

Influencia de la luz y de aditivos naturales sobre la germinación de conidias de *Metarhizium anisopliae*

Silvia Ruth Rodríguez-Colorado¹
J. Concepción Rodríguez-Maciel²
David Riestra-Díaz¹
Juan A. Villanueva-Jiménez¹
Daniel Arturo Rodríguez-Lagunes³

RESUMEN. Se evaluó en el laboratorio el efecto de cuatro aditivos naturales (aceite de nim, aceite de maíz, glicerina comercial y agua destilada esterilizada) y la exposición a la luz sobre la germinación de las conidias de *Metarhizium anisopliae*. Los materiales se mantuvieron en frascos transparentes u oscuros durante tres meses, a $25\pm 5^\circ\text{C}$ y $70\pm 5\%$ HR. Se tomó una muestra mensual de cada tratamiento y se sembró en medio de cultivo agar dextrosa de Sabourad. El porcentaje de germinación de las conidias se obtuvo 26 h después de la siembra. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Hubo diferencias significativas en el porcentaje de germinación para las interacciones de los tres factores ($\alpha = 0,05$). En el análisis posterior para cada período, hubo diferencias significativas en los aditivos en cada uno de los meses, y para tipo de frasco solo a partir del segundo mes. En el agua destilada las conidias se mantuvieron viables en $>90\%$ durante los tres meses, en ambos tipos de frascos. En aceite de maíz, las conidias se mantuvieron viables en más de 90% hasta el primer mes, pero $< 85\%$ en los meses posteriores. Para conidias en aceite de nim y glicerina, en ambos tipos de frasco, la viabilidad fue $< 85\%$ desde el inicio, con 0% al primer mes de evaluación.

Palabras claves: *Metarhizium anisopliae*, Viabilidad, Germinación, Luz, Aditivos naturales, Control biológico.

ABSTRACT. Influence of light and natural additives on the germination of *Metarhizium anisopliae* conidias. The effect of four natural additives (neem oil, corn oil, commercial glycerin and distilled sterilized water) and light exposure on the germination of conidia of *M. anisopliae* was evaluated in the laboratory. The materials were kept in clear or dark flasks for three months, at $25\pm 5^\circ\text{C}$ and $70\pm 5\%$ RH. A monthly sample was taken from each treatment and placed on Sabourad dextrose culture medium. The percentage of conidia germination was determined 26 h after inoculation. The treatments were in a completely random design with four replications. There were significant differences in the percentage of germination for the interactions of three factors ($\alpha = 0,05$). In further analysis for each period, were obtained significant differences in the additives in each of the months, and for the type of flask only after the second month. In distilled water the viability of conidia remained $> 90\%$ during the three months, in both flask types. In corn oil, the viability of conidia was $> 90\%$ for the first month, but was $< 85\%$ in the following months. The viability of conidia in neem oil and glycerin, in both types of flask, was $< 85\%$ from the beginning, with 0% in the first month of evaluation.

Key Words: *Metarhizium anisopliae*, Viability, Germination, Light, Natural additives, Biological control.

Introducción

Las especies de mosca pinta o salivazo (*Aeneolamia* spp., Homoptera: Cercopidae) son consideradas como una de las principales plagas de la caña de azúcar en México. Flores (1996) estima que una población supe-

rior a 10 insectos adultos por cepa puede causar una reducción de 3 a 6 ton/ha. Por su parte Salazar y Badi-lla (1997) estiman que un número mayor de tres adultos y cinco ninfas por tallo reducen aproximadamente 30% del rendimiento de la caña de azúcar. Para el

¹ Colegio de Postgraduados Campus Veracruz. Veracruz-Xalapa, México. colors29@yahoo.com, javj@colpos.mx

² Colegio de Postgraduados Instituto de Fitosanidad. México- Texcoco, México.

³ Universidad Veracruzana, Postgrado en Caña de Azúcar. Peñuela, Veracruz, México.

combate de esta plaga se ha recurrido a la utilización masiva de insecticidas convencionales, que en su mayoría afectan al ambiente (Magalhaes 1997, Paray y Rajabalee 1998) y representan un peligro para la salud humana (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez 1994). Como una alternativa ecológica, se están utilizando cada vez más los hongos parásitos de esta plaga. Las características principales para que un hongo entomopatógeno sea eficaz en el control de insectos plaga, son su formulación y aplicación apropiada, así como la elevada virulencia del aislamiento (Bateman 1997).

Debido al bajo impacto que produce sobre el ambiente y la fauna benéfica, se ha incrementado durante los últimos años el uso del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor., como parte de la estrategia de manejo integrado de la mosca pinta en México. Por sus características patogénicas contra esta plaga, su factibilidad de reproducción en forma artificial y la rentabilidad de su uso, este hongo representa una alternativa viable de combate en México y en algunas regiones cañeras de América Latina (Allard *et al.* 1990, Calderón y Hernández 1997, Gómez 1998).

De acuerdo a Moore y Prior (1993) una formulación apropiada parece ser la clave del éxito de los insecticidas biológicos. La tendencia actual en el desarrollo de formulados con hongos entomopatógenos es la utilización de bases aceitosas (Bateman *et al.* 1993). Las conidias formuladas en aceites incrementan su efecto sobre el insecto plaga, posiblemente porque el aceite puede proteger a la conidia contra la desecación y la radiación ultravioleta (Alves *et al.* 1998, Jenkins y Thomas 1996), incrementar su adhesión a la cutícula y las membranas intersegmentales, interferir con la defensa natural de la cutícula y dispersar el inóculo sobre el cuerpo del insecto (Bateman *et al.* 1993). Las características físicas y químicas de la formulación no deben tener efectos perjudiciales sobre las conidias (Carballo 1998). Además, la formulación debe proporcionar estabilidad a las conidias, e incrementar la vida de anaquel del producto para su comercialización. Desafortunadamente, la información sobre el efecto de las formulaciones sobre las conidias de los hongos entomopatógenos es escasa (Daoust *et al.* 1983).

Por tanto, se consideró necesario evaluar en condiciones de laboratorio el efecto del aceite de maíz, aceite de nim, glicerina y agua destilada, como aditivos sobre la germinación de las conidias de *M. anisopliae*, con el propósito de mejorar la formulación y lograr un

mejor control de la plaga en el campo. El objetivo fue determinar la factibilidad de conservar la viabilidad de las conidias de *M. anisopliae* mediante la adición de aditivos naturales económicos y disponibles en el mercado nacional mexicano.

Materiales y métodos

Condiciones del experimento

La investigación se realizó del 1 de febrero al 1 de mayo de 1999 en la Unidad Reproductora de Hongos Entomopatógenos (URHE) del Campus Córdoba del Colegio de Postgraduados, México. Para la obtención de esporas se utilizó la cepa MOTZ de *M. anisopliae*, que se aisló en 1994 de mosca pinta recolectada en Acatlán de Pérez Figueroa, Oaxaca, México, y se mantiene en el cepario de la URHE.

Factores evaluados

Los tratamientos constaron de tres factores a diferentes niveles cada uno: aditivos (aceite de maíz, aceite de nim, glicerina y agua destilada esterilizada), frascos (transparente y oscuro) y tiempo de evaluación (mes 0, 1, 2, y 3). El aceite de nim se obtuvo como extracto crudo de semillas de *Azadirachta indica* (A. Juss.), procedentes de las plantaciones del Campus Córdoba del Colegio de Postgraduados. Los demás aditivos fueron aceite comercial de maíz (Dorella), glicerina comercial (Kurax) y agua destilada esterilizada, utilizados a la pureza comercial.

Preparación del bioensayo

Se esterilizaron frascos de 5 ml durante 24 h a 120°C. Los frascos de vidrio transparente se oscurecieron cubriéndolos totalmente con papel aluminio (Alupack). Se depositaron 5 ml del aditivo respectivo y 100 mg de conidias en cada frasco. Posteriormente, se cerraron con un tapón de hule y se sellaron con plástico Kleenpack. Todas las unidades experimentales se mantuvieron en la sala de germinación de la URHE-CP.

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre la germinación de las conidias de *M. anisopliae*, con una punta de algodón esterilizada se tomó una muestra del tratamiento respectivo y se sembró en cajas de Petri que contenían medio de cultivo agar dextrosa de Sabourad (Bioxon), enriquecido con extracto de levadura 1% y 500 ppm de estreptomycin, preparado 24 h antes del ensayo. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento. La siembra se realizó bajo condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar (Veco).

Las cajas con el medio nutritivo y la siembra de la muestra respectiva se mantuvieron en la sala de germinación de la URHE, a una temperatura promedio de 25°C y 70% de humedad relativa, bajo un fotoperíodo de 12:12 h, luz:oscuridad. La germinación de las conidias se observó bajo microscopio (American Optical) a partir de las 18 h, cada dos horas y hasta las 26 h después de la siembra. Se consideró como parámetro de germinación la formación del tubo germinativo de 100 conidias. El porcentaje de germinación se evaluó 26 h después de la siembra de los tratamientos ya que fue cuando se estandarizó la respuesta de germinación en todos los tratamientos. La primera evaluación (mes 0), se realizó con la mezcla fresca de cada tratamiento, por lo que se consideró que la exposición de los frascos a la luz fue la misma. En cada una de las tres evaluaciones mensuales restantes (meses 1, 2 y 3) se utilizaron frascos que no habían sido abiertos con anterioridad a cada tratamiento.

Diseño experimental y análisis estadístico

El porcentaje de germinación se transformó a su arco-seno raíz cuadrada, para asegurar homogeneidad de varianzas. Con el fin de integrar el análisis a través del tiempo, los datos se analizaron como parcelas subdivididas en el tiempo, teniendo como parcela grande los meses, como parcela pequeña a los tipos de frascos, y como subparcela a los aditivos. Además, este análisis permitió darle mayor importancia a la discriminación de los aditivos, variable que se consideró como la más importante (Steel *et al.* 1996). Se utilizó el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (SAS Institute 1985).

Resultados y discusión

La viabilidad de las conidias de *M. anisopliae* registrada 26 h después de la siembra se redujo considerablemente después de que los tratamientos (maíz, nim y glicerina) permanecieron durante tres meses almacenados. Las condiciones de temperatura y humedad relativa de la sala de germinación de la URHE se presentan en la figura 1. La temperatura promedio mensual presentó una tendencia ascendente, siendo 24,5°C para el mes de febrero 27,0°C en marzo y 28,4°C en abril; mientras que la humedad relativa, en promedio fue 69,7% para febrero, 72,8% en marzo y 65,2% en abril.

La interacción de las tres variables (meses*tipo de frasco*aditivo), así como las interacciones de dos variables (meses*tipo de frasco, meses*aditivo, y tipo de frasco*aditivo) fueron significativas ($\alpha = 0,05$). Esto requirió un análisis posterior a las subparcelas y parcelas pequeñas, para cada período de las parcelas grandes.

En el análisis posterior, fijando el factor meses para febrero (mes 0), no se encontró diferencia significativa entre los tipos de frasco, pero sí para la germinación de las conidias para los aditivos utilizados ($F = 4,07, P < 0,0441$). Tanto las conidias inmersas en agua como las que se encontraban en el aceite de maíz, presentaron una germinación de más de 90%.

Las conidias en aceite de nim y en glicerina presentaron una viabilidad menor a 85%, que es la mínima recomendada para la utilización comercial de estos organismos (SAGAR 1999). Se debe resaltar, que las conidias sólo permanecieron por 24 h en los productos. Esto sugiere que el aceite de maíz y el

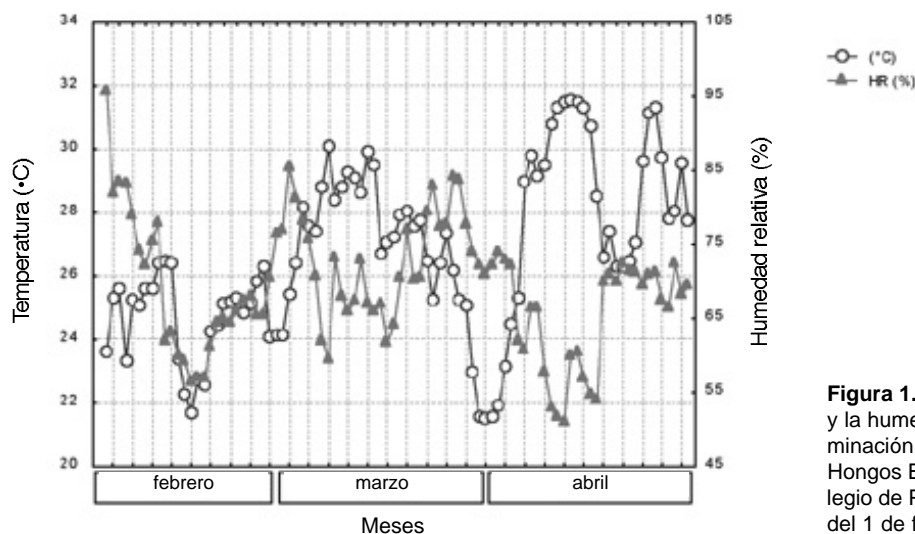


Figura 1. Fluctuación de la temperatura y la humedad relativa en la sala de germinación de la Unidad Reproductora de Hongos Entomopatógenos (URHE), Colegio de Postgraduados, Córdoba, Ver., del 1 de febrero al 1 de mayo de 1999.

agua destilada podrían ser utilizados para elaborar la mezcla previa a su aplicación en campo de las conidias de *M. anisopliae*, no así el aceite de nim y la glicerina utilizados.

Al fijar el análisis posterior al mes de marzo (mes 1), se observan diferencias significativas entre los aditivos sobre la germinación de las conidias ($F = 10869$, $P < 0,001$), pero no entre los tipos de frasco utilizados. Las conidias en agua destilada y en aceite de maíz mantienen su tendencia a germinar en más de 90%, tanto en frascos oscuros como transparentes. Mientras que la germinación de las conidias en glicerina y en aceite de nim fue menor de 5% en los dos tipos de frasco (Fig. 2 y 3). Por tanto, el aceite de nim y la glicerina no se podrían utilizar con fines de almacenamiento de conidias, dada la drástica pérdida de la estabilidad de las conidias en tan sólo un mes.

En el análisis posterior para abril (mes 2), se observaron diferencias significativas entre los aditivos utilizados ($F = 79,11$, $P < 0,0001$), y por primera vez entre los tipos de frasco ($F = 8,14$, $P < 0,009$). Las conidias en aceite de maíz y frasco transparente perdieron drásticamente su viabilidad ($< 5\%$), mientras que en frasco oscuro se conservaron viables alrededor de 60% de las conidias. De acuerdo a lo señalado por Alves *et al.* (1998), se puede considerar que las condiciones de oscuridad son más favorables para la conservación de la viabilidad de conidias, aunque solo se reflejaron en el segundo mes, en aceite de maíz. Ade-

más, es probable que la temperatura de la sala de germinación tuviera un efecto detrimental sobre la viabilidad de las conidias, en interacción con algunos aditivos, dado que a 4°C , Daoust *et al.* (1983), registraron una germinación de 72% de las conidias de *M. anisopliae* después de dos meses de almacenamiento en aceite de maíz, mientras que a 26°C se registró 0% de viabilidad no sólo para el aceite de maíz, sino para otros productos de origen vegetal, tal como se observó en el presente estudio, donde la temperatura promedio de abril fue la más elevada ($28,4^{\circ}\text{C}$) (Fig. 1).

A partir de abril (mes 2) la viabilidad de las conidias fue nula tanto en aceite de nim como en glicerina, en los dos tipos de frasco. Únicamente en el agua destilada se mantuvieron viables más de 90% de las conidias en ambos tipos de frasco.

El aceite de nim utilizado presentó crecimiento, en el medio de cultivo, de un hongo saprófito del género *Aspergillus*, el cual probablemente infectó las semillas durante el proceso de secado. Este contaminante pudo interferir en la germinación de *M. anisopliae*. Sin embargo, algunos autores han informado sobre el efecto adverso del aceite de nim sobre las conidias de *Metarhizium* (Aguda *et al.* 1986, Stathers *et al.* 1993). Algunos componentes del aceite de nim se han observado con actividad antifúngica contra ciertos hongos fitopatógenos (Govindachari *et al.* 1998), pero no necesariamente sobre la especie saprófita presente en las semillas utilizadas. Resultados similares sobre el efec-

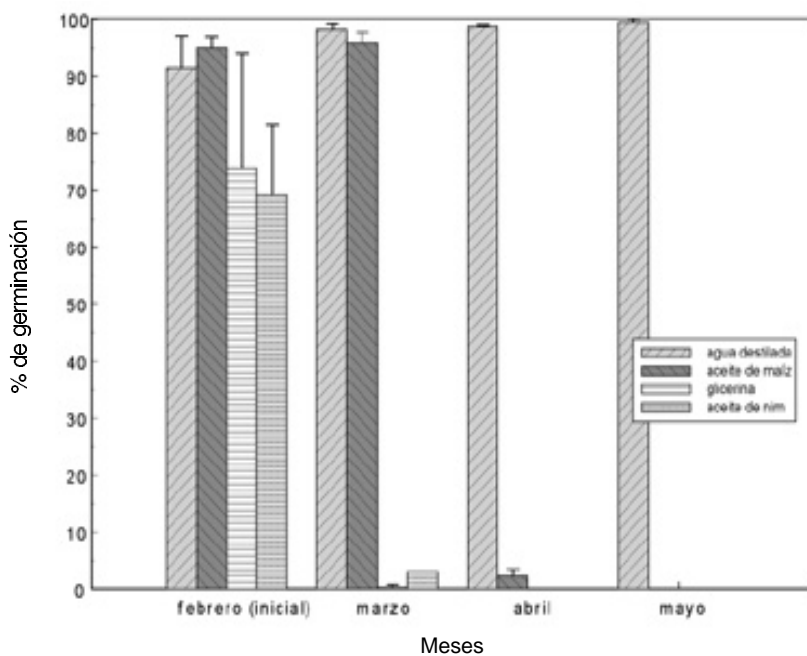


Figura 2. Porcentaje promedio y desviación estándar de la germinación de las conidias de *M. anisopliae*, 26 h después de la siembra, almacenadas en aceite de maíz, aceite de nim, glicerina y agua y conservadas en frascos transparentes, en condiciones de laboratorio, de febrero a mayo de 1999.

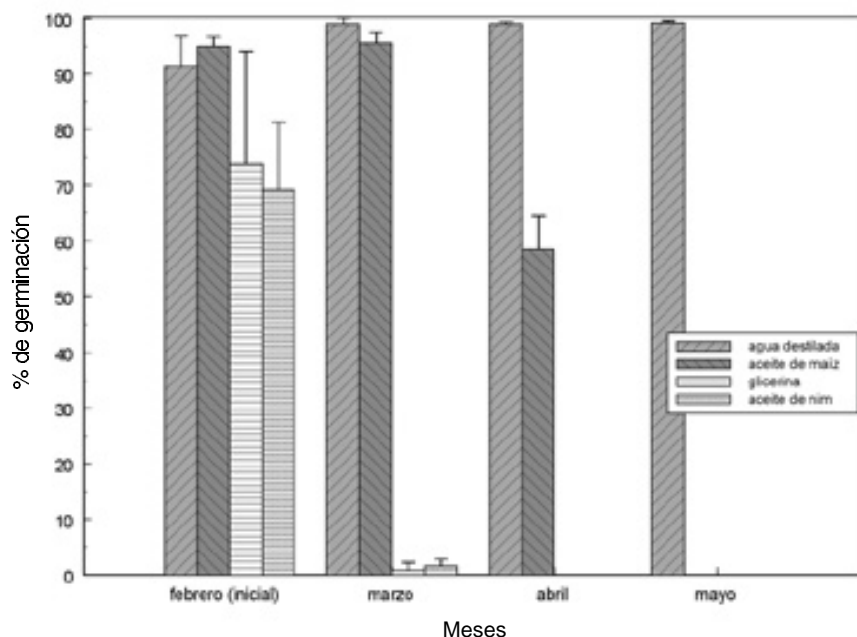


Figura 3. Porcentaje promedio y desviación estándar de la germinación de las conidias de *M. anisopliae* 26 h después de la siembra, almacenadas en aceite de maíz, aceite de nim, glicerina y agua y conservadas en frascos oscuros de marzo a mayo de 1999, bajo condiciones de laboratorio.

to en la viabilidad de las conidias de entomopatógenos fueron observados por Stathers *et al.* (1993), quienes reportaron un efecto detrimental del aceite de nim sobre la germinación de conidias de *M. flavoviride*, ya que después de seis semanas de almacenamiento a 25°C la germinación disminuyó a 4,7%. Asimismo, Aguda *et al.* (1986), indican que el aceite de nim tiene un efecto inhibitorio en la germinación de conidias de *M. anisopliae*. Los resultados obtenidos en esta investigación con el aceite de nim no son concluyentes, dada la presencia de *Aspergillus* sp., que pudo interferir con el efecto del aceite y componentes del mismo sobre *M. anisopliae*.

Por otra parte, la glicerina utilizada pudo haber disminuido la humedad disponible para el proceso de germinación de las conidias, debido al efecto desecador de los alcoholes. Este efecto fue observado por Kleespies y Zimmermann (1994), quienes al almacenar blastosporas a 35°C en glicerol 25%, registraron una viabilidad de 45% después de siete días. En mezclas de campo, algunos autores indican la utilización de glicerina como aditivo en formulaciones de entomopatógenos. Con una emulsión de agua, glicerina y esporas, Alatorre y Guzmán (1998) documentaron mortalidades de 60 a 95% en poblaciones de primer a tercer instar de chapulines. Luna *et al.* (1998) utilizaron glicerina como aditivo en formulaciones de *Bacillus*

thuringiensis (Berlenier), informando una adherencia de 89,6% del formulado en hojas de algodón, con la glicerina más pectina y azúcar. Por tanto, la utilización de glicerina podría mejorar la adherencia de *M. anisopliae* y contribuir en el proceso de mortalidad del insecto plaga, cuando se adiciona a la mezcla de campo antes de su aspersión, a pesar de que esta práctica podría reducir significativamente la viabilidad de las conidias. No es recomendable la glicerina como sustrato de almacenamiento de conidias de *M. anisopliae*, ya que cuando se utiliza a la pureza comercial afecta negativamente su germinación.

Durante la evaluación del mes de mayo (mes 3) se observó que solamente las conidias inmersas en agua se mantuvieron viables en más de 90%. Lo anterior difiere a lo informado por Daoust *et al.* (1983), quienes observaron pérdida total de la viabilidad de las conidias de *M. anisopliae* después de cuatro meses de almacenamiento en agua esterilizada a una temperatura ambiente de 20°C. En el presente estudio, el elevado porcentaje de germinación de las conidias almacenadas en agua pudo ser inducido por el ambiente húmedo que ésta proporcionó, ya que las conidias se encontraban suspendidas en el agua al momento de realizar la toma de las muestras para la siembra. El agua esterilizada es comúnmente empleada para almacenar hongos en su estado miceliar (Ellis 1979).

Daoust *et al.* (1983), indican que el agua esterilizada puede ser inadecuada para almacenar conidias de hongos entomopatógenos, ya que podría provocar la germinación de las conidias en el medio de almacenamiento. Sin embargo, en el presente estudio no se observó la germinación de las conidias en agua antes de sembrarlas en el medio de cultivo. Estos resultados sugieren la utilización de agua esterilizada como sustrato para el almacenamiento de conidias por un período de tres meses, con una viabilidad comercialmente aceptable al final de este período.

La temperatura de almacenamiento bajo la cual se mantuvieron los tratamientos, en interacción con algunos de los aditivos, pudo haber provocado la baja germinación de las conidias. El período de almacenamiento de un producto bioinsecticida comercial se ha estimado en un lapso de tres semanas a 24 meses, dependiendo de la temperatura de almacenaje. Para fines de comercialización de productos, se requiere estabilizar la sobrevivencia de las conidias a temperatura ambiente (> 20°C) (Jackson *et al.* 1997). El desafío es reducir la actividad metabólica del entomopatógeno sin que el proceso ocasione el debilitamiento o la muerte de la conidia. Mientras ello se logra, la agricultura moderna debe aceptar las limitaciones actuales de los bioinsecticidas (Jackson y Schisler 1995, Moore y Prior 1993).

Literatura citada

Aguda, RM; Rombach, MC; Shepard, BM. 1986. Effect of neem oil on germination and sporulation of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. Int. Rice. Res. Newsl. 11:34-35.

Alatorre, RR; Guzmán, FA. 1998. Novelties in the microbial control of economic importance grasshoppers of México. In Congreso Nacional de Control Biológico (XXI, 1998, Río Bravo, Tamaulipas, México). Memoria. p. 5-7.

Allard, GB; Chase, CA; Heale, JB; Issac, JE; Prior, C. 1990. Field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a mycoinsecticide for control of sugarcane froghopper, *Aeneolamia varia saccharina* (Hemiptera: Cercopidae). J. Inverteb. Pathol. 55: 41-46.

Alves, RT; Bateman, RP; Prior, C; Leather, SR. 1998. Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. Crop Protection 17:675-679.

Bateman, RP. 1997. The development of a mycoinsecticide for the control of locust and grasshoppers. Outlook on Agriculture 26:13-18.

Conclusiones

El agua destilada esterilizada permite el almacenamiento de las conidias, tanto en frascos transparentes como oscuros, hasta los tres meses. El aceite de maíz en frasco transparente, no tiene un efecto adverso sobre la viabilidad y la estabilidad de las conidias de *M. anisopliae* hasta por un mes de almacenamiento, considerando 85% como parámetro estándar mínimo de germinación; por tanto, se puede considerar al aceite de maíz como un aditivo para mejorar la mezcla de campo de *M. anisopliae*, pero no para su almacenamiento por períodos mayores a un mes.

Los aditivos que muestran un efecto negativo sobre las conidias son el aceite de nim y la glicerina, en ambos tipos de frasco, a partir de su inmersión inicial en el aditivo, y el aceite de maíz en frasco oscuro, a dos meses de almacenamiento.

Se registró la presencia del hongo saprobio *Aspergillus* sp. en el aceite de nim, por lo que se sugiere mejorar los procesos de manejo de la semilla y de extracción del aceite, para evitar su proliferación en las semillas, y su consecuente presencia en el aceite.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México por el financiamiento de los estudios de postgrado del primer autor. Al Colegio de Postgraduados por las facilidades proporcionadas para realizar el estudio en las instalaciones de la URHE del Campus Córdoba.

Bateman, RP; Carey, M; Moore, D; Prior, C. 1993. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locust at low humidities. Ann. Appl. Biol. 122: 145-152.

Calderón, AP; Hernández, A. 1997. Evaluación de dos prácticas de control (microbiano y químico) para *Aeneolamia* sp. L. en el Ingenio La Unión, Santa Lucía, Cotzumalguapa, Escuintla. In Memoria Congreso Nacional de MIP (VIII, 1997, Guatemala). Guatemala, CONCYT-FONACYT. p. 46-47.

Carballo, MV. 1998. Formulación de Hongos Entomopatógenos. Hoja Técnica No. 25 CATIE, Costa Rica. 5 p.

Daoust, RA; Ward, MG; Roberts, DW. 1983. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. J. Invert. Pathol. 41:151-160.

Ellis, JJ. 1979. Preserving fungus strains in sterile water. Mycologia. 71:1072-1075.

Flores, CS. 1996. Mosca pinta o salivazo en caña de azúcar y pastos. In Encuentro Regional Fitosanitario (1, 1996, Xalapa, Veracruz, México). Memoria. Colegio de Ingenieros Agrónomos. p. 24-31.

- Gómez, JI. 1998. Control integral de la mosca pinta (*Aeneolamia postica*) en el Ingenio Central Motzorongo. In Seminario sobre Fitosanidad de Caña de Azúcar (1998, Córdoba, Veracruz, México). Memoria. Colegio de Postgraduados-GEPLACEA-CYTCAÑA. p. 7.
- Govindachari, TR; Suresh, R; Gopalakrishnan, G; Banumathy, B; Masilamani, S. 1998. Identification of antifungal compounds from the seed oil of *Azadirachta indica*. *Phytoparasitica* 26:1-8.
- Jackson, MA; Schisler, DA. 1995. Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicide propagules. *Mycol. Res.* 99:879-884.
- Jackson, MA; Mcguire, MR; Lacey, LA; Wraight, SP. 1997. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol. Res.* 101:35-41.
- Jenkins, NE; Thomas, MB. 1996. Effect of formulation and application method on the efficacy of aerial and submerged conidia of *Metarhizium flavoviride* of locust and grasshopper control. *Pesticide Science* 46:299-306.
- Kleespies, RG; Zimmermann, G. 1994. Viability and virulence of blastospores of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin after storage in various liquids at different temperatures. *Biocontrol Science and Technology* 4:309-319.
- Lagunes-Tejeda, A; Villanueva-Jiménez, JA. 1994. Toxicología y Manejo de Insecticidas. México, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. 264 p.
- Luna, JE; Morales, HL; Arévalo, NK; Gómez, TM; Galán, WL. 1998. Desarrollo de formulados asperjables de *Bacillus thuringiensis* a base de polímeros. In Congreso Nacional de Control Biológico (21, 1998, Río Bravo, Tamaulipas, México). Memoria. p. 222-224.
- Magalhaes, BP. 1997. Microbial control of grasshoppers in Brazil with the use of entomopathogenic fungi. In Martins, MT Ed. Trends in Microbial Ecology. Brazilian Society of Microbiology. p. 429-433.
- Moore, D; Prior, C. 1993. The potential of mycoinsecticides. *Biocontrol News and Information*. 14:31-40.
- Paray, NB; Rajabalee, A. 1998. Preliminary studies on entomopathogens associated with sugar cane pest in Mauritius. Mauritius Sugar Industry Research. In: http://www.uom.ac.mu/Faculty/FA/General_Information/AMAS97/P03TXT.
- SAGAR, 1999. Acta de la 1a Reunión de Coordinación de Laboratorios de Control Biológico. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Delegación Estatal en Veracruz, Subdelegación de Agricultura. 4p. Inédito.
- Salazar, BDJ; Badilla, FF. 1997. Evaluación de dos cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* y seis insecticidas granulados en el control de salivazo (*Aeneolamia postica*) (Homoptera:Cercopidae) en caña de azúcar en la región de San Carlos. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 43:9-18.
- SAS Institute. 1985. SAS/STAT Guide for Personal Computer, Versión 6.04 Edition. SAS Institute, Inc, Cary, North Carolina, USA.
- Stathers, TE; Moore, D; Prior, C. 1993. The effect of different temperatures on the viability of *Metarhizium flavoviride* conidia stored in vegetable and mineral oils. *J. Invert. Pathology*. 62:111-115.
- Steel, RGD; Torrie, JH; Dickey, DA. 1996. Principles and Procedures of Statistics, a Biometrical Approach. 3 ed. New York, McGraw-Hill.