

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA VIABILIDAD DE ESPORAS Y TOXICIDAD DE *BEAUVERIA BASSIANA* Y *METARHIZIUM ANISOPLIAE* SOBRE *PIERIS RAPAE* (L.) (LEPIDOPTERA: PIERIDAE)

CIPRIANO GARCÍA-GUTIÉRREZ,¹ ISAÍAS CHAÍREZ-HERNÁNDEZ² e HIRAM MEDRANO-ROLDÁN³

¹CIIDIR-IPN COFAA Unidad Sinaloa. Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250. C.P. 81101. Guasave, Sinaloa. Tel. (687) 8729626. Fax. (687) 8729625. garciaciprian@hotmail.com

²CIIDIR-IPN COFAA Unidad Durango. Sigma No. 119. Fracc. 20 de Nov. II. C. P. 34220. Durango. Dgo. Tel. (618)8142091. Fax. (618)8144540. ichairez@hotmail.com

³Instituto Tecnológico de Durango. Posgrado Bioquímica. Blvd. Felipe Pescador No. 1830 Ote. Col. Nueva Vizcaya, Durango, Dgo. C.P. 34080.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA VIABILIDAD DE ESPORAS Y TOXICIDAD DE *BEAUVERIA BASSIANA* Y *METARHIZIUM ANISOPLIAE* SOBRE *PIERIS RAPAE* (L.) (LEPIDOPTERA: PIERIDAE)

RESUMEN: Se estudió la influencia de la temperatura sobre la viabilidad de esporas y toxicidad de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana* (Vuill.) y cinco de *Metharizium anisopliae* (Metch.) provenientes de 10 sitios con diferente clima donde se cultiva repollo *Brassicae oleraceae* (L.) en Durango, México. Las cepas fueron propagadas por fermentación difásica y las esporas obtenidas se hicieron crecer en medio PDA bajo diferentes condiciones de temperatura (25, 30, 35 y 40 °C) durante 8 días; a las 24 y 48 h se determinó el porcentaje de viabilidad de esporas de cada aislamiento. Se evaluó la toxicidad de los aislamientos a las mismas temperaturas empleando un diseño experimental factorial $2 \times 5 \times 4$, sobre larvas de 3-5 días de desarrollo de *Pieris rapae*; se usó un bioensayo por contaminación de dieta natural con una solución conteniendo 1.2×10^9 esporas/ml; los insectos de cada tratamiento fueron transferidos a una cámara de cría durante 72 h para determinar el promedio de insectos muertos. Los datos de mortalidad de larvas fueron analizados con un ANOVA y las diferencias entre estos con una prueba DMS. En general la viabilidad de esporas de todos los aislamientos fue mayor entre 25 y 30 °C, disminuyendo a 35 y 40 °C. Existieron diferencias estadísticas significativas entre las cepas y las temperaturas ($F = 1.48$ y $p = 0.1471$), (DMS = 4.5), así como entre los aislamientos y las diferentes temperaturas ($F = 1.121$, $p = 0.35322$), (DMS = 1.324). Estos resultados permitieron seleccionar a Bb4 y Mtz5 con los mayores porcentajes de germinación de esporas (93 y 91%) y a Bb1 y Mtz2 con la mayor mortalidad de insectos (98 y 70%), como los mejores aislamientos a 25 y 30 °C; así como a Bb1 y Mtz4, provenientes de sitios cálidos, como tolerantes a altas temperaturas (35-40 °C), por lo que se recomienda su uso en el control de *P. rapae* en lugares con estas temperaturas en los sitios de estudio.

PALABRAS CLAVE: Temperatura, viabilidad de esporas, *Pieris rapae*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA VIABILIDAD DE ESPORAS Y TOXICIDAD DE *BEAUVERIA BASSIANA* Y *METARHIZIUM ANISOPLIAE* SOBRE *PIERIS RAPAE* (L.) (LEPIDOPTERA: PIERIDAE)

ABSTRACT: The influence of temperature in the spore viability and toxicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* strains on cabbage worm *Pieris rapae* (L.) were studied. Ten strains were collected on to *Brassicae oleraceae* (L.) cultures, and directly from infected insects in sites with different ranges of temperature in Durango, Mexico. The fungus were produce by diphasic fermentation; the spores growth in PDA medium under different temperature conditions (25, 30, 35 and 40 °C) during 8 days, after 24 h the percentage of spore viability were determinate. A contamination leaf bioassay was used to study the influence of temperature in the strain's toxicity on 3-5 old-day larvae of *P. rapae*, using a factorial design $2 \times 5 \times 4$. In all strains the highest spore viability ranged

around 90% to 25 and 30 °C, but these low to 35-40 °C. There were significant statistical differences between strains ($F = 1.48$, $p = 0.1471$) (DMS = 4.5). This results allowed selected to Bb4 and Mtz5 (93 and 91%) by the highest spore germination percentages, however Bb1 and Mtz2 had the major mean insect mortality (98 and 70%) to 25-30 °C, and so were selected for use them in the *P. rapae* control in sites with the same range of temperature. In the other hand, Bb1 and Mtz4 isolates from hot weather sites showed tolerance to high temperatures (35 and 40 °C), by this reason were recommended for use them in the places where the cabbage is cultivate in Durango.

KEYWORDS: Temperature, spore viability, *Pieris rapae*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*.

En Durango se cultivan 6000 ha de hortalizas, entre las que destacan las crucíferas en los Municipios de Durango, Nombre de Dios y La Región Lagunera (INEGI, 2006). En los últimos años estos cultivos han adquirido relevancia por su demanda en el mercado Nacional, debido a que les atribuyen beneficios en la salud humana como agentes anticancerígenos. En estas regiones se cultiva repollo *Brassicae oleraceae* var. *capitata* (L.), en lugares con temperaturas que varían entre 28-35 °C, donde se ha observado una alta infestación del complejo de plagas formado por *Trichoplusia ni* (Hübner), *Brevicoryne brassicae* (L.), *Plutella xylostella* (L.) y *Pieris rapae* (L.); en estos lugares se han encontrado infestaciones naturales de este insecto por hongos nativos, lo que sugiere su presencia en estos suelos (García *et al.*, 2007). Respecto a esto, Keller y Zimmerman (1989) señalan que los hongos Hypocreales son habitantes comunes del suelo, refiriéndose además a *Galleria mellonella* L. como insecto usado para el aislamiento de hongos y nematodos (Zimmerman, 1989).

Los factores ambientales que determinan la presencia, distribución y adaptación de los hongos en los suelos son la resistencia a rayos UV, intensidad de la radiación, humedad relativa y temperatura (Mitsuaki, 2004); cuando esta última es extrema afecta la presencia de estos hongos en los agroecosistemas donde las temperaturas regulares son de 10-40 °C (Ignoffo, 1992).

La temperatura influye sobre la viabilidad y germinación de esporas de *M. anisopliae* y *B. bassiana*, alcanzando el 100% de germinación a

25 °C a las 24 h (Junqueira *et al.*, 2006). También se ha observado en campo que las temperaturas de 35-38 °C y el estrés hídrico influyen en la germinación de aislamientos de *B. bassiana*, obteniendo sólo el 90% de crecimiento en verano (Devi *et al.*, 2005). Se sabe además que *B. bassiana* disminuye la progenie de *Rhyzopertha dominica* F. (Bost) cuando aumenta gradualmente la temperatura (26-36 °C), esto mismo ha ocurrido para el escarabajo del pino *Monochamus alternatus* (Mitsuaki, 2004). Por otro lado, se ha estudiado el efecto de la humedad relativa HR, en la toxicidad de *B. bassiana* sobre *Triatoma infestans*, encontrando que el estrés contribuye a aumentar los efectos del hongo cuando la humedad es de 43% (Jeffrey, 2005).

Vanderberg (1998) evaluaron el efecto tóxico de *B. bassiana* sobre *P. xylostella* encontrando que la mayor mortalidad de larvas de los primeros instares ocurre a temperaturas por arriba de 25 °C; en otro estudio García *et al.* (2007), determinaron que dos aplicaciones de estos hongos a concentraciones de 1.2×10^9 y 1.2×10^{12} conidios/ha, lograron disminuir a la población de larvas de *P. rapae* en un 93.3 y 70% respectivamente, a los 7 días de su aplicación en campo.

Respecto al hábitat, es conocido que *M. anisopliae* se presenta con más frecuencia en suelos soleados que en sombreados; así mismo, los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* provenientes de regiones áridas no se adaptan a las condiciones de baja humedad disminuyendo su actividad tóxica sobre *T. infestans* en climas cálidos (Bidochka *et al.*, 2001).

El presente estudio está enfocado a la búsqueda de cepas nativas adaptadas a su ambiente, en las áreas agrícolas donde se cultiva repollo bajo diferentes condiciones climáticas, por lo que el objetivo del trabajo fue la selección de aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, tolerantes a altas temperaturas, y con actividad tóxica sobre larvas de *P. rapae*, provenientes de los sitios donde se cultiva repollo en Durango.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos. Se utilizaron cinco aislamientos de *B. bassiana* y cinco de *M. anisopliae* provenientes de suelos agrícolas e insectos huésped recolectados en Durango, México. Los hongos se aislaron durante el verano de 2006 en los sitios y hospederos que aparecen en el Cuadro 1.

El aislamiento y purificación de las cepas se hizo usando larvas de los últimos estadios de *G. mellonella* como insecto trampa, los cuales se pusieron en contacto por 15 días con las muestras de suelo humedecido para su infección por

hongos. Las larvas de *P. rapae* que presentaron infección se transfirieron a cajas de Petri con medio de cultivo a base de extracto de malta, extracto de levadura, agar bacteriológico y caldo dextrosa saboraud, hasta la obtención de un cultivo puro (Goettel e Inglis, 1977).

Mantenimiento y propagación de las cepas.

Los aislamientos fueron mantenidos en tubos de ensayo con medio SDA por 15 días a 27 °C hasta alcanzar su crecimiento óptimo. Se tomó una asada de los hongos para preparar los respectivos inóculos agregando a un tubo de ensayo 20 ml de agua destilada estéril conteniendo 0.5% de Tween 80®, preparando una suspensión de conidios que sirvió para inocular a su vez un matraz Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 200 ml de medio de cultivo con la siguiente composición: Melaza como fuente de carbono (12 ml), 6g de (NH₄)₂SO₄, 2.4g de KH₂PO₄, 0.5g de MgSO₄, 0.1g de CaCl₂ y 0.1g de NaCl, por litro de agua destilada. El cultivo creció a 130 rpm y

Cuadro 1

Aislamientos de hongos entomopatógenos de diferentes sitios en Durango, México.

Aislamiento/ Clave	Sitio	Altitud msnm	Temp. media anual (°C)	Temp. máxima (°C)	Origen	Hospedero
Bb1	1. C. Real	1871	25	36	Suelo	
Bb2	2. Nazas	1264	28	40	—	<i>P. rapae</i>
Bb3	3. Madero	2128	26	35	Suelo	
Bb4	4. Poanas	1873	28	38	Suelo	
Bb5	5. Morcillo	2001	28	37	Suelo	
Mtz1	6. C. Real	1871	26	34	Suelo	
Mtz2	7. Nazas	1264	28	40	Suelo	
Mtz3	8. Madero	2128	26	35	Suelo	
Mtz4	9. Poanas	1873	25	38	—	<i>P. rapae</i>
Mtz5	10. Morcillo	2001	22	38	Suelo	

27 °C por 48 h en una incubadora agitadora (New Brunswick Scientific, Mod. MF-214) hasta que el hongo alcanzó el 80% de su fase logarítmica de crecimiento, en este momento se tomaron 10 ml del medio de cultivo y se pusieron en bolsas de plástico con 250 g de arroz lavado y esterilizado, después se incubaron los hongos por 18 días a 27 °C y fotoperiodo de 14:10 h hasta la producción de conidios (García *et al.*, 2006).

Cría masiva de *P. rapae*. Se estableció la cría masiva del insecto usando larvas y pupas colectadas en cultivos de repollo durante 2006 en Nombre de Dios, Durango. Las larvas se alimentaron con hojas de repollo lavadas con una solución de cloro al 0.01% y enjuagadas con agua de la llave, se usaron solo hojas frescas y tiernas de repollo, las cuales fueron cortadas en discos de 5cm de diámetro y colocadas sobre papel filtro de 4cm de diámetro. Se colocaron 3 larvas por caja, cambiando el alimento cada cinco días, los insectos se desarrollaron hasta la formación de pupas, las cuales fueron puestas en jaulas cilíndricas de malla con base y tapa de platos de plástico conteniendo en la base arena húmeda lavada y desinfectada; el material biológico se mantuvo en la cámara de cría a 27 °C, 60% de HR y fotoperíodo 14:10 hasta la eclosión de las palomillas, mismas que fueron puestas en una jaula de madera y tela de organdí de 0.5 × 0.6 m, con hojas de repollo y macetas con vegetación silvestre para proporcionarles reposo y sitios de oviposición, las plantas se revisaron diariamente con lupa para obtener los huevecillos, los cuales fueron retirados con un pincel de cerdas de camello humedecido y puestos sobre papel filtro para ser incubados en la cámara hasta la eclosión de larvas, estas se pusieron nuevamente sobre hojas de repollo en las cajas Petri para su uso en la prueba de toxicidad.

Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de conidios. En cada aislamiento se extrajeron

pequeñas porciones de hongo y se pasaron a tubos de ensaye con 10 ml de agua destilada y 0.05 ml de tween 80[®], agitando la mezcla en un vórtex por 1 min, para determinar la viabilidad de esporas se sembraron cajas Petri con medio PDA, mas 10 ml de una suspensión con 2×10^4 esporas/ml de cada aislamiento. Las cajas se incubaron por 12-24 h a 27 °C, después se determinó el porcentaje y tiempo de germinación de las esporas contando 400 conidios/placa bajo observación en un microscopio compuesto 40x. Los conidios con tubo germinativo de la mitad de la longitud total de la espora fueron considerados germinados.

Efecto de la temperatura en la toxicidad de hongos. Se aplicó un diseño experimental factorial $2 \times 5 \times 4$; dos cepas *B. bassiana* y *M. anisopliae*, 5 aislamientos de cada cepa (Cuadro 1) y cuatro diferentes temperaturas (25, 30, 35 y 40 °C). Se utilizó un bioensayo por contaminación de dieta natural, usando discos de hojas tiernas de repollo de 5 cm de diámetro, las cuales fueron inmersas por 1 min en 10 ml de una solución con 1.2×10^9 conidios/ml, posteriormente cada hoja se puso sobre papel filtro dentro de la caja y se colocó una larva de 3-5 días de desarrollo. Se usaron 25 larvas por cada tratamiento y agua destilada como control, con tres repeticiones. Las cajas con larvas tratadas fueron puestas en una cámara de cría ajustada a las diferentes temperaturas, a las 72 h se determinó el número de insectos muertos en cada aislamiento, los datos fueron analizados con el programa SAS (1988), mediante análisis de varianza, se aplicó además una prueba DMS para analizar las diferencias entre los valores promedio de mortalidad de larvas por tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de conidios. En general la viabilidad de esporas de todos los hongos fue mejor a 25-30 °C, dismi-

nuyendo notablemente entre 35-40 °C (Figura 1); se observó también que estos fueron tolerantes a altas temperaturas desde las 24 h. La mayor germinación de esporas la presentó el aislamiento Bb4 (93 ± 0.6 c.v) a 25 °C a las 48 h y la menor Bb5 (78 ± 0.2) a 40 °C a las 24 h, estos mismos resultados para Mtz5 fueron de 91.66 ± 0.3 y 70.66 ± 0.21 , a 25 y 40 °C, a las 48 h respectivamente. Los aislamientos de *B. bassiana* alcanzaron 90% mientras que a temperaturas mayores (35-40 °C) los porcentajes promedio fueron de 80%, esta misma tendencia se observó para *M. anisopliae*; esto concuerda con los resultados de Junqueira *et al.* (2006), quienes encontraron que la viabilidad y germinación de esporas de estas cepas alcanzaron el 100% de desarrollo a 25 °C a las 24 h, disminuyendo conforme aumenta la temperatura. En relación al origen de las cepas es importante destacar que los aislamientos (Bb1 y Bb2) de *B. bassiana* provenientes de los sitios con temperaturas máximas de 36 y 40 °C fueron también los que alcanzaron los más altos porcentajes de germinación a estas mismas tempe-

raturas; resultados similares fueron encontrados por Devi *et al.* (2005) y Jeffrey (2005) quienes determinaron que las temperaturas altas influyen en la germinación y crecimiento de aislamientos de *B. bassiana*, observando mejor desarrollo en los meses más cálidos a temperaturas de 34-38 °C; este comportamiento también fue observado en este estudio, lo que permitió seleccionar a los aislamientos Bb1 y Mtz4 como tolerantes a temperaturas de 35-40 °C.

Efecto de la temperatura sobre la toxicidad de *P. rapae*. Existieron diferencias estadísticas significativas entre los promedios de mortalidad de larvas causada en la relación cepas temperatura ($F = 1.48$, $p = 0.1471$), (DMS = 4.5), y entre los aislamientos a diferente temperatura ($F = 1.121$, $p = 0.35322$), (DMS = 1.32). La mayor mortalidad de larvas la presentaron los aislamiento Bb1 (98 ± 0.6 c.v) 30 °C y la menor fue Bb2 (58%) a 40 °C; mientras que para *M. anisopliae* fue Mtz2 con 70 y 42% a 25 y 40 °C, respectivamente (Figura 2), (Cuadro 2).

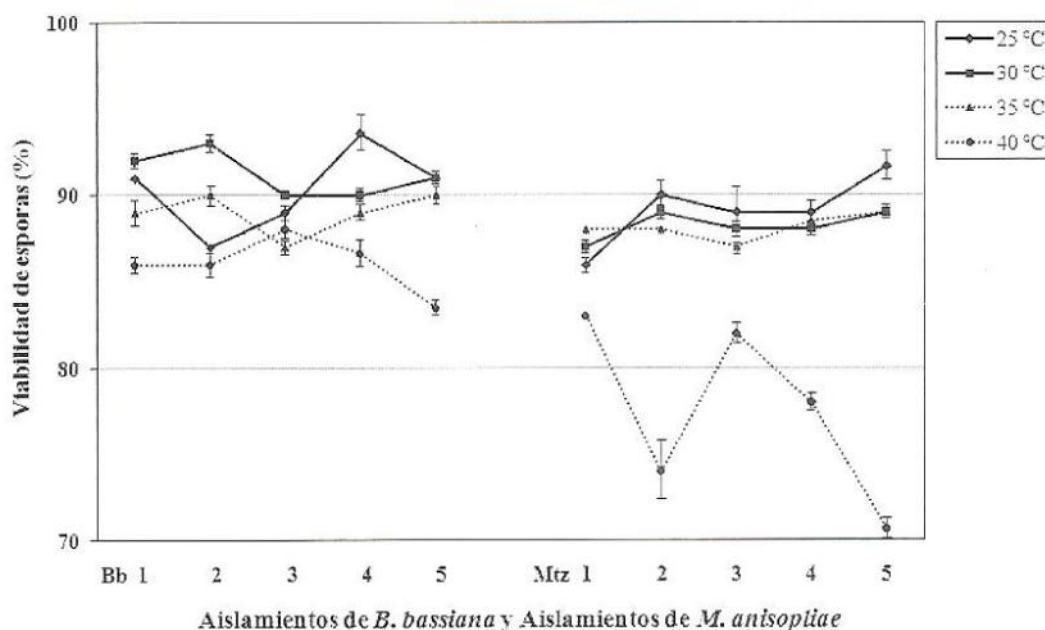


FIGURA 1. Porcentaje de viabilidad de esporas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* a diferentes temperaturas.

Efecto de la temperatura en la viabilidad de esporas

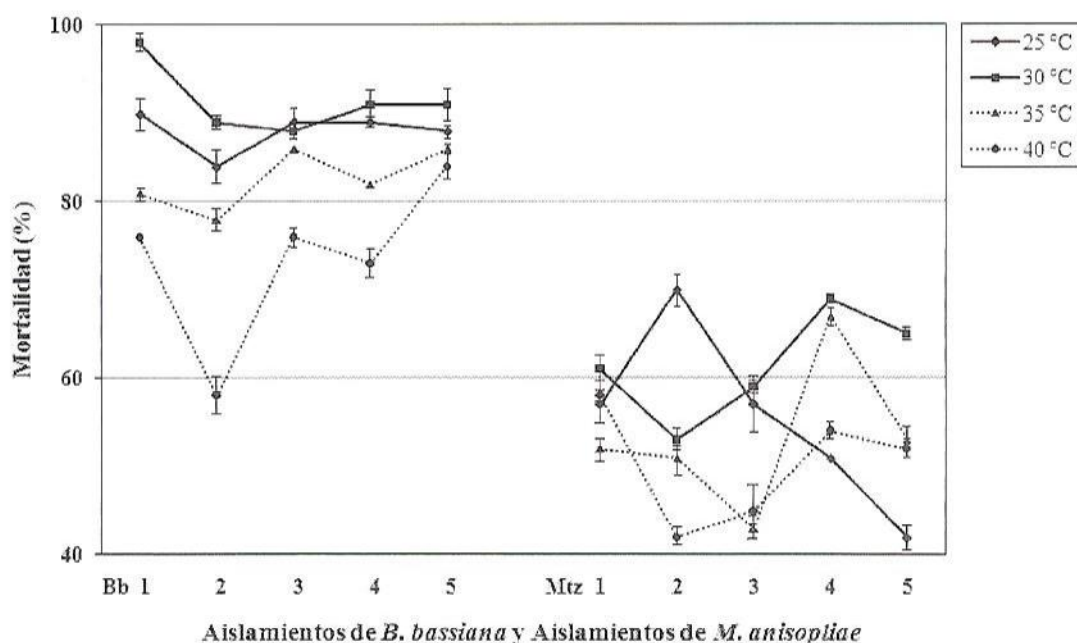


FIGURA 2. Porcentaje de mortalidad de larvas de *P. rapae* causado por *B. bassiana* y *M. anisopliae* a diferentes temperaturas.

Por otro lado, los aislamientos Bb1 y Mtz4 provenientes de los sitios 1 y 9 (cuadro 1) con temperaturas de 36 y 38 °C, fueron los más tolerantes a temperaturas de 35 y 40 °C con alta mortalidad de larvas (Figura 2). Estos resultados concuerdan con los señalados por Devi *et al.* (2005) quienes mencionan una mayor efectividad tóxica de estos hongos en laboratorio a temperaturas de 35-38 °C. En campo, Vanderberg *et al.* (1998) observa-

ron que *B. bassiana* causó la mayor mortalidad de larvas de los primeros instares de *P. xylostella* a temperaturas superiores a 25 °C, en este caso los porcentajes de mortalidad de larvas para ambas cepas tuvieron esta misma tendencia. Sin embargo, hubo diferencia entre las cepas (DMS = 4.5) y los aislamientos (DMS = 1.32), lo cual se atribuye a la naturaleza de las cepas y a su origen, en este caso Bb1 y Mtz2 fueron los aislamientos más tóxicos, los cuales provienen de los sitios 1 y 7, donde las temperaturas máximas fueron de 36 y 40 °C, lo que indica que estas cepas están adaptadas a resistir temperaturas altas, esto concuerda con los resultados de Bidochka *et al.* (2001) y Junqueira (2006), quienes encontraron a *M. anisopliae* con más frecuencia en suelos soleados de regiones áridas, además de que los aislamientos con la mayor toxicidad fueron los de los sitios de clima cálido.

Estos resultados permiten confirmar la efectividad tóxica de todos los aislamientos evaluados

Cuadro 2

ANOVA. Interacciones entre los factores de variación.

Fuente	df	<i>P. rapae</i>	
		F	p
Cepa-aislamiento	4	1.079	0.3724
Cepa-temperatura	3	1.922	0.1327
Aislamiento-temperatura	12	1.485	0.1471 *a
Cepa-aislamiento-temperatura	12	1.121	0.3552 *b

** Valores significativos a) DMS = 4.5, b) DMS = 1.32.

sobre larvas jóvenes de *P. rapae*, a concentraciones de 1.2×10^9 conidios/ml, además de contar con cepas tolerantes a altas temperaturas para su producción masiva y uso en las regiones donde se cultiva repollo (25-40 °C) en Durango.

CONCLUSIONES

Los aislamientos de cepas nativas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, provenientes de suelo e insectos infectados, tuvieron efectividad tóxica sobre larvas de 3-5 días de desarrollo de *P. rapae*.

En todos los aislamientos las temperaturas de 25-30 °C aumentaron gradualmente la germinación, mientras que a mayor temperatura disminuyó la toxicidad. El aislamiento Bb4 fue el mejor debido a que tuvo la mejor viabilidad y toxicidad a 25 °C, mientras que los aislamientos Bb1 y Mtz4, provenientes de sitios cálidos fueron tolerantes a altas temperaturas (35-40 °C).

Se cuenta con aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* tolerantes a altas temperaturas para producción masiva y uso en el control de *P. rapae* en Durango.

AGRADECIMIENTOS

A SIP-IPN, por el financiamiento otorgado para la realización del Proyecto de Investigación: Formulación y evaluación de bioinsecticidas microencapsulados para el control de plagas de hortalizas, clave SIP 20060182.

LITERATURA CITADA

- BIDOCHKA, M. J., KAMP, A. M., AMRHITHA DE CROSS, J. M. 2001. Insect pathology fungi: From genes to populations. In: *Fungal pathology*. Kronstad J.W. (Ed). Kluwer academic publishers the Netherlands. pp. 171-193.
- DEVI, U. K., SRIDEVI, V. C., MURALI, M., AND PADMAVATHI, J. 2005. Effect of high temperature and water stress on in vitro germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Journal of Invertebrate Pathology*. (88): 181-189.
- GARCÍA G. C., V. M. HERNÁNDEZ VELÁSQUEZ Y M. B. GONZÁLEZ MALDONADO. 2006. Procesos de producción de hongos entomopatógenos. In: *Biotecnología Financiera Aplicada a Bioplaguicidas*. Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Durango. pp. 91-118.
- GARCÍA, G. C., M. B. GONZÁLEZ MALDONADO AND I. CHAÍREZ H. 2007. Efficacy trials of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) control on commercial cabbage cultures. 40th. Annual meeting of society for invertebrate pathology. Quebec, Can. 113 pp.
- GOETTEL, M. S. AND INGLIS G. D. 1977. Fungi: Hyphomycetes. In: *Manual of techniques in insect pathology*. L. Lacey (Ed.). Academic Press. San Diego California, USA. pp. 213-249.
- IGNOFFO C. M. 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. *Florida Entomol.* 75(4): 516-525.
- JEFFREY, C. L. 2005. Low humidity, moderate temperature, and desiccant dust favor efficacy of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for the lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bruchidae). *Biological control*. 34: 180-186.
- JUNQUEIRA, L. G., M. NUNES ROCHA, L. F. AND LUZ, C. 2006. Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. *Mycological Research*. pp. 485-492.
- KELLER, S. AND ZIMMERMAN, G. 1989. Mycopathogens of soil insects In: *Insect-fungus interactions*. Wilding N. Collins N.M. Hammond and Weber. J.F. (ed). Academic press. London. U.K.
- MITSUAKI, S. 2004. Effects of temperature on growth of *Beauveria bassiana* F 263 a strain highly virulent to the Japanese Pine Sawyer, *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) especially tolerance to high temperatures. *Appl. Entomol. Zool.* 39(3): 409-475.
- INEGI. 2006. Anuario estadístico de producción agrícola en Durango. 63 pp.
- SAS. 1998: User's guide. Release 6.03 Edition. SAS Institute Inc.
- VANDERBERG, J. D., RAMOS, M., ALTRE, J. A. 1998. Dose-response and age, and temperature related susceptibility of the diamond back moth (Lepidoptera: Plutellidae) to two isolates of *Beauveria bassiana* (Hypomycetes: Moniliales). *Biological control*. 27(4): 1017-1021.
- ZIMMERMAN, G. 1989. The *Galleria* baits method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *J. Appl. Entomol.* 102: 213-215.