



Efecto de tres concentraciones de conidios de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas III de *Plutella xylostella* en condiciones de laboratorio

Effect of three concentrations of *Metarhizium anisopliae* conidia on *Plutella xylostella* larvae-III under laboratory conditions

Karen Avalos Vela¹, Flor Soriano López¹, Carlos Reyna Vigo¹, Yuseff Rojas Fiestas¹, Jorge Piminchumo Rojas¹, Luis Vásquez Sanjinéz¹ y Juan Wilson Krugg²

¹Escuela AP de Microbiología y Parasitología. ²Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú

RESUMEN

Se determinó el efecto de las concentraciones de 105, 106 y 107 conidias de *Metarhizium anisopliae* /mL sobre las larvas III de *Plutella xylostella* en condiciones de laboratorio. Para esto se recolectaron 240 especímenes adultos de *P. xylostella*, los que fueron transportados al laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional de Trujillo, para su determinación y crianza hasta la obtención de larvas III. La evaluación se realizó colocando 20 larvas III en cada una de cuatro placas, una para cada concentración y la cuarta para el control. Se inoculó por aspersion concentraciones de 105, 106 y 107 conidios/mL, a cada uno de los grupos problema respectivamente, mientras que al control solo se le inoculó Tween 80 al 0.1%, incubándose luego a temperatura ambiente. Se evaluó diariamente hasta los cinco días después de la inoculación anotándose los síntomas y/o signos observados y posteriormente las larvas muertas fueron colocadas en cámara húmeda, analizándose los datos de supervivencia obtenidos mediante el paquete estadístico SPSS v.15. Se encontró que las larvas III de *P. xylostella* inoculadas con el hongo presentaron pérdida de apetito, disminución de la movilidad, melanización y muerte, observándose además que a las concentraciones de 105, 106 y 107 las larvas presentaron un porcentaje de supervivencia del 5, 0 y 0% respectivamente, no encontrándose diferencia significativa entre los porcentajes de supervivencia a las tres concentraciones evaluadas. Se concluye que *M. anisopliae* a las concentraciones de 105, 106 y 107 disminuye significativamente la supervivencia de las larvas III de *P. xylostella*, no existiendo diferencia significativa entre las tres concentraciones empleadas.

Palabras clave: *Metarhizium anisopliae*, *Plutella xylostella*, larvas III, conidias

ABSTRACT

The concentrations effect of 105, 106 and 107 of *Metarhizium anisopliae* conidia / mL on larvae III of *Plutella xylostella* was determined in laboratory conditions. For this were collected 240 adult specimens of *P. xylostella*, which were transported to the laboratory of Plant Pathology, of National University of Trujillo, for his determination and breeding until obtain larvae III. The evaluation was performed with 20 larvae III in each of four Petri dishes, one for each concentration and the fourth for control. Was inoculated by spraying concentrations of 105, 106 and 107 *M. anisopliae* conidia / mL, each one of the groups respectively problem, while only control was inoculated with Tween 80 0.1%, then incubated at environmental temperature. Was assessed daily until five days after inoculation scoring symptoms and / or signs observed and subsequently dead larvae were placed in a humid camera, analyzing survival data obtained using SPSS v.15. It was found that larvae III *P. xylostella* inoculated with *M. anisopliae* showed symptoms as loss of appetite, decreased mobility, melanization



and death, also observed that at concentrations of 105, 106 and 107 of *M. anisopliae* on larvae showed a survival rate of 5%, 0% and 0%, respectively, was found no significant difference between survival rates at three concentrations tested. We conclude that *M. anisopliae* to concentrations of 105, 106 107 significantly decreases the survival of larvae III of *P. xylostella*, with no significant difference between the three concentrations employed.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*, *Plutella xylostella*, larvas III, conidias

INTRODUCCIÓN

Plutella xylostella (Lepidoptera: Yponomeutidae), conocida como polilla dorso diamante, es una de las plagas más destructivas de los cultivos de crucíferas; se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo y puede atacar a una diversa gama de plantas de la familia Brassicaceae, especies silvestres o cultivadas¹. En estado larvario perfora las hojas reduciendo el área fotosintética y el vigor del vegetal, siendo un factor limitante en el cultivo^{2,3}.

El control de *P. xylostella* se ha realizado haciendo uso excesivo de insecticidas de amplio espectro; conllevando a que fácilmente desarrolle resistencia a estos, por lo que ha sido clasificada entre los 20 primeros insectos resistentes a nivel mundial. Por ello, el manejo integrado es una alternativa de control, donde la aplicación de químicos sea la última opción^{1,4} y la primera el control biológico, que implica la protección del control natural existente del campo y la creación de condiciones ambientales más favorables para los enemigos naturales^{5,6}.

Las especies de hongos que han sido reportado como controladores biológicos son: (i) *Paecilomyces lilacinus* sobre *Bactrocera* spp.⁷, *Bemisia tabaci*⁸, *Taenia saginata*⁹, *Meloidogyne incognita* y *Heterodera*¹⁰; (ii) *Beauveria bassiana* que tiene actividad entomopatógena sobre *Hypothenemus hampei*¹¹; (iii) *Verticillium lecanii* con efecto sobre *Trialeurodes vaporariorum*¹²; *Cordyceps scarabaeicola* y *Nomuraea rileyi* para el control de *Myzus persicae* y *Aphis gossypii*¹³; (iv) *Metarhizium anisopliae* como controlador de *Phlebotomus duboscqi*¹⁴, *Heteronychia lica*¹⁵, *Otiorynchus sulcatus*¹⁶, *Boophilus microplus*¹⁷, *Aeneolamia* spp¹⁸, *Spodoptera frugiperda*¹⁹, *Spodoptera litura*²⁰, *Anopheles gambiae*²¹ y *Plutella xylostella*²².

M. anisopliae inicia su acción entomopatógena cuando su conidia se adhiere y germina en la superficie del tegumento del insecto, luego la hifa joven comienza a excretar enzimas y penetra por presión mecánica iniciado por el apresorio. Una vez dentro del insecto, el hongo desarrolla cuerpo hifales que van diseminándose a través del hemocele ocasionando la muerte del insecto después de 3 a 14 días de iniciada la infección, luego el hongo inicia un crecimiento micelial e invade todos los órganos del hospedero. Finalmente, las hifas atraviesan la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie, donde en condiciones ambientales apropiadas inician la formación de conidias²³.

Loc y Bich Chi (2007)²² evaluaron el potencial biocontrolador de *M. anisopliae* y *B. bassiana* contra *P. xylostella* y observaron una mortalidad entre el 79.1% al 87.3% para *M. anisopliae* y de 71.4% a 82.7% para *B. bassiana*. Mnyone et al.²⁴ y Sterling et al.²⁵ reportan que la actividad entomopatógena de los hongos está influenciado por la concentración de las conidias, en este sentido, Mnyone et al.²⁴ evaluaron los efectos de la concentraciones de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre *Anopheles gambiae* y Sterling et al. Hicieron lo propio con *M. anisopliae* sobre *Heterotermes tenuis*, demostrando que la concentración de conidias es un factor que influye en la infectividad del hongo.

Si bien es cierto que *M. anisopliae* tiene efecto sobre *P. xylostella*²² no se ha reportado el efecto de las concentraciones, ya que es posible que si ese efecto se mantiene a concentraciones más bajas se estaría ahorrando recursos económicos que se traduciría en un beneficio al agricultor por la reducción de costos y del consumidor que puede adquirir el producto a menor precio. Considerando que este método no contamina el medio ambiente ni genera resistencia en el insecto a diferencia de los pesticidas, y además teniendo en cuenta la voracidad de la larva III; este trabajo tiene como objetivo conocer, el efecto de las concentraciones de 10⁵, 10⁶ y 10⁷ conidias de *Metarhizium anisopliae*/mL sobre las larvas III de *Plutella xylostella* "polilla dorso diamante" en condiciones de laboratorio.



MATERIAL Y MÉTODOS

Muestra y muestreo:

- Todas las conidias de *Metarhizium anisopliae* presentes en una bolsa de 800 g de arroz procedente de SENASA.
- 240 Larvas III de *Plutella xylostella*.

El muestreo se hizo al azar.

Recolección, crianza de adultos y obtención de larvas de *Plutella xylostella*:

De los cultivos de brócoli ubicados en la campiña de Moche, Provincia Trujillo, Región La Libertad, se recolectó 240 ejemplares de *Plutella xylostella*, estadio adulto, los que fueron llevados al laboratorio para su crianza e identificación de acuerdo a sus características taxonómicas.

Para la crianza de adultos de *P. xylostella* se construyeron cámaras, con las siguientes dimensiones 25cm x 30cm x 50cm, cubiertas con tul fino, siendo la base y la parte posterior de triplay y forradas en su interior con papel toalla, se les está alimentando diariamente a base de una solución de miel y hojas frescas de col.

Para la obtención de larvas se colocaron dentro de las cámaras retazos de cartulina en forma zig-zag que los adultos utilizan para la postura de sus huevos, y así se obtendrán una mayor población de larvas, necesarias para el análisis experimental; luego las posturas se extraen recortándolas de la cartulina, después las colocamos sobre hojas de col frescas, que le sirven de alimento cuando eclosionan, y la introducimos en placas Petri (14 cm de diámetro).

Reactivación de *Metarhizium anisopliae*:

El cultivo de dicho hongo fue proporcionado por el laboratorio de hongos entomopatógenos de SENASA, Lima- Perú. Se realizó una reactivación entomopatógena de *M. anisopliae*, el cual consistió en realizar una suspensión de este mismo hongo que se obtuvo de la bolsa enviada por SENASA y éste se aplicará sobre un insecto susceptible que en este caso fue *Spodoptera frugiperda*. A los 5 días luego de la inoculación de la suspensión se procedió a aislar el micelio que se encontraba encima del insecto, y posteriormente se sembró sobre tubos de ensayo conteniendo Agar Sabouraud.

Propagación y Estandarización del inóculo

Para la propagación del *M. anisopliae* fue necesario utilizar solución estéril de Tween 80 al 0.1%, la cual se le agregó a los tubos de ensayos donde fue sembrado el hongo; luego del paso anterior se realizó una suspensión homogénea del hongo. Se preparó Agar Sabouraud de manera inclinada en frascos planos a los cuales se les agregó 0.1 ml de la suspensión del hongo, que se incubó a 25 ± 0.1 °C hasta la obtención de micelio y con lo que se obtuvo mayor cantidad de esporas.

Se obtendrán las esporas con solución acuosa estéril de Tween 80 al 0.1% y fueron colocadas en un matraz estéril. La suspensión se estandarizó en cámara de Neubauer a las concentraciones de 10^7 , 10^6 , 10^5 conidias/ml las cuales nos sirvieron como inóculo.

Inoculación

La muestra estuvo constituida por 160 larvas de III estadio de *P. xylostella*, de las cuales 3 grupos de 20 larvas cada uno fueron ejemplares problema y otro de grupo de 20 larvas fueron ejemplares testigos, hicimos de este ensayo una suma de 2 repeticiones por concentración. A los ejemplares problema se les inoculó por aspersión la solución acuosa de Tween 80 al 0,1% conteniendo una de las concentraciones de 10^7 , 10^6 , 10^5 esporas/ml de *M. anisopliae*, dependiendo del tratamiento que utilizamos mientras que los ejemplares testigo se las inoculó por aspersión una solución acuosa de Tween 80 al 0,1%, todo esto fue puesto a incubación y se controló la temperatura y el porcentaje de humedad.

Evaluación de la actividad entomopatógena de *Metarhizium anisopliae*:

Después de la inoculación se evaluó cada 24 horas la aparición de síntomas y/o signos de infección micótica que presentaron las larvas problema en comparación a los testigos. La observación de cada una de las larvas y el progreso de la infección micótica se realizó diariamente anotando la aparición de síntomas como pérdida de apetito, parálisis, pigmentaciones, u otros, que se produjeron durante el ensayo.

Aislamiento del hongo a partir de larvas III de *P. xylostella* infectada experimentalmente

Se aplicaron los postulados de Koch en las especímenes muertos durante el bioensayo, para lo cual se procedió de la siguiente forma: se colocaron los insectos muertos en una placa de Petri estéril incubarlos en cámara húmeda estéril por espacio de 3 a 7 días a temperatura ambiente con la finalidad

de que el hongo colonize el interior del insecto, se desarrolle y cubra la superficie cuticular con micelio, y posteriormente a partir del micelio se realizó el microcultivo, incubándose a temperatura ambiente durante 3 a 5 días; finalmente se procedió a la observación microscópica e identificación del hongo sembrado, según las claves taxonómicas de Gilmany Barnett.

Análisis de datos:

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el Análisis de Varianza (ANAVA) utilizando el Programa Estadístico SPSS versión 5.0 para comparar si existía diferencia significativa entre las medias de supervivencia de las larvas de III estadio de *Plutella xylostella* obtenidas en las tres concentraciones de conidias/mL de *M. anisopliae*.

RESULTADOS

Se encontró que las larvas de *P. xylostella* que fueron inoculadas con *M. anisopliae*, presentaron signos y síntomas compatibles con la falta de buen estado de salud, siendo el síntoma más resaltante la escasa movilidad y el signo más sobresaliente el oscurecimiento (Tabla 1, Fig. 1).

Se encontró, asimismo, la inoculación a la concentración de 10^7 conidias/mL redujo la supervivencia de las larvas a un 0%. (Fig. 2)

Tabla 1. Síntomas y/o signos observados en larvas de III de *Plutella xylostella* inoculadas en las diferentes concentraciones de *Metarhizium anisopliae*

Síntomas y/o signos observados	Conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> mL			
	0*	10^5	10^6	10^7
Pérdida del apetito	-	+	+	++
Escasa movilidad	-	+	++	++
Oscurecimiento (melanización)	-	++	++	++
Muerte	-	+	+	+
Aparición de micelio	-	+	+	++
Momificación	-	+	++	++

*Representa al control.

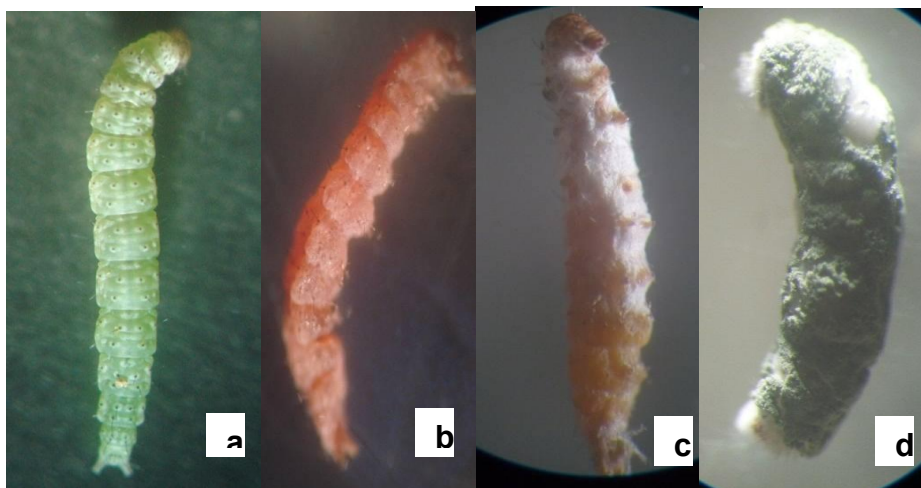


Fig.1. Larvas III de *Plutella xylostella*: (a) control. (b) muerta por *Metharrizium anisopliae*, coloración oscura. (c) aparición parcial de micelio blanco. (d) completamente cubierta de micelio blanco.

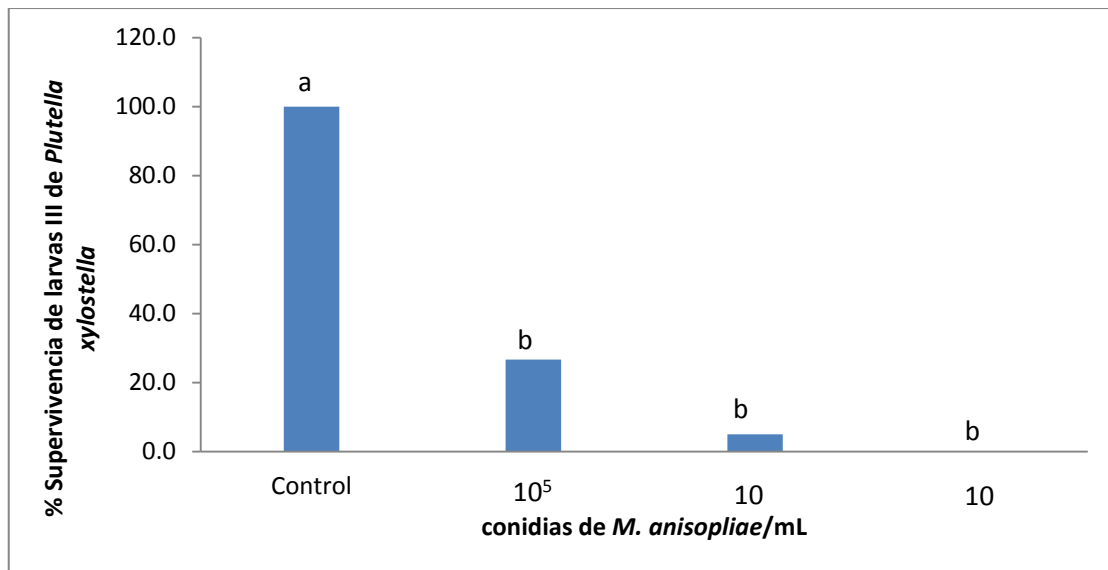


Fig 2. Porcentaje de supervivencias de *Plutella xylostella* utilizando tres diferentes concentraciones de conidios de *Metarhizium anisopliae* al cuarto día de inoculación. (a:si hay diferencia significativa; b:no hay diferencia significativa)

DISCUSIÓN

En la tabla1 podemos apreciar los síntomas producidos en las larvas inoculadas con *M. anisopliae* debido a que los hongos entomopatógenos, a diferencia de otros agentes, no necesitan ser ingeridos por el insecto para controlarlo, pudiendo ocurrir la infección por contacto y adhesión de las esporas a las partes bucales, membranas intersegmentales o a través de los espiráculos²³. La adhesión de los conidios de los hongos entomopatógenos a la cutícula del huésped es la etapa inicial del proceso patológico e incluye eventos tanto pasivos como activos²⁶. Lo cual ha sugerido que iones divalentes como el Ca^{+2} y el Mg^{+2} reducen las fuerzas de repulsión de la electrostática de la superficie del insecto, por lo que pueden afectar su hidrofobicidad y promover la adhesión del complejo pared celular fúngica – cutícula, creando condiciones favorables para el establecimiento de la espora y la subsecuente invasión del hospedero²³. También se relaciona la adhesión de las esporas de *M. anisopliae* a las proteínas adhesinas MAD1 y MAD2, las cuales se sitúan en la superficie celular²⁸. Luego de la adhesión *M. anisopliae* logra penetrar la cutícula del insecto *P. xylostella* debido a que produce enzimas tales como proteasas y quitinasas, y utiliza una combinación de estas para penetrar en la cutícula y acceder al hemocele del hospedero que es rico en nutrientes²⁶, lo que produce disturbios en el organismo del insecto.

La germinación de la espora se inicia con el hinchamiento de la misma, que es favorecido por una humedad alta; luego estimulada por mensajeros que generalmente son carbohidratos presentes en las proteínas cuticulares del insecto. La hidratación de la espora es favorecida por la acción anti-desecante de su cubierta mucilaginosa, que además funciona como protector ante la presencia de polifenoles tóxicos y enzimas, secretadas por el sistema inmune del insecto. *Metarhizium anisopliae* presenta un alto contenido de aminopeptidasas e hidrofobinas, las cuales favorecen la acción de enzimas extracelulares sobre la cutícula del insecto²³. Después de la penetración de las hifas, éstas se diseminan vía hemolinfa, producen blastosporas y cuerpos filamentosos de hifas que invaden el sistema inmune del hospedero multiplicándose rápidamente en los tejidos. Una vez que *M. anisopliae* ingresa al hemocele de las larvas de *P. xylostella* desencadena síntomas y signos (tabla1) como, la escasa movilidad de las larvas debido a que *M. anisopliae* sintetiza unas sustancias llamadas destruxinas (dtx), las cuales inducen parálisis flácida y la contracción muscular visceral en los insectos; estos efectos citotóxicos en las células epiteliales probablemente sea porque envuelven los canales Ca^{2+} -ATPasa tipo vacuolar; por ello a las destruxinas se les reconoce como determinantes de la virulencia importantes en *Metarhizium spp*^{29,30}.



La pérdida de apetito (tabla1) en las larvas de *P. xylostella* se produce por la pérdida de la integridad estructural de las membranas celulares y la consecuente deshidratación de las células por pérdidas de fluidos, todo esto ocurre por la acción mecánica de las hifas y la acción química de las toxinas de *M. anisopliae* llevándolas a la muerte^{23, 31}. El oscurecimiento (tabla1, fig1 a-b) en relación a las larvas control se produce porque se activa el sistema inmune a través de los procesos de melanización, fagocitosis, nodulación y encapsulamiento; la melanina sustancia responsable del oscurecimiento del tejido, como es el caso de Rodríguez *et al.* (2005)¹⁵ quienes obtuvieron como resultado que los huevos de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* inoculados presentaron inicialmente tonalidad oscura y deshidratación visible a los cuatro días de post-inoculación; esto pudo deberse a la degradación enzimática del corion que está compuesto principalmente por proteínas, lípidos y polisacáridos y a la acción de toxinas como las beauvericinas producidas por *M. anisopliae*, las que causan además perturbación en la metamorfosis y en los mecanismos de defensa.

Durante la penetración del hongo desde la cutícula del insecto hasta el hemocel, la hifa queda inmersa en proteínas, quitina, lípidos, melanina, difenoles y carbohidratos; algunos de ellos son nutrientes pero otros pueden inhibir su crecimiento, sin embargo, los hongos desarrollan una serie de actividades que les permiten evitar este tipo de defensas, tales como cambios en la pared celular y producción de sustancias inmunomoduladoras o toxinas fúngicas^{23,32}. Luego de que los mecanismos de defensa del insecto son sobrepasados, el hongo entomopatógeno entra en la fase de colonización y al agotar los nutrientes y el agua presentes en el interior de la larva, emerge desarrollando sus hifas en la superficie de ésta (fig 1-c). Finalmente el hongo deja de crecer y comienza a esporular, lo que se observa como una pigmentación color verde oliváceo (fig 1-d)^{23,33}.

En la fig. 2 se observó que al incrementarse la concentración de conidias de *M. anisopliae*/mL en rango de 10^5 a 10^7 , el porcentaje de supervivencia disminuyó hasta un 0%, pero en el análisis estadístico no existe diferencia significativa entre las tres concentraciones de conidias de *M. anisopliae*/mL, sólo se encontró diferencia significativa con el control; lo que significa que las concentraciones de 10^5 , 10^6 y 10^7 conidias de *M. anisopliae*/mL tienen el mismo efecto sobre las larvas III de *P. xylostella*. Como es el caso de Petlamul and Prasertsan (2012)²⁰ en donde encuentran que *M. anisopliae* a la concentración de 10^8 conidias/mL alcanza el 100% de mortalidad de *S. litura*.

Estos resultados no concuerdan con las investigaciones de Mnyone *et al.*²⁴ quienes aplicaron *M. anisopliae* en *Anopheles gambiae* encontrando que la supervivencia disminuía hasta un 0% pero a una concentración de 10^9 conidias /mL, una concentración más alta que la empleada en esta investigación; y Sterling *et al.* quienes aplicaron *M. anisopliae* en *H. tenuis* concluyeron que al aumentar las concentraciones de conidias, de 1×10^3 a 3×10^8 conidias/mL, hubo mayor mortalidad y menor tiempo de supervivencia, probablemente por los diferentes grados de susceptibilidad que presenta cada especie de insecto.

Fernández-Ruvalcaba *et al.*¹⁷ quienes obtuvieron como resultados de mortalidad que *M. anisopliae* es altamente efectivo para ambas cepas de *Boophilus microplus* susceptible y resistente a los organofosforados en condiciones de laboratorio y además la mortalidad de garrapatas observada en las dos cepas estuvo positivamente correlacionada a la concentración de esporas. Caston¹⁵ encuentra que *M. anisopliae* afecta a *H. licas* causándole la muerte a la concentración de 10^9 conidias/mL. Sharifard *et al.*³⁴ encuentran que *M. anisopliae* fue efectiva y causa el 44 % y el 72% de mortalidad en población adulta de *Musca domestica* a las concentraciones de 10^5 y 10^7 esporas/g de cebo.

CONCLUSIÓN

- *Metarrhizium anisopliae* a las concentraciones de 10^5 , 10^6 y 10^7 disminuye significativamente la supervivencia de las larvas III de *Plutella xylostella*, no existiendo diferencia significativa entre las tres concentraciones empleadas.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mahmoudvand M, Abbasipour H, Sheikhi-Garjan A, Bandani A. Decrease in pupation and adult emergence of *Plutella xylostella* (L.) treated with hexaflumuron. Chilean JAR. 2012; 72(2): 206- 211.
2. Chagas NR, Boica AL and Alonso TF. Biología de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) em cultivares de couve-flor. Neotrop entomol. 2010; 39 (2): 253-259.
3. Ochoa R, Carballo M, Quezada JR. Algunos aspectos de la biología y comportamiento de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) y de su parasitoide *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae). Manejo integrado de Plagas. 1989; 11:21- 30.
4. Bertolaccini I, Sánchez DE, Arreguil MC, Favaro JC, Theiler N. Mortality of *Plutella xylostella* (Lepidoptera, Plutellidae) by parasitoids in the Province of Santa Fe, Argentina. Rev Bras Entomol. 2011;55(3): 454-456.
5. Guaharay F, Chaput P. Control Biológico Ayer Hoy y Siempre. En: Carballo M, Guaharay F. Editores. Control Biológico de plagas agrícolas. 1ed. Catie, 2004. p.1-13.
6. Butt TM, Jackson C, Magan N. Introduction- Fungal Biological Control Agentes: Progress, Problems and Potential. In: Butt TM, Jackson C, Magan N. Fungal as Biocontrol Agentes: Progress, Problems and Potential. Cabi, 2001.
7. Chiang-Mai J. Evaluation of effective entomopathogenic fungi to fruit fly pupa, *Bractoccea spp.* and their antimicrobial activity. Sci. 2012; 39(3): 464- 477.
8. Carr A, Elósegui O, Bel N. Aislamiento, caracterización morfológica y fisiológica del hongo entomopatogénico *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) Broum & Smith. Fitosanidad. 2003; 7 (3): 27-32.
9. Braga FR, De Araújo JV, Araujo JM, Carvalho RO, Silva AR. Efeito do fungo *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Taenia saginata*. Rev soc bras med trop. 2008; 41(6): 686 -688.
10. Cayrol JC, Djian C, Pijarowski L. Study of the nematocidal properties of the culture filtrate of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus*. Revue Nématol. 1989; 12(4): 331- 336.
11. Bastidas A, Velásquez E, Marín P, Benavides P, Bustillo A, Javier F. Evaluación de preformulados de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, para el control de la broca del café. Agrom. 2009; 17(1): 44-45.
12. Bouhous M, Laurous L. Efficiency of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in the biological control of *Trialeurodes vaporariorum*, (Homoptera: Aleyrodidae), a greenhouse culture pest. Afr J Microbiol Res. 2012; 6(10):2435-2442.
13. Vu VH, Hong S, Kim K. Selection of entomopathogenic fungi for Aphid control. J Biosci and Bioeng. 2007; 104(6): 498-505.
14. Ngumbi PM, Irungu LW, Ndegma PN, Maniania NK. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sorok and *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill to adult *Phlebotomus duboscqi* (Neveau- Lemaire) in the laboratory. J Vector Borne Dis. 2011; 48: 37-40.
15. Caston M. The efficacy of two isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metchin) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the adults of the black maize beetle *Heteronychus lica* Klug (Coleoptera: Scarabidae) under laboratory conditions. Afr J Agric Res. 2008; 3(4): 259-265.
16. Bruck DJ, Donahue KM. Persistence of *Metarhizium anisopliae* incorporated into soilless potting media for control of the black vine weevil, *Otiorynchus sulcatus* in container-grown ornamentals. J invert Pathol. 2007; 95: 146-150.
17. Fernández M, Zhioua E, García Z. Infectividad de *Metarhizium anisopliae* en contra de cepas de garrapata *Boophilus microplus* sensible y resistente a los organofosforados. Téc Pecu Méx. 2005; 43(3):433-440.
18. Bautista-Gálves A, Gónzales-Cortes N. Tres dosis de *Metarhizium anisopliae* sobre la mosca pinta (*Aeneolamia spp.*) en caña de azúcar en la región de Los Rios, estado de Tabasco. Universidad y Ciencia. 2005. 21(41): 37-40.
19. Vásquez J, Martos A. Susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Hypocreales: Clavicitaceae), en Lima, Perú. Rev per Ent. 2003;43:101-106.
20. Petlamul W, Prasertsan P. Evaluation of strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the basis of their virulence, germination rate, conidia production, radial growth and enzyme activity. Mycobiology. 2012; 40(2): 111- 116.
21. Bukhari T, Takken W, Koenraadt CJM. Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae. Parasit Vectors. 2011; 4:23.
22. Loc NT, Bich-Chi VT. Biocontrol potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against diamondback moth, *Plutella xylostella*. Omonrice. 2007; 15: 86-93.



23. Pucheta M, Flores A, Rodríguez S, de la Torre M. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*. 2006; 31(12):856- 860.
24. Mnyone L, Kirby M, Lwetoijera D, Mpingwa M, Knols B, Takken W *et al*. Infection of de Malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, with two species of entomopathogenic fungi: effect of concentration, co-formulation, exposure time and persistence. *Malaria Journal*. 2009; 8:309-320.
25. Sterling A, Gómez C, Campo A. Patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hypomycetes) sobre *Heterotermes tenuis* (Isoptera: Rhinotermitidae) en *Hevea brasiliensis*. *Rev Colomb Entomol*. 2011; 37(1):36-42.
26. Ment D, Gindin G, Rot A, Soroker V, Glazer I, Barel Sh *et al*. Novel technique for quantifying adhesion of *Metarhizium anisopliae* conidia to the tick cuticle. *Appl Environ Microbiol*. 2012; 76(11):3521-3528.
27. Shaukat A, Huang Z, QeZang W, Ren ShX. Production and regulation of Extracellular proteases from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Cordycipitaceae; Hypocreales) in the presence of Diamondback Moth Cuticle. *Pakistan J Zool*. 2011; 43(6): 1203-1213.
28. Wang Ch, St Leger R. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enable attachment to plants. *Eucaryot Cell*. 2007; 6(5): 808-816.
29. Wang B, Kang Q, Lu Y, Bai L, and Wang Ch. Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109(4): 1287-1292.
30. Roberts DW, Leger. R. Toxins. In: Roberts & Leger (eds.). *Metarhizium* spp., Cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects. *Adv Appl Microbiol*. 2004, 54: 13- 17.
31. Carballo M, Hidalgo E, Rodríguez A. Control Biológico de Insectos mediante hongos entomopatógenos. En: Carballo M, Guaharay F. Editores. *Control Biológico de plagas agrícolas*. 1ed. Catie, 2004. p.34-58.
32. Wang Ch, St Leger R. A collagenous protective coat enable *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *PNAS*. 2006; 103(17): 6647-6652.
33. Ojeda-Chi M, Rodríguez-Vivas R, Galindo-Velasco E, Lezama-Gutiérrez R, Cruz-Vázquez C. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). 2011; 2(2): 177-192.
34. Sharififard M, Mossadegh, Vazirianzadeh B, Zareli- Mahmoudabadi A. Interactions between entomopathogenic fungus, *M. anisopliae* and Sublethal Doses of Spinosad for control of house fly, *Musca domestica*. *Iran J Arthropod- Borne Dis*. 2011; 5(1): 28-36.