCCH2. At 30 °C, growth ranged from 5.17 to 5.81 mm, and no significant differences were observed among isolates ( $P < 0.1044$ ). However, all isolates showed a marked reduction in growth, with decreases ranging from 64.7 % to 69.1 % compared to their growth at 25 °C. These findings differ from those reported by Torres-de la Cruz et al. (2013), who found growth inhibition ranging from 0 to 27 % in native isolates of *M. anisopliae* under similar conditions. At 35 °C, mycelial growth was completely inhibited (100 %) for all isolates. In contrast, Torres-de la Cruz et al. (2013) reported inhibition levels between 74.1 % and 86.3 % for *M. anisopliae* at the same temperature. Based on these results, the optimal temperature range for mycelial growth of the native *M. brunneum* isolates was between 25 and 30 °C, consistent with previous reports for *M. anisopliae* (Torres-de la Cruz et al., 2013). Similarly, Ortiz-Catón et al. (2011) noted that the optimal development of entomopathogenic fungi typically occurs between 20 and 28 °C. The thermal performance of *M. brunneum* in this study may be attributed to the tropical origin of the isolates. Moreover, Gebremariam et al. (2021) emphasized the importance of mycelial growth as a key criterion in selecting promising isolates for biological control applications.

#### Germination rate

According to Table 2, variability was observed in the germination rate of *M. brunneum*, both among isolates and temperatures. At 25 °C, the isolates with the highest and lowest  $TG_{50}$  were TCCH2 (8.8 h) and TCCH9 (7.8 h), respectively. These results are similar to those reported by Torres-de la Cruz et al. (2013),

aislamientos ( $P < 0.1044$ ); sin embargo, todas las cepas mostraron disminución que fluctuó de 64.7 % a 69.1 %, al pasar de 25 a 30 °C. Los resultados difieren con lo señalado por Torres-de la Cruz et al. (2013), quienes reportaron inhibición de 0 al 27 % en aislamientos nativos de *M. anisopliae*. Cuando los aislamientos se incubaron a 35 °C, la inhibición del crecimiento micelial fue 100 %; en el estudio de Torres-de la Cruz et al. (2013), la inhibición de *M. anisopliae* varió de 74.1 % hasta 86.3 %. Así, el rango de temperatura para el crecimiento de las cepas nativas de *M. brunneum* fue de 25 a 30 °C, en concordancia con lo reportado para *M. anisopliae* por Torres-de la Cruz et al. (2013). Al respecto, Ortiz-Catón et al. (2011) mencionan que el mejor desarrollo de los hongos entomopatógenos se obtiene de 20 a 28 °C; el desarrollo de *M. brunneum* en este estudio puede ser explicado por el origen tropical de estas cepas. Por otro lado, Gebremariam et al. (2021) resaltan la importancia del crecimiento micelial como una variable que permite la selección de aislamientos promisorios como agentes de biocontrol.

#### Velocidad de germinación

De acuerdo con el Cuadro 2, se observó variabilidad en la velocidad de germinación de *M. brunneum*, tanto entre aislamientos como entre temperaturas. A 25 °C, los aislamientos con el mayor y menor  $TG_{50}$  fueron TCCH2 (8.8 h) y TCCH9 (7.8 h). Estos resultados son similares a los de Torres-de la Cruz et al. (2013), quienes reportaron  $TG_{50}$  de 7.4 a 8.2 h para aislamientos nativos de *M. anisopliae*, incubados a 25 °C. Sin embargo, el  $TG_{50}$  reportado para *M. brunneum* en el presente estudio es menor que el reportado para aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* (12.6 a 15.9 h) por Gerónimo-Torres et al. (2016). A 30 °C, el mayor  $TG_{50}$  corresponde a la cepa TCCH5, con 9.5 h y la cepa con el menor  $TG_{50}$  fue TCCH2 con 7.8 h, la cual redujo su tiempo de germinación, respecto al  $TG_{50}$  obtenido a 25 °C. Cuando el  $TG_{50}$  se evaluó a 35 °C, todas las cepas incrementaron

**Table 2. Germination time and range of variation (RV) of 50 % of the conidia (TG<sub>50</sub>) of *Metarhizium brunneum* at 25, 30, and 35 °C.****Cuadro 2. Tiempo de germinación y rango de variación (RV) del 50 % de los conidios (TG<sub>50</sub>) de *Metarhizium brunneum* a 25, 30 y 35 °C.**

Strains/ Cepas	25 °C		30 °C		35 °C	
	Average (h)/ Media (h)	RV	Average (h)/ Media (h)	RV	Average (h)/ Media (h)	RV
TCCH2	8.8	8.6-9.1	7.8	7.8-8.0	21.9	18.6-38.5
TCCH5	8.3	8.1-8.6	9.5	9.3-9.7	12.7	12.7-12.9
TCCH7	8.2	8.1-8.3	8.6	8.5-8.9	13.8	13.7-13.9
TCCH8	8.5	8.2-8.8	8.5	8.3-8.7	14.1	13.9-14.4
TCCH9	7.8	7.5-8.1	8.0	7.9-8.1	15.0	14.8-15.3

who documented TG<sub>50</sub> values ranging from 7.4 to 8.2 h for native isolates of *M. anisopliae* incubated at 25 °C. However, the TG<sub>50</sub> values reported for *M. brunneum* in the present study are lower than those reported for native isolates of *Beauveria bassiana* (12.6 to 15.9 h) by Gerónimo-Torres et al. (2016). At 30 °C, the highest TG<sub>50</sub> was observed in strain TCCH5, with 9.5 h, while the lowest TG<sub>50</sub> was recorded for strain TCCH2, with 7.8 h. Notably, TCCH2 showed a reduced germination time compared to TG<sub>50</sub> at 25 °C. When TG<sub>50</sub> was assessed at 35 °C, all strains showed an increase in germination time, similar to that reported by Torres-de la Cruz et al. (2013) for *M. anisopliae*. At this temperature, the strain with the highest TG<sub>50</sub> was TCCH2, with 21.9 h, while strains TCCH5, TCCH7, and TCCH8 had the lowest TG<sub>50</sub> values.

Regarding TG<sub>90</sub>, at 25 °C, the strain with the longest germination time was TCCH8 (10.9 h), while the strain with the shortest time was TCCH9 (9.6 h) (Table 3). At 30 °C, the strains with the highest and lowest TG<sub>90</sub> were TCCH5 and TCCH2, with 12.3 h and 9.5 h, respectively. Similarly, at 35 °C, these two strains maintained the highest and lowest TG<sub>90</sub> values, with 27.7 h and 14.6 h, respectively. At this temperature, all strains showed an increased germination time compared to TG<sub>90</sub> at 30 °C; however, strains TCCH5, TCCH7, and TCCH8 showed the lowest TG<sub>90</sub> values. Although all *M. brunneum* isolates germinated at 25 and 35 °C, the optimal temperature range for conidial germination in these strains is between 25 and 30 °C (Tables 2 and 3). According to Faria et al. (2015), germination speed is also a relevant factor in the selection of efficient strains for use as biological control agents.

#### Conidial production on SDA + YE medium

According to Table 4, at 25 °C, no significant differences were observed ( $P < 0.3340$ ) in conidial production on SDA + YE medium. However, the isolates with the highest production were TCCH2 and TCCH9, with  $9.7 \times 10^7$  and  $9.0 \times 10^7$  conidia·mL<sup>-1</sup>, respectively. These levels of conidial production are similar to those reported by

su tiempo de germinación, similar a lo reportado por Torres-de la Cruz et al. (2013) para *M. anisopliae*. La cepa con el mayor TG<sub>50</sub> fue TCCH2 con 21.9 h y las cepas con menor TG<sub>50</sub> fueron TCCH5, TCCH7 y TCCH8.

Con respecto al TG<sub>90</sub>, a 25 °C, la cepa con el mayor tiempo fue TCCH8 con 10.9 h y la cepa con menor tiempo fue TCCH9 con 9.6 h (Cuadro 3). A 30 °C, las cepas con mayor y menor TG<sub>90</sub> fueron TCCH5 y TCCH2 con 12.3 y 9.5 h, respectivamente. Asimismo, a 35°, estas dos cepas mantuvieron el mayor y menor TG<sub>90</sub>, con 27.7 y 14.6 h, respectivamente. A esta temperatura todas incrementaron su tiempo de germinación respecto al TG<sub>90</sub> obtenido a 30 °C; no obstante, las cepas TCCH5, TCCH7 y TCCH8 mostraron los menores TG<sub>90</sub>. Aunque todos los aislamientos de *M. brunneum* germinaron a 25 y 35 °C, el rango de temperatura óptimo para la germinación de conidios de estas cepas es de 25 a 30 °C (Cuadros 2 y 3). De acuerdo con Faria et al. (2015), la velocidad de germinación también es un factor relevante para la selección de cepas eficientes como agentes de control biológico.

#### Producción de conidios en medio SDA + EL

Acorde con el Cuadro 4, a 25 °C, no hubo diferencias significativas ( $P < 0.3340$ ) en la producción de conidios en medio SDA + EL; sin embargo, los aislamientos con mayor producción fueron TCCH2 y TCCH9 con  $9.7 \times 10^7$  y  $9.0 \times 10^7$  conidios·mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Esta producción de conidios es similar a la reportada por Valle-Ramírez et al. (2022) para aislamientos de *Metarhizium* spp. A 30 °C se presentaron diferencias significativas entre aislamientos ( $P < 0.0008$ ); las cepas con mayor producción de conidios fueron TCCH8 y TCCH9 con  $1.5 \times 10^7$  y  $7.5 \times 10^6$  conidios·mL<sup>-1</sup>, respectivamente, y la de menor producción fue TCCH7 con  $3.7 \times 10^6$  conidios·mL<sup>-1</sup> (Cuadro 4). A esta temperatura, la producción de conidios en medio SDA + EL disminuyó en el rango de 76.2 al 94.7 % con relación a la obtenida a 25 °C, donde la cepa menos afectada por la temperatura fue TCCH8. Los aislamientos que se sometieron a 35 °C no presentaron crecimiento micelial ni producción

**Table 3. Germination time and range of variation (RV) for 90 % of conidial (TG<sub>90</sub>) of *Metarhizium brunneum* at 25, 30, and 35 °C.****Cuadro 3. Tiempo de germinación y rango de variación (RV) del 90 % de los conidios (TG<sub>90</sub>) de *Metarhizium brunneum* a 25, 30 y 35 °C.**

Strains/ Cepas	25 °C		30 °C		35 °C	
	Average (h)/ Media (h)	RV	Average (h)/ Media (h)	RV	Average (h)/ Media (h)	RV
TCCH2	10.7	10.3-11.4	9.5	9.3-9.7	27.7	21.6-64.6
TCCH5	10.5	10.0-11.3	12.3	11.8-12.9	14.6	14.4-14.8
TCCH7	9.7	9.6-9.9	10.9	10.5-11.6	15.6	15.4-15.9
TCCH8	10.9	10.3-12.1	10.9	10.4-11.5	16.1	15.7-16.7
TCCH9	9.6	9.1-10.3	10.0	9.8-10.3	17.4	16.9-18.1

**Table 4. Conidial production of *Metarhizium brunneum* isolates cultivated on rice and Sabouraud Dextrose Agar medium supplemented with 0.1 % yeast extract.****Cuadro 4. Producción de conidios de aislamientos de *Metarhizium brunneum* cultivados en arroz y medio Agar-Dextrosa Sabouraud + 0.1 de extracto de levadura.**

Strains/ Cepas	Rice (25 °C)	SDA + YE (25 °C)	SDA + YE 30 °C	Inhibition (-)/Increase (+) (%) / Inhibición (-)/Incremento (+) (%)	
	(conidia·g <sup>-1</sup> ) / Arroz (25 °C)	(conidia·g <sup>-1</sup> ) / SDA + EL (25 °C)	(conidia·g <sup>-1</sup> ) / SDA + EL 30 °C	25-30 °C	25-35 °C
	(conidios·g <sup>-1</sup> )	(conidios·g <sup>-1</sup> )	(conidios·g <sup>-1</sup> )		
TCCH2	1.98 x 10 <sup>8</sup> ± 1.6 x 10 <sup>3</sup> b	9.7 x 10 <sup>7</sup> ± 2.0 x 10 <sup>3</sup> a	5.1 x 10 <sup>6</sup> ± 1.3 x 10 <sup>3</sup> bc	-94.7	-100
TCCH5	2.03 x 10 <sup>8</sup> ± 2.0 x 10 <sup>3</sup> a	8.5 x 10 <sup>7</sup> ± 2.3 x 10 <sup>3</sup> a	4.9 x 10 <sup>6</sup> ± 7.1 x 10 <sup>3</sup> bc	-94.2	-100
TCCH7	2.04 x 10 <sup>8</sup> ± 1.6 x 10 <sup>3</sup> a	8.4 x 10 <sup>7</sup> ± 3.0 x 10 <sup>3</sup> a	3.7 x 10 <sup>6</sup> ± 1.4 x 10 <sup>3</sup> c	-95.5	-100
TCCH8	2.01 x 10 <sup>8</sup> ± 1.3 x 10 <sup>3</sup> ab	6.4 x 10 <sup>7</sup> ± 1.4 x 10 <sup>3</sup> a	1.5 x 10 <sup>7</sup> ± 3.3 x 10 <sup>3</sup> a	-76.2	-100
TCCH9	1.96 x 10 <sup>8</sup> ± 5.6 x 10 <sup>3</sup> c	9.0 x 10 <sup>7</sup> ± 3.6 x 10 <sup>3</sup> a	7.5 x 10 <sup>6</sup> ± 1.2 x 10 <sup>3</sup> ab	-91.6	-100

Means (± standard deviation) followed by different letters in a column are statistically different according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ). SDA + YE = Sabouraud Dextrose Agar + 0.1 % yeast extract.

Medias (± desviación estándar) con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). SDA + EL = agar-dextrosa Sabouraud + 0.1 % de extracto de levadura.

Valle-Ramírez et al. (2022) for *Metarhizium* spp. isolates. At 30 °C, significant differences were observed among isolates ( $P < 0.0008$ ); the strains with the highest conidial production were TCCH8 and TCCH9, with  $1.5 \times 10^7$  and  $7.5 \times 10^6$  conidia·mL<sup>-1</sup>, respectively, while the lowest production was recorded for TCCH7, with  $3.7 \times 10^6$  conidia·mL<sup>-1</sup> (Table 4). At this temperature, conidial production on SDA + YE medium decreased by 76.2 % to 94.7 % compared to the levels observed at 25 °C, with strain TCCH8 being the least affected by temperature. Isolates incubated at 35 °C showed neither mycelial growth nor conidial production. Gerónimo-Torres et al. (2016) reported a reduction in conidial production in native isolates of *B. bassiana* when incubated from 25 to 30 °C, and also observed no mycelial growth or conidial production at 35 °C. Therefore, the effective temperature range for sporulation in native *M. brunneum* strains was 25 to 30 °C; however, the optimal temperature was 25 °C.

#### Conidial production on rice

Conidial production on rice varied significantly among isolates ( $p < 0.0004$ ) (Table 4). The strains that showed the highest conidial production were TCCH5,

de conidios. Al respecto, Gerónimo-Torres et al. (2016) también registraron reducción en la producción de conidios en aislamientos nativos de *B. bassiana*, al pasar de 25 a 30 °C, y tampoco observaron crecimiento micelial ni producción de conidios a 35 °C. Por lo anterior, el rango de temperatura para la esporulación de cepas nativas de *M. brunneum* fue de 25 a 30 °C; sin embargo, la temperatura óptima fue 25 °C.

#### Producción de conidios en arroz

La producción de conidios en arroz varió significativamente ( $p < 0.0004$ ) entre los aislamientos (Cuadro 4). Las cepas que mostraron mayor producción fueron TCCH5, TCCH7 y TCCH8 con  $2.03 \times 10^8$ ,  $2.04 \times 10^8$  y  $2.01 \times 10^8$  conidios·g<sup>-1</sup> de arroz, respectivamente. El aislamiento con menor producción fue TCCH9 con  $1.96 \times 10^8$  conidios·g<sup>-1</sup>. De acuerdo con García-Ortiz et al. (2015), la producción de conidios es un factor relevante para el éxito del control biológico con hongos entomopatógenos. Por otro lado, las cepas que presentaron mayor producción de conidios en arroz no coincidieron con las de mayor producción en medio SDA + EL. De acuerdo con Cova et al. (2009), el arroz es

TCCH7, and TCCH8, with  $2.03 \times 10^8$ ,  $2.04 \times 10^8$ , and  $2.01 \times 10^8$  conidia·g<sup>-1</sup> of rice, respectively. The isolate with the lowest production was TCCH9, with  $1.96 \times 10^8$  conidia·g<sup>-1</sup>. According to García-Ortiz et al. (2015), conidial production is a critical factor for the success of biological control using entomopathogenic fungi. The strains that exhibited the highest conidial production on rice did not correspond with those that showed the highest production on SDA + YE medium. As noted by Cova et al. (2009), rice is the most commonly used substrate for the mass production of entomopathogenic fungi at the commercial level.

### Pathogenic characterization

Figure 4 shows that all *M. brunneum* isolates exhibited pathogenicity toward *A. tripterus*, with significant differences ( $P < 0.0053$ ) in effectiveness. The isolates that caused the highest mortality rates were TCCH5, TCCH7, and TCCH8, with no significant differences between them. However, the highest mortality rates were observed in TCCH5 and TCCH8, with values of 96.4 % and 89.7 %, respectively, at 8 days post-inoculation. The isolate that caused the lowest mortality was TCCH2, with 72.2 %. These results are consistent with those of Resquín-Romero et al. (2020), who evaluated *M. brunneum* isolates on the stink bug *Euschistus heros* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae);

el sustrato más empleado para la reproducción hongos entomopatógenos a nivel comercial.

### Caracterización patogénica

La Figura 4 muestra que todos los aislamientos de *M. brunneum* mostraron patogenicidad sobre *A. tripterus* con diferencias significativas ( $P < 0.0053$ ) en la efectividad. Los aislamientos que ocasionaron el mayor porcentaje de mortalidad fueron TCCH5, TCCH7 y TCCH8 sin diferencias significativas entre ellos; sin embargo, los valores más altos de mortalidad se obtuvieron con los aislamientos TCCH5 y TCCH8, con valores de 96.4 y 89.7 %, a los 8 d después de la inoculación. El aislamiento que causó la menor mortalidad fue TCCH2 con 72.2 %. Estos resultados concuerdan con Resquín-Romero et al. (2020), quienes evaluaron aislamientos de *M. brunneum* sobre la chinche *Euschistus heros* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae); estos autores reportaron mortalidad de 83.3 a 100 % sobre ninfas y adultos, a los 8 d después de la inoculación por inmersión. Otros aislamientos de *M. brunneum* también han causado mortalidad sobre especies de insectos como *Bactrocera oleae* Rossi (Diptera: Tephritidae) (60 % de mortalidad a los 9 d) y *Agriotes* spp. (44.2 % de mortalidad a los 45 d) (Razinger et al., 2018; Yousef et al., 2013). Por otro lado, aislamientos de *M. anisopliae* también han mostrado efectividad de 100 % sobre las

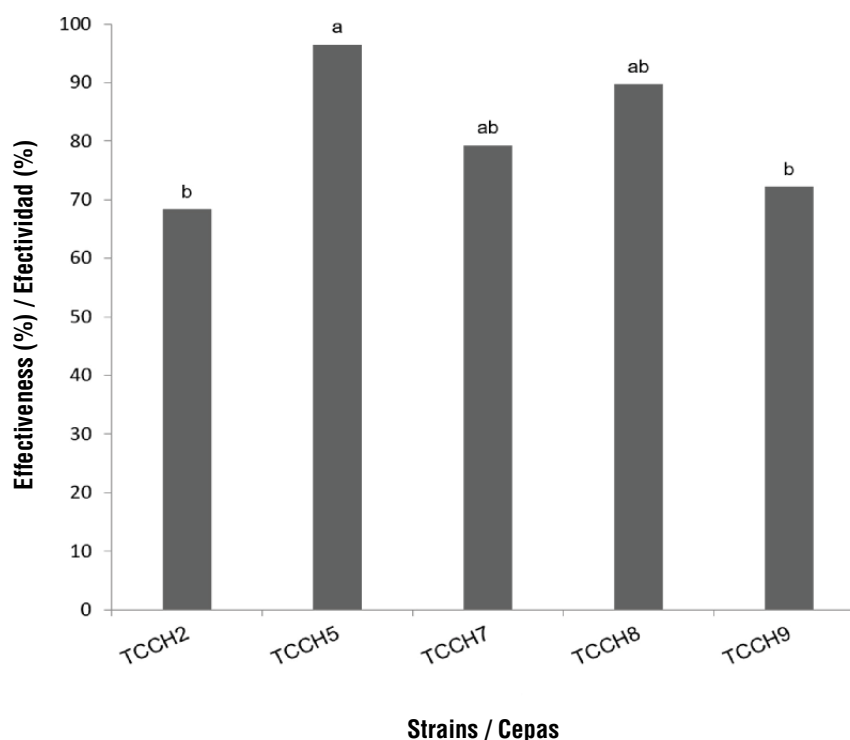


Figure 4. Effectiveness of native *Metarhizium brunneum* isolates against *Antiteuchus tripterus* adults. Bars followed by different letters in a column are statistically different according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

Figura 4. Efectividad de los aislamientos nativos de *Metarhizium brunneum* sobre adultos *Antiteuchus tripterus*. Barras con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

these authors reported mortality rates ranging from 83.3 to 100 % in nymphs and adults at 8 days post-inoculation by immersion. Other *M. brunneum* isolates have also caused mortality in insect species such as *Bactrocera oleae* Rossi (Diptera: Tephritidae) (60 % mortality at 9 days) and *Agriotes* spp. (44.2 % mortality at 45 days) (Razinger et al., 2018; Yousef et al., 2013). Additionally, *M. anisopliae* isolates have shown 100 % effectiveness on the stink bugs *Nezara viridula* L. in a period of 8 to 10 days (Abdel-Raheem et al., 2011) and *Dichelops melacanthus* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae) (Groth et al., 2017).

According to Barrios et al. (2016), the selection of the most promising isolates is essential for obtaining entomopathogenic fungi suitable for development as biopesticides capable of exerting effective regulation of the target pest. To this end, various characteristics of the isolates have been considered, including virulence, inoculum production, growth, sporulation, and tolerance to adverse environmental conditions (García-Ortiz et al., 2015). Based on these criteria, the most promising isolates in this study were TCCH5 and TCCH8. Other studies have also demonstrated the effectiveness of native entomopathogenic fungal isolates against pest species (Clifton et al., 2019; Hernández-Trejo et al., 2019).

## Conclusions

The species *Metarhizium brunneum* was identified as an agent associated with the mortality of the black stink bug *Antiteuchus tripterus* in cacao plantations in Tabasco, Mexico. The *M. brunneum* strains exhibited variability in mycelial growth, germination time, conidial production, and pathogenicity. All fungal isolates showed pathogenicity against *A. tripterus* under laboratory conditions, with effectiveness ranging from 72 to 96 %. The native isolates of *M. brunneum* showed a favorable temperature range of 25 to 30 °C. Based on the evaluated characteristics, isolates TCCH5 and TCCH8 are the most promising as biological control agents for *A. tripterus*. This study reports, for the first time, the pathogenicity of *M. brunneum* against *A. tripterus*, contributing to the understanding of entomopathogenic fungal diversity. Field studies are necessary to evaluate the performance of the selected isolates under natural conditions.

## Declaration of conflicts of interest

The authors declare that they have no economic conflicts of interest or known personal relationships that could have influenced the research presented in this article.

chinchas *Nezara viridula* L. en un periodo de 8 a 10 d (Abdel-Raheem et al., 2011) y *Dichelops melacanthus* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae) (Groth et al., 2017).

De acuerdo con Barrios et al. (2016), para la obtención de hongos entomopatógenos útiles como bioplaguicidas es necesaria la selección de las cepas más promisorias que puedan ejercer una regulación importante de la plaga de interés. Para ello, diversos atributos de los aislamientos han sido considerados, tales como la virulencia, la producción de inóculo, el crecimiento, la esporulación y la tolerancia a condiciones ambientales adversas (García-Ortiz et al., 2015). Con base en lo anterior, en esta investigación, los aislamientos más promisorios fueron TCCH5 y TCCH8. Otros estudios también han demostrado la eficiencia de aislados nativos de hongos entomopatógenos sobre plagas (Clifton et al., 2019; Hernández-Trejo et al., 2019).

## Conclusiones

La especie *Metarhizium brunneum* se identificó como agente asociado a la muerte de la chinche negra *Antiteuchus tripterus* en plantaciones de cacao de Tabasco, México. Las cepas de *M. brunneum* presentaron variabilidad en el crecimiento micelial, tiempo de germinación, producción de conidios y patogenicidad. Todos los aislamientos fúngicos mostraron patogenicidad sobre *A. tripterus* en condiciones de laboratorio, con efectividad del 72 al 96 %. Los aislamientos nativos de *M. brunneum* presentaron un rango de temperatura favorable de 25 a 30 °C. Con base en las características evaluadas, los aislamientos TCCH5 y TCCH8 son los más promisorios como agentes de control biológico de *A. tripterus*. En esta investigación se reporta por primera vez la patogenicidad de *M. brunneum* sobre *A. tripterus* y se aporta al conocimiento de la diversidad de hongos entomopatógenos. Estudios bajo condiciones de campo deberán realizarse para la evaluación de los aislamientos seleccionados.

## Declaración de conflictos de intereses

Los autores declaramos que no tenemos conflictos de intereses económicos ni relaciones personales conocidas que pudieran haber influido en la investigación presentada en este artículo.

End of English version

Fin de la versión en español

## References / Referencias

- Abdel-Raheem, M. A., Ragab, A., & Abdel-Rhman, I. E. (2011). Effect of entomopathogenic fungi on the green stink bug, *Nezara viridula* L. in sugar-beet in Egypt. *Bulletin of the National Research Council*, 36(2), 145 – 152. <https://acortar.link/bJMLLI>
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.
- Barrios, C. E., Bustillo, A. E., Ocampo, K. L., Angel Reina, M., & Lorena Alvarado, H. (2016). Eficacia de hongos entomopatógenos en el control de *Leptopharsa gibbicarina* (Hemiptera: Tingidae) en palma de aceite. *Revista Colombiana de Entomología*, 42(1), 22 – 27. <https://doi.org/10.25100/socolen.v42i1.6665>
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A., & Humber, R. A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4), 512-530. <https://doi.org/10.3852/07-202>
- Castillo-Carrillo, P. S., Sernaqué-Cortez, A., & Purizaga-Preciado J. L. (2020). Registro del chinche del cacao *Antiteuchus tripterus* (Fabricius, 1787) (Hemiptera: Pentatomidae), en Tumbes, Perú. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural del Paraguay*, 24(1), 15-20. [https://www.mades.gov.py/wp-content/uploads/2020/03/24115-20\\_2020325\\_Castillo\\_Antiteuchus.pdf](https://www.mades.gov.py/wp-content/uploads/2020/03/24115-20_2020325_Castillo_Antiteuchus.pdf)
- Clifton, E. H., Cortell, J., Ye, L., Rachman, T., & Hajek, A. E. (2019). Impacts of *Metarhizium brunneum* F52 infection on the flight performance of Asian longhorned beetles, *Anoplophora glabripennis*. *PLoS ONE*, 14(9), e0221997. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221997>
- Cova, L. J., Scorza, J. V., García, D. E., Cañizález, L. M., Guedez, C. D. C., Maffey, M., & Medina, M. G. (2009). Patogenicidad *in vitro* de *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch en *Musca domestica* (L.) como posible estrategia de control biológico en áreas ganaderas. *Zootecnia Tropical*, 27(2), 113 – 120. [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-72692009000200002](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692009000200002)
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing. *Nature Methods*, 9, 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Faria, M., Lopes, R. B., Souza, D. A., & Wraight, S. P. (2015). Conidial vigor vs. viability as predictors of virulence of entomopathogenic fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 125(1), 68 – 72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.012>
- García-Ortiz, N., Tlecuil-Beristain, S., Favela-Torres, E., & Loera, O. (2015). Production and quality of conidia by *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*: critical oxygen level and period of mycelium competence. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(1), 2783 – 2791. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6225-2>
- Gebremariam, A., Chekol, Y., & Assefa, F. (2021). Phenotypic, molecular, and virulence characterization of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Balsam) Vuillemin, and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin from soil samples of Ethiopia for the development of mycoinsecticide. *Heliyon*, 7(5), e07091. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07091>
- Gerónimo-Torres, J. D. C., Torres-de la Cruz, M., Pérez-de la Cruz, M., de la Cruz-Pérez, A., Ortiz-García, C. F., & Cappello-García, S. (2016). Caracterización de aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* y su patogenicidad hacia *Hypothenemus hampei*, en Tabasco, México. *Revista Colombiana de Entomología*, 42(1), 28 – 35. <https://doi.org/10.25100/socolen.v42i1.6666>
- Gouy, M., Guindon, S., & Gascuel O. (2010). SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, 27, 221 – 224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Groth, M. Z., Bellé, C., Zimmer, G., Groth, M. Z., Edu-Kaspary, T., Pimentel, J. R., Zimmer, P. D. (2017). Control of wheat stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) in southern Brazil using the fungus '*Metarhizium anisopliae*'. *Australian Journal of Crop Science*, 11, 360 – 366. <https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.03.pne219>
- Hernández-Trejo, A., Estrada-Drouaillet, B., López-Santillan, J. A., Rios-Velasco, C., Rodríguez-Herrera, R., & Osorio-Hernández, E. (2019). Effects of native entomopathogenic fungal strains and neem extract on *Spodoptera frugiperda* on maize. *Southwestern Entomologist*, 44(1), 117-124. <https://doi.org/10.3958/059.044.0113>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Letunic, I., Khedkar, S., & Bork, P. (2021). SMART: recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic Acids Research*, 49, 458 – 460. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa937>
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution*, 37, 1530 – 1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Ortiz-Catón, M., Alatorre-Rosas, R., Valdivia-Bernal, R., Ortiz-Catón, A., Medina-Torres, R., & Alejo-Santiago, G. (2011). Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre el desarrollo de los hongos entomopatógenos. *Revista Biociencias*, 1(2), 42 – 53. <https://doi.org/10.15741/revbio.01.02.05>
- Pu, J., & Chung, H. (2024). New and emerging mechanisms of insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science*, 63, 101184. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2024.101184>
- Razinger, J., Schroers, H. J., & Urek, G. (2018). Virulence of *Metarhizium brunneum* to field collected *Agrotis* spp. wireworms. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 20(2), 309 – 320. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20183349173>
- Resquin-Romero, G., Cabral-Antunez, C., Sarubbi-Orue, H., Garrido-Jurado, I., Valverde-García, P., Schade, M., & Butt, T. M. (2020). Virulencia de las cepas *Metarhizium brunneum* (Ascomycota: Hypocreales) contra las chinches *Euschistus heros* y *Dichelops furcatus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Revista de Entomología Económica*, 113(5), 2540 – 2545. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa150>
- Sánchez-Soto, S., & Cortéz-Madrigal, H. (2000). Daños causados por *Hemeroblemma mexicana* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae) en el cultivo de cacao en Tabasco, México. *Agrotrópica*, 12(3), 143 – 146. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/ceplac/publicacoes/revista-agrotropica/revista-volumes/2000-a-2010/revista-agrotropica-vol-12-no-3-2000.pdf>
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). (2016). *Cultivos monospóricos de hongos*

- entomopatógenos. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172904/Ficha\\_CB\\_27\\_Cultivos\\_monosp\\_ricos\\_de\\_hongos\\_entomopat\\_genos.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172904/Ficha_CB_27_Cultivos_monosp_ricos_de_hongos_entomopat_genos.pdf)
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2023). *Producción agrícola*. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>
- Torres-de la Cruz, M., Ortiz-García, C. F., Téliz-Ortiz, D., Mora-Aguilera, A., & Nava-Díaz, C. (2013). Efecto del azoxystrobin sobre *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(1), 65 – 69. [https://rmf.smf.org.mx/DocumentosVolumenes/Escrito\\_31\\_1\\_7.pdf](https://rmf.smf.org.mx/DocumentosVolumenes/Escrito_31_1_7.pdf)
- Torres-de la Cruz, M., de la Cruz-Pérez, A., Pérez-de la Cruz, M., & Ortiz-García, C. F. (2019). Registro y descripción del daño de la cochinilla rosada del hibisco, *Maconellicoccus hirsutus* Green (Hemiptera: Pseudococcidae), en *Theobroma cacao* L., en Tabasco, México. *Revista Chilena de Entomología*, 45(1), 158 – 163. <https://biotaxa.prod.amazon.auckland.ac.nz/rce/article/view/48709>
- Valle-Ramírez, S. B., Torres-Gutiérrez, R., Caicedo-Quinche, W. O., Abril-Saltos, R. V., & Sucoshañay-Villalba, D. J. (2022). Aislamiento y caracterización de *Metarhizium* spp. de cultivos de caña de azúcar y su patogenicidad contra *Mahanarva andigena* (Hemiptera: Cercopidae). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 23(1), e2361. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol23\\_num1\\_art:236](https://doi.org/10.21930/rcta.vol23_num1_art:236)
- Yepes-Rodríguez, F. C. (2019). Nuevo hospedero de la chinche negra, *Antiteuchus tripterus* Fabricius, 1787 (Hemiptera: Pentatomidae). *Revista Metroflor-Agro*, 91(1), 8 – 14. <https://www.metroflorcolombia.com/edicion-no-91/>
- Yousef, M., Lozano-Tovar, M. D., Garrido-Jurado, I., & Quesada-Moraga, E. (2013) Biocontrol of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) with *Metarhizium brunneum* and its extracts. *Journal of Economic Entomology*, 106(3), 1118 – 1125. <https://doi.org/10.1603/EC12489>