

Evaluación de *Beauveria bassiana* para el control del picudo del chile en laboratorio

Manuel Carballo V*
Ligia Rodríguez
Joaquín Durán

RESUMEN. Se realizó un estudio de laboratorio, en el CATIE, Turrialba, Costa Rica, con el objetivo de evaluar diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bals), para seleccionar los más virulentos para el control del picudo del chile, *Anthonomus eugenii* (Coleoptera:Curculionidae). Se evaluaron varias concentraciones del hongo en suspensión de agua y aceite, para determinar la concentración letal media (CL_{50}), usando como métodos de aplicación la inmersión y la aspersión. Todos los aislamientos fueron patogénicos para el picudo, determinándose para los aislamientos 447, RL9-1, 113, 9205, 9218, 9006, 35 y 290 el mayor porcentaje de mortalidad, el menor tiempo letal (TL_{50}) y el mayor rendimiento de conidios en arroz. Las suspensiones de *B. bassiana*, tanto en agua como en agua mezclada con aceite al 3%, incrementaron la mortalidad del picudo y redujeron la TL_{50} conforme aumentó la concentración. La CL_{50} en agua fue de $1,2 \times 10^6$ conidios/ml y en aceite de $2,2 \times 10^4$ conidios/ml, lo cual indica que la eficacia del hongo aumentó al adicionar aceite a la suspensión.

Palabras clave: *Anthonomus eugenii*, *Beauveria bassiana*, Chile, Control biológico, Insectos.

ABSTRACT

Evaluation of *Beauveria bassiana* for the control of pepper weevil under laboratory conditions. A laboratory study was performed at CATIE, Turrialba, Costa Rica, with the objective of evaluating different isolates of *B. bassiana* (Bals), to select the most virulent for control of the pepper weevil *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae). Several concentrations of fungus in water and oil suspension were evaluated, to determine the half-lethal concentration (LC_{50}), using immersion and aspiration application methods. All the isolates were pathogenic to the weevil, the greatest % mortality, the lowest lethal time (LT_{50}) and the greatest yield of conidia on rice was determined for the isolates 447, RL9-1, 113, 9205, 9218, 9006, 35 and 290. The suspensions of *B. bassiana*, both in water and in water mixed with oil at 3%, increased the weevil mortality and reduced the LT_{50} in accordance with the increased concentration. The LC_{50} in water was $1,2 \times 10^6$ conidia/ml and in oil $2,2 \times 10^4$ conidia/ml, indicating that the efficacy of the fungus increased on adding oil to the suspension.

Key Words: *Anthonomus eugenii*, *Beauveria bassiana*, Pepper, Biological control, Insects.

Introducción

El picudo del chile o pimentón *Anthonomus eugenii* Cano, Coleoptera: Curculionidae, es la plaga más importante de este cultivo debido a las pérdidas causadas en la producción y por la gran cantidad de plaguicidas utilizados para su control. *A. eugenii* se encuentra distribuido en el sur de los Estados Unidos, México, América Central y en 1994 se informó su presencia en Costa Rica, donde se ha convertido en la limitante más importante para la producción de chile dulce y pi-

cante, en las principales áreas productoras del país. El daño principal es causado por la alimentación de las larvas dentro de los frutos en desarrollo, provocando la aparición de una mancha necrótica que circunda el área donde se encuentran las semillas; en cada fruto se pueden encontrar hasta tres larvas (Coto 1996). El mayor impacto de la plaga se produce durante las etapas de floración y fructificación del cultivo, principalmente por el daño que producen los instares larvales

*Unidad de Fitoprotección. CATIE, Turrialba, Costa Rica. mcarball@catie.ac.cr

dentro del fruto en desarrollo, aunque también provoca la caída de yemas florales, flores y frutos pequeños (Riley y Sparks 1995, Coto. 1996).

Cuando las larvas completan su desarrollo emergen los adultos, los cuales se alimentan de hojas tiernas, yemas florales y frutos, donde pasan gran parte de su vida. Los adultos tienen una longevidad que puede alcanzar hasta 80 días y las hembras duran hasta dos meses ovipositando un promedio de 340 huevos (Coto 1996). Considerando el uso desmedido de plaguicidas para el control de la plaga y la tendencia actual de buscar nuevas alternativas de manejo que reduzcan el uso de estos productos, se propone el control mediante el uso de hongos entomopatógenos como una alternativa para el combate de los adultos, los cuales permanecen la mayor parte del tiempo sobre el follaje.

En estudios realizados por Gómez y Jiménez (1991) sobre control biológico de *Anthonomus grandis* mostraron que *Beauveria bassiana* puede infectar pupas, larvas y adultos de este insecto. Asimismo, obtuvieron mortalidades de este insecto mayores al 90% mediante *Metarhizium anisopliae*. Coutinho y Oliveira (1991) en evaluaciones del control de *A. grandis* con *B. bassiana* obtuvieron mortalidades entre 67% y 100%. Gómez y Jiménez (1995) en ensayos de control de *A. eugenii* con diferentes cepas de *B. bassiana*, mediante inmersión en suspensiones acuosas del hongo de 1×10^8 conidios/ml, informaron que aunque todas las cepas fueron patogénicas a los adultos de este insecto, la cepa 64/88 fue la que causó mayor mortalidad, siendo superior a 80%. Schuster *et al.* (1996), en

la evaluación de tres hongos entomopatógenos (*B. bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) Brown y Smith y *Verticillium lecanii* (Zimmerman Viegas) en concentraciones de 10^7 ; determinaron que todos los hongos fueron patogénicos a las larvas, pupas y adultos del picudo del chile.

Estos antecedentes demuestran el potencial del control biológico de esta plaga. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar aislamientos de *B. bassiana* para el control de *A. eugenii* con el propósito de seleccionar los más virulentos para pruebas con diferentes concentraciones y en suspensiones en agua y aceite y determinar la concentración letal media (CL_{50}).

Materiales y métodos

Evaluación de aislamientos de *B. bassiana*

Este bioensayo se realizó en el laboratorio de CATIE, Turrialba, Costa Rica. Se evaluaron doce aislamientos del hongo, de diferentes procedencias, nueve de los cuales están en la colección que posee el CATIE y tres son de la colección CENICAFE, Colombia (Cuadro 1). Los adultos de *A. eugenii* se obtuvieron de chiles caídos, recolectados en plantaciones ubicadas en la provincia de Alajuela, Costa Rica. Los chiles fueron colocados en jaulas de 35 x 35 cm para la emergencia de los adultos, los cuales eran recolectados diariamente y alimentados con hojas de chile dulce. Se usaron los adultos que emergieron en cinco días consecutivos para tener una población de edad uniforme.

Los aislamientos se reprodujeron inicialmente en cajas de Petri con medio PDA y posteriormente, en arroz autoclavado para obtener de allí el polvo de co-

Cuadro 1. Características de los aislamientos de *B. bassiana* evaluados para el control de *A. eugenii* y rendimiento de conidios en arroz.

Aislamiento	Procedencia	Hospedante	g polvo/100g arroz	conidios/g polvo	conidios/100g arroz
RL9-1	Honduras ¹	<i>Hypothenemus hampei</i>	4,03	$8,4 \times 10^{10}$	$3,44 \times 10^{11}$
113	Nicaragua ¹	<i>H. hampei</i>	2,27	$5,34 \times 10^{10}$	$1,21 \times 10^{11}$
35	Honduras ¹	<i>H. hampei</i>	1,46	$4,10 \times 10^{10}$	$5,56 \times 10^{10}$
447	Brasil ¹	<i>Solenopsis invicta</i>	2,65	$6,87 \times 10^{10}$	$1,82 \times 10^{11}$
290	Brasil ¹	<i>Anthonomus grandis</i>	1,35	$4,49 \times 10^{10}$	$6,06 \times 10^{10}$
RL9-2	Honduras ¹	<i>H. hampei</i>	4,1	$8,25 \times 10^{10}$	$3,38 \times 10^{11}$
84	Costa Rica ¹	<i>Phyllophaga obsoleta</i>	0,63	$1,87 \times 10^{10}$	$1,17 \times 10^{10}$
9205	Colombia ²	<i>Diatraea saccharalis</i>	1,28	$5,2 \times 10^{10}$	$6,65 \times 10^{10}$
9218	Colombia ²	<i>Cosmopolites sordidus</i>	2,8	$5,3 \times 10^{10}$	$1,48 \times 10^{11}$
9006	Colombia ²	<i>Metamasius hemipterus</i>	1,8	$6,2 \times 10^{10}$	$1,12 \times 10^{11}$
64-1	Nicaragua ¹	<i>H. hampei</i>	0,67	$3,28 \times 10^{10}$	$2,19 \times 10^{10}$
64-2	Nicaragua ¹	<i>H. hampei</i>	0,8	$4,25 \times 10^{10}$	$3,40 \times 10^{10}$

¹ Aislamientos en la colección de CATIE.

² Aislamientos en la colección de CENICAFE, Colombia.

nidios. Posteriormente, se cuantificó la cantidad de conidios por gramo de polvo mediante un hemacítometro y se calcularon las concentraciones del hongo. Se prepararon suspensiones del hongo a una concentración de 10^8 conidios/ml en agua destilada con Tween 20 al 0,03%.

Se inocularon 10 insectos por aislamiento mediante su inmersión durante tres segundos en la suspensión, se mantuvieron cuatro repeticiones para un total de 40 adultos. La mortalidad se cuantificó diariamente por un período de 10 días. El porcentaje de mortalidad fue obtenido mediante un análisis de varianza y la prueba de Tukey al 5 % mientras que los tiempos letales medios (TL_{50}) se determinaron mediante el análisis de Próbitos.

Evaluación de concentraciones de *B. bassiana* en dos formulaciones

Este estudio se realizó en el laboratorio de CATIE, utilizando el aislamiento 447 de *B. bassiana* seleccionado en el primer estudio. Se evaluaron cuatro concentraciones del hongo ($1,5 \times 10^8$; $1,5 \times 10^7$; $1,5 \times 10^6$ y $1,5 \times 10^5$ conidios/ml) tanto en suspensión en agua como en suspensión en agua + aceite de soya al 5 %. Se mantuvieron dos testigos, uno en agua y otro en agua más aceite al 5 %. Se utilizaron 10 insectos por tratamiento y cuatro repeticiones por tratamiento para un total de 40 adultos por tratamiento. La inoculación de los adultos se realizó mediante la inmersión en la suspensión del hongo durante tres segundos.

Se evaluó la mortalidad diaria acumulada durante 7 días. Los especímenes muertos fueron trasladados a otros recipientes con humedad para permitir la esporulación de los hongos y posteriormente calcular la producción de conidios de *B. bassiana* en los cadáveres. Para determinar la eficacia de cada tratamiento se consideró el porcentaje de mortalidad y el tiempo letal medio (TL_{50}) y fue analizada mediante un análisis de varianza. La concentración letal (CL_{50}) y el TL_{50} fueron calculados mediante un análisis de próbitos.

Debido a las problemas en la aplicación de las suspensiones en agua con aceite, se realizó otro bioensayo en el cual se redujo la proporción de aceite al 3% y se varió el método de aplicación, utilizando la aspersión mediante un microaspersor. Se evaluaron cuatro concentraciones del hongo (1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 y 1×10^5 conidios/ml) y un testigo de agua + aceite. Se usó la misma cantidad de insectos por tratamiento y repeticiones. Se consideraron las mismas variables y los datos fueron evaluados en forma similar.

Resultados y discusión

Evaluación de aislamientos de *B. bassiana*

Todos los aislamientos evaluados resultaron patogénicos para el picudo (Cuadro 2). La mayor mortalidad fue obtenida con los aislamientos RL9-1, 113 y 35 con 100%, seguida por cinco aislamientos (447, 290, RL9-2, 0084 y 9205) que alcanzaron 95% y otros dos aislamientos (9218 y 9006) que causaron mortalidades de 92,5 y 90%, respectivamente. No se determinaron diferencias estadísticas entre estos aislamientos ($P > 0,05$). Dos aislamientos (64-1 y 64-2) produjeron mortalidades menores a 60%, siendo diferentes estadísticamente a los tratamientos anteriores. Gómez y Jiménez, (1995) habían informado mortalidades más altas para el aislamiento 64, lo cual podría estar asociado a la pérdida de virulencia debido a transferencias sucesivas del hongo en medios artificiales.

Cuadro 2. Porcentaje de mortalidad y tiempo medio letal (TL_{50}) causado por aislamientos de *B. bassiana* sobre *A. eugenii*.

Aislamiento	Mortalidad (%)	TL_{50}
RL9-1	100,0 a	2,40 a
113	100,0 a	2,24 a
35	100,0 a	2,37 a
447	97,5 a	1,80 a
290	95,0 a	3,66 a
RL9-2	95,0 a	3,12 a
84	95,0 a	3,58 a
9205	95,0 a	2,25 a
9218	92,5 a	2,61 a
9006	90,0 a	2,51 a
64-1	60,0 b	4,87 b
64-2	20,5 c	7,36 c
Testigo	20,0 c	9,33 c

Valores con la misma letra dentro de una misma columna, son iguales entre sí (Tukey al 5 %)

El TL_{50} fue más bajo con el aislamiento 447 (1,8 días), mientras que los aislamientos 113, 9205, 35, RL9-1, 9006 y 9218 presentaron valores entre 2,24 y 2,61 días (Cuadro 2). Los demás tratamientos alcanzaron valores superior a 3,58 días. Los TL_{50} obtenidos son bajos comparados con los obtenidos para insectos como *Cosmopolites sordidus* que presentan valores cercanos a 7 días (Brenes y Carballo 1990) pero que son insectos de longevidad más larga que *A. eugenii*. Esto es importante si se considera que la longevidad de los adultos de esta plaga es mayor a dos meses (Coto 1996) y la posibilidad de control mediante el hongo, en períodos menores a tres días después de su aplicación demuestran el potencial de este entomopatógeno para ser incluido en programas de manejo de esta plaga.

Estos resultados demuestran que todos los aislamientos excepto el 64-1 y el 64-2, son eficaces para el control del picudo del chile. Sin embargo, el mejor tratamiento fue el 447, por presentar el menor TL_{50} y un porcentaje de mortalidad muy alto, aunque también los aislamientos RL9-1, 113 y 35 mostraron potencial como agentes de control. Con base en estos resultados y en el rendimiento de polvo de conidios en arroz, conidios/g de polvo y conidios/100 g de arroz, en los cuales sobresalieron los aislamientos RL9, 447, 113, 9218, 9006, 9205, 35 y 290 por mayor rendimiento para producción masiva (Cuadro 1), se considera que los aislamientos con mayor potencial son 447, RL-9, 113, 9205, 9218, 9006, 35 y 290. Algunos de estos aislamientos están siendo evaluados en la zona sur de Costa Rica con resultados satisfactorios (*Com pers* Ligia Rodríguez, 2001 Ministerio de Agricultura y Ganadería). No obstante, deben continuarse las evaluaciones en futuros bioensayos y en condiciones de campo.

Evaluación de concentraciones de *B. bassiana* en dos formulaciones

Con el método de inmersión, los tratamientos del hongo en agua, causaron una mortalidad del 100% para la concentración más alta y 42,5 % para la más baja (Cuadro 3). Los tratamientos con solución de agua + aceite al 5%, causaron la muerte de los picudos adultos el mismo día de la aplicación, aún en los testigos sin el hongo (Cuadro 3), lo que indica que el método de inmersión no es adecuado cuando se utiliza aceite. Por tanto, la suspensión de agua + aceite se evaluó con aspersión como método de aplicación.

Para los tratamientos del hongo en agua, se determinó un TL_{50} de 2,81 días con la concentración más alta. Este tiempo aumentó significativamente con la

concentración más baja del hongo, siendo el TL_{50} de 7,25 (Cuadro 3). Con relación al número de conidios producidos por los cadáveres, se determinaron las mayores cantidades en los tratamientos con hongo en aceite con respecto a la suspensión en agua, a pesar de que los insectos en los tratamientos en un medio con aceite, murieron el mismo día de la aplicación. Esto indica que el aceite podría favorecer la esporulación del hongo, lo cual sería muy importante porque la presencia de cadáveres de insectos esporulados en las plantaciones de chile aumentarían la cantidad de conidios del hongo.

Se determinó una concentración letal media (CL_{50}) de $1,2 \times 10^6$ conidios/ml y una CL_{90} de 7×10^7 conidios/ml para el hongo en agua; en la suspensión con aceite no se logró determinar esta variable. Esta información debe evaluarse en el campo para corroborar los resultados y determinar el potencial del control mediante este entomopatógeno en condiciones naturales.

En la prueba con el hongo en suspensión de agua con aceite en un 3% y usando el método de aspersión, el porcentaje de mortalidad fue de 66,7% con la concentración de 1×10^5 y de 100% con una concentración de 1×10^8 , mientras que en el testigo con aceite ésta alcanzó un 57% (Cuadro 4). Esto demuestra que el aceite, aún en menor porcentaje, causa un efecto letal sobre los adultos del picudo. El método de aspersión redujo la mortalidad del testigo con respecto a la determinada para este mismo tratamiento cuando se usó la inmersión del insecto en la suspensión (Cuadro 3).

Estos resultados demuestran que el aceite por sí mismo puede contribuir a aumentar la eficacia del hongo, lo cual según Prior *et al.* (1988) puede deberse a que el aceite mejora la penetración gracias a sus pro-

Cuadro 3. Porcentaje de mortalidad de *A. eugenii*, tiempo letal medio y número de conidios producidos por los cadáveres de insectos, para diferentes concentraciones del aislamiento 447 de *B. bassiana*, usando el método de inmersión.

Concentración	Mortalidad (%)	TL_{50}	Nº conidios
$1,5 \times 10^8 + 5\%$ aceite	100,0 a	-	$2,60 \times 10^6$ a
$1,5 \times 10^7 + 5\%$ aceite	100,0 a	-	$2,39 \times 10^6$ ab
$1,5 \times 10^6 + 5\%$ aceite	100,0 a	-	$1,96 \times 10^6$ ab
$1,5 \times 10^5 + 5\%$ aceite	97,5 a	-	$1,63 \times 10^6$ bc
Testigo + 5% aceite	100,0 a	-	0,0 e
$1,5 \times 10^8 +$ agua	100,0 a	2,81 a	$1,48 \times 10^6$ bcd
$1,5 \times 10^7 +$ agua	97,4 a	3,21 a	$0,92 \times 10^6$ cde
$1,5 \times 10^6 +$ agua	55,0 b	9,21 b	$0,78 \times 10^6$ cde
$1,5 \times 10^5 +$ agua	42,5 bc	7,25 c	$0,53 \times 10^6$ de
Testigo + agua	20,0 c	36,1 d	0,0 e

Valores con igual letra dentro de una misma columna son iguales entre sí (Tukey al 5 %).

iedades cutinofílicas, que permiten que un mayor número de conidios alcancen las membranas intersegmentales susceptibles, así como también mejora la adhesión de los conidios a la cutícula del insecto.

Con respecto a los TL_{50} , éstos disminuyeron desde 6,7 a 3,8 días conforme aumentó la concentración del hongo (Cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje de mortalidad de *A. eugenii*, tiempo letal medio y número de conidios producidos por cadáveres de insectos, usando el método de aspersión.

Tratamientos	Mortalidad (%)	TL_{50}	Nº conidios
1x10 ⁸ +3%aceite	100,0 a	3,82 a	1,71x10 ⁶ a
1x10 ⁷ +3%aceite	83,3 ab	4,82 ab	1,70x10 ⁶ a
1x10 ⁶ +3%aceite	75,0 b	5,73 b	1,65x10 ⁶ a
1x10 ⁵ +3%aceite	66,7 bc	6,74 bc	1,58x10 ⁶ a
Testigo+3%aceite	57,1 c	7,81 c	0,0 b

Valores con igual letra dentro de una misma columna, son iguales entre sí (Tukey al 5 %).

En cuanto a la cantidad de conidios en insectos muertos, las concentraciones más altas produjeron mayor cantidad de conidios, estos resultados coinciden con los del método de inmersión determinándose valores similares a los obtenidos usando suspensiones de agua.

Con este método de aplicación y usando un 3% de aceite, se logró reducir la CL_{50} a 2,2x10⁴ conidios/ml, la cual es significativamente menor a la calculada usando solo agua, como se mencionó en la prueba anterior. La CL_{90} fue de 1,18x10⁷ conidios/ml que también es menor a la calculada para la suspensión en agua. Esta reducción de la CL_{50} de la suspensión en aceite, demuestra que la eficacia del hongo mejora con esta formulación y los resultados de esta investigación concuerdan con aspectos que son importantes en la formulación de entomopatógenos, como son mantener la viabilidad y mejorar la eficacia (Daoust *et al.* 1983), facilitar la aplicación de las esporas, mejorar la vida media y su persistencia en el ambiente después de la aplicación, así como incrementar la eficacia de los entomopatógenos (Feng *et al.* 1984). Roberts (1989) señala que otro de los objetivos en las formulaciones de entomopatógenos es reducir el efecto perjudicial de la luz ultravioleta.

Es importante destacar que con el uso de formulaciones de *B. bassiana* en aceite se pretende mejorar la eficacia del control de *A. eugenii*, en condiciones de campo, dado que los adultos de la plaga permanecen sobre el follaje durante las primeras horas de la maña-

na o por la tarde, momento propicio para hacer las aplicaciones del entomopatógeno, evitando el efecto de la luz ultravioleta.

Conclusiones

Se seleccionaron los aislamientos de *B. bassiana* 447, RL9-1, 113, 9205, 9218, 9006, 35 y 290 como los de mayor potencial para el control de *A. eugenii* por su mayor virulencia, menor TL_{50} y mayor rendimiento de conidios en arroz.

Las suspensiones de *B. bassiana* (aislamiento 447) tanto en agua como en agua mezclada con aceite al 3% incrementaron la mortalidad de picudos conforme aumentó la concentración y redujeron el TL_{50} . La suspensión del hongo en agua mezclada con aceite mostró mayor eficacia que la preparada en agua.

Literatura citada

- Alves, SB. 1986. Fungos entomopatógenicos. In Alves, SB. Ed. Controle microbiano de insetos. Sao Paulo, Brasil, Editora Manole. p. 73-126.
- Brenes, S; Carballo, M. 1994. Evaluación de *Beauveria bassiana* (Bals.) para el control biológico del picudo del plátano (*Cosmopolites sordidus* (Germar)). Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 31:17-21.
- Contreras, T; Carballo, M; Hidalgo, E; Bustamante, E. 1997. Evaluación de trampas de pseudotallo y formulaciones de *Beauveria bassiana* (Bals.) en el control del picudo del plátano *Cosmopolites sordidus* en Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 46:44-49.
- Coto, D. 1996. El picudo del Chile (*Anthonomus eugenii* Cano) su reconocimiento y posible manejo. Hoja Técnica MIP no. 19. In Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 42:1-4.
- Coutinho, JL; Oliveira, JV. 1991. Patogenicidade do isolado I-149Bb de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill a adultos de *Anthonomus grandis* (Coleoptera Curculionidae). Anais da Sociedade Entomologica do Brasil 20(1):199-207.
- Daoust, RA; Ward, MG; Roberts, DW. 1982. Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. Journal of Invertebrate Pathology 40:228-236.
- Daoust, RA; Ward, MG; Roberts, DW. 1983. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. Journal of Invertebrate Pathology 41:151-160.
- Feng, MG; Poprowski, TJ; Khachatourians, GG. 1994. Production, formulation and application of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: Current status. Biocontrol Science and Technology 4:3-34.
- Gómez, VM; Jiménez C, CM. 1994. Uso de hongos entomopatógenos para el manejo del picudo del algodón. In Hongos entomopatógenos de plagas en Nicaragua. Informe Final del Proyecto de Hongos Entomopatógenos. Centro Nacional de Diagnóstico Fitosanitario, MAG. Proyecto CATIE-INTA-MIP (NORAD-ASDI) (1991-94).
- Gómez, VM; Jiménez C, CM. 1995. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre adultos del picudo del Chile (*Anthonomus eugenii*). In Taller Nacional de Control Biológico. (1, 1995, León, Nicaragua). p. 95.

- Moore, D; Bateman, RP; Carey, M; Prior, C. 1995. Long-term storage of *Metarhizium flavoviridae* conidia in oil formulations for the control of locusts and grasshoppers. *Biocontrol Science and Technology* 5:193-199.
- Prior, C; Jollands, P; Patourel, GL. 1988. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 52:66-72.
- Riley, DG; Sparks, Jr. AN. 1995. The pepper weevil and its management. Texas Agricultural Extension Service. The Texas A&M University System. 6 p.
- Roberts, DW. 1989. World picture of biological control of insects by fungi. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol 84, Supl. III:89-100.