

SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DE HUEVOS DE LA POLILLA DEL TOMATE, *Tuta absoluta* Meyrick (LEPIDÓPTERA: GELECHIIDAE)

Entomopathogenic fungi isolates selection for egg control of tomato moth, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: gelechiidae) eggs

Marta Rodríguez S.<sup>1</sup>, Marcos Gerding P.<sup>1\*</sup>, Andrés France I.<sup>1</sup>

ABSTRACT

A pathogenicity study of 64 *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* and 70 *Beauveria bassiana* isolates against tomato moth *Tuta absoluta* eggs, was carried out under laboratory conditions. The first evaluation was accomplished by spraying suspensions of  $10^7$  conidias mL<sup>-1</sup> of each isolate directly on eggs, through a Potter tower. Mortality and conidia production on the eggs were significantly higher with the isolates *M. anisopliae* Qu-M558 and *B. bassiana* Qu-B911, Qu-B912 and Qu-B928. These isolates were newly evaluated using increasing conidia concentrations (0 to  $10^8$  conidia mL<sup>-1</sup>) of each of the five selected isolates. The isolates Qu-B912 and Qu-M558 produced the highest mortality percentages based on the area under mortality progress curve for each concentration, 80 and 60%, respectively.

**Key words:** biological control, insect pathology, tomato moth.

RESUMEN

Se realizó un estudio en laboratorio sobre la patogenicidad de 64 aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* y 70 de *Beauveria bassiana*, en huevos de polilla del tomate *Tuta absoluta*. La primera evaluación se realizó por aplicación directa de suspensiones de  $10^7$  conidias mL<sup>-1</sup> para cada aislamiento, con el sistema de pulverización de la torre de Potter. La mortalidad y esporulación sobre huevos fueron significativamente mayores con los aislamientos *M. anisopliae* Qu-M558 y *B. bassiana* Qu-B911, Qu-B912 y Qu-B928. Estos aislamientos fueron evaluados nuevamente en suspensiones crecientes de 0 a  $10^8$  conidias mL<sup>-1</sup>. Los aislamientos Qu-M558 y Qu-B912, produjeron los mayores porcentajes de mortalidad sobre la base del cálculo del área bajo la curva del progreso de mortalidad de huevos, 80 y 60%, respectivamente.

**Palabras clave:** control biológico, polilla del tomate, patología de insectos.

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Casilla 426, Chillán, Chile.

E-mail: mgerding@inia.cl \*Autor para correspondencia.

Recibido: 29 de diciembre de 2004. Aceptado: 24 de junio de 2005.

## INTRODUCCIÓN

En el desarrollo del control biológico, los hongos entomopatógenos son los primeros agentes biológicos en ser utilizados como control de plagas. Estos microorganismos pueden infectar a los insectos directamente, a través de la penetración de la cutícula, y ejercen múltiples mecanismos de acción, confiriéndoles una alta capacidad para evitar que el hospedero desarrolle resistencia (Samson *et al.*, 1988; Alves, 1998).

Más de 90 géneros y 700 especies, incluyendo subespecies, patotipos, cepas y aislamientos de hongos, son conocidos por afectar los insectos (Bielikova *et al.*, 2002). Las especies más estudiadas y utilizadas en el mundo corresponden a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok, evaluándose en diversos órdenes de insectos, incluyendo plagas de lepidópteros de importancia económica presentes en Chile, como: *Phthorimaea operculella*, *Pieris brassicae*, *Dalaca pallens* y *Rhyacionia buoliana* (Hafez *et al.*, 1994; Thomsen y Eilenberg, 2000; Cisternas *et al.*, 2002; Gerding *et al.*, 2002).

En plagas como la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick), el control de larvas se ve dificultado porque se alimentan del mesófilo de las hojas o penetran en los frutos, quedando protegidas de la acción de patógenos (Larraín, 1992). Una alternativa a este problema es el control de los huevos, los que son ovipuestos sobre la epidermis de hojas, tallos y frutos de la planta (Larraín, 1992), quedando expuestos a la acción de enemigos naturales. Además, su control evita la eclosión de larvas y el daño provocado en las plantas.

De acuerdo a lo anterior, se realizó un estudio en laboratorio para evaluar la patogenicidad de 134 aislamientos de los hongos entomopatógenos (HEP) *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, pertenecientes a la colección del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro Regional de Investigación (CRI) Quilamapu, sobre huevos de la polilla del tomate *Tuta absoluta*, de manera de establecer una estrategia de control alternativa a las ya existentes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de huevos

Las crías artificiales de polillas utilizadas en este estudio se realizaron en los laboratorios de entomología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro Regional de Investigación (CRI) Quilamapu, Chillán. Adultos de *T. absoluta* se mantuvieron en jaulas cubiertas con malla antiáfido, usando como sustrato para la ovipostura hojas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) con los pecíolos inmersos en agua destilada para mantener su turgencia (Rodrigues *et al.*, 1999).

### Origen del inóculo

Los aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana* provinieron de la colección de HEP perteneciente al Programa de Control Biológico del CRI Quilamapu de INIA, y de una colecta de suelos realizada en lugares poco intervenidos y aledaños a huertos comerciales de tomate de la zona de Quillota, V Región (32°56' lat. Sur; 71°14' long. Oeste). Para extraer hongos desde las muestras de suelo se utilizó el método del cebado descrito por Goettel e English (1997), utilizando larvas de la polilla de la cera (*Galleria melonella* L.).

Los aislamientos utilizados se produjeron mediante siembras en placas Petri, con agar papa dextrosa, y se incubaron a 25°C hasta la esporulación del hongo. Las conidias se cosecharon desde la superficie del cultivo, realizando una suspensión en agua destilada estéril más 1% de humectante Tween 80 al 0,1%, y se llevaron a un agitador mecánico para disgregar las conidias. La concentración de conidias se determinó utilizando una cámara de recuento Neubauer (Boeco, Neubauer, Germany).

### Pruebas de patogenicidad

Huevos colectados de las crías se traspasaron con una aguja humedecida a folíolos de tomate desinfectados con hipoclorito de sodio al 0,05% por 1 min y posteriormente se lavaron con agua destilada estéril. Para evitar la deshidratación, el ápice basal del folíolo se envolvió con algodón hidrófilo humedecido con agua destilada. Sobre cada folíolo se colocaron 10 huevos de *T. absoluta*. El inóculo consistió de una suspensión de  $10^7$  conidias mL<sup>-1</sup>, aplicada sobre los huevos mediante una torre de pulverización Potter. Como control

se utilizaron huevos tratados con una solución de agua destilada con Tween 80. Los huevos inoculados se incubaron junto con las hojas en placas Petri y se mantuvieron a 20°C con ciclos de 12 h de luz y oscuridad.

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con 134 aislamientos (70 *B. bassiana* y 64 *M. anisopliae*) con dos repeticiones por aislamiento, utilizando 10 huevos como unidad experimental. La emergencia de larvas y la micosis sobre los huevos se evaluaron diariamente desde el primer día de tratados. Los huevos sin eclosión de larvas se trasladaron a cámaras húmedas y se incubaron a 20°C para observar el posible desarrollo de micelio y conidias.

Los resultados obtenidos se compararon utilizando test de Chi cuadrado múltiple sobre tablas de contingencia de 2 x 2 (Gomez y Gomez, 1984), en base a la hipótesis que la proporción de huevos muertos vs. huevos vivos es igual para cada tratamiento.

### Selección del aislamiento

Del ensayo anterior se seleccionaron los aislamientos Qu-M558 de *M. anisopliae* y Qu-B911, Qu-B912 y Qu-B928 de *B. bassiana*, que produjeron los mayores porcentajes de mortalidad y esporulación sobre los huevos, y además fueron estadísticamente diferentes al testigo de acuerdo al test de Chi cuadrado ( $P < 0,05$ ). Siguiendo la metodología descrita previamente, estos aislamientos se cultivaron y con las conidias cosechadas se realizaron suspensiones de:  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ , las que se aplicaron sobre huevos de *T. absoluta* mediante el sistema de pulverización Potter. Como control se utilizaron huevos tratados con agua destilada más Tween 80. Los huevos inoculados se incubaron en placas, sobre folíolos desinfectados de tomate y se mantuvieron a 20°C. Al igual que en el experimento anterior, la eclosión de larvas se registró diariamente, y los huevos muertos se incubaron en cámaras húmedas a 20°C para observar síntomas de micosis.

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, con 20 tratamientos y cinco repeticiones; la unidad experimental consistió en 10 huevos.

La evaluación del porcentaje de mortalidad, a distintas concentraciones de inóculo, se realizó el día 10 postinoculación, ya que ese día se alcanzó el

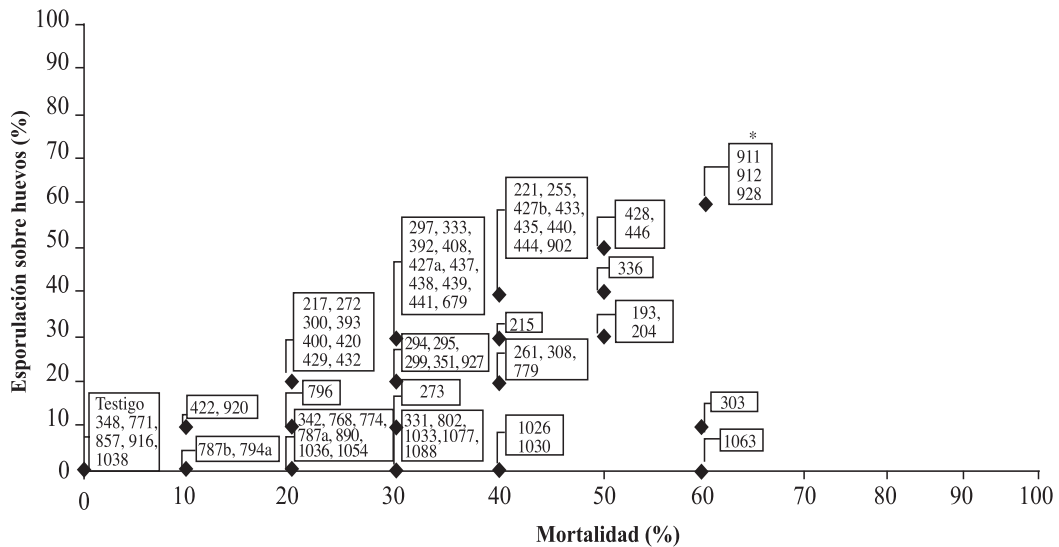
100% de emergencia de larvas en el tratamiento testigo. Las curvas de mortalidad de huevos, inoculados con Qu-M558, Qu-B911, Qu-912 y Qu-B928, se expresaron como porcentaje de mortalidad a distintas concentraciones de cada aislamiento. Para cada aislamiento se calculó el área bajo la curva del progreso de la mortalidad para cada repetición, las que se sometieron a análisis de varianza y separación de media mediante la prueba de Tukey (Gomez y Gomez, 1984).

La curva de mortalidad a diferentes concentraciones de los dos aislamientos significativamente más patogénicos se ajustó a una curva sigmoidea, la que se comprobó con la prueba de chi-cuadrado para bondad de ajuste. Esta curva posteriormente se linealizó mediante transformación probit, asumiéndose normalidad, con el fin de calcular la concentración letal del 50% de la población ( $CL_{50}$ ), a través de su ecuación de regresión (Alves *et al.*, 1998).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Sintomatología.** Los huevos inoculados presentaron inicialmente tonalidad oscura y deshidratación visible a los cuatro días postinoculación; esto pudo deberse a la degradación enzimática del corion que está compuesto principalmente por proteínas, lípidos y polisacáridos (Trogakos y Margaritis, 2002) y a la acción de toxinas como las beauvericinas producidas por *B. bassiana* y las destruxinas producidas por *M. anisopliae*, las que causan además perturbación en la metamorfosis y en los mecanismos de defensa (Azevedo, 1998). Luego de los síntomas iniciales, se produjo el desarrollo de micelio blanquecino del hongo, en las zonas medias y apical del huevo. Finalmente ocurrió la emisión de esporas, de color blanco en los huevos parasitados por *B. bassiana* y color verde en los huevos parasitados por *M. anisopliae*.

**Pruebas de patogenicidad.** A pesar que todos los aislamientos utilizados pertenecían a *B. bassiana* o *M. anisopliae*, y que fueron aplicados en iguales dosis y condiciones ambientales, se apreciaron diferencias en mortalidad y esporulación. Sin embargo, el principal criterio para seleccionar los aislamientos fue la esporulación, ya que permitió restringir el rango de aislamientos capaces de causar una elevada mortalidad sobre los huevos (Figuras 1 y 2).



**Figura 1. Mortalidad y esporulación de huevos de *Tuta absoluta*; los números identifican los diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* (Qu-B).**

**Figure 1. Mortality and esporulation on *Tuta absoluta* eggs; numbers identify the different *Beauveria bassiana* isolates (Qu-B).**

\*Indica diferencias significativas en cuanto a mortalidad y esporulación, de acuerdo al test de Chi cuadrado múltiple ( $P < 0,05$ ).

De los 70 aislamientos de *B. bassiana*, sólo 10 causaron mortalidad igual o superior al 50% de los huevos, y sólo tres presentaron la más alta esporulación de la prueba (60%) (Qu-B911, Qu-B912 y Qu-B928) siendo, además, estadísticamente diferentes al testigo ( $P = 0,0034$ ). Del total de aislamientos probados sólo cinco no causaron mortalidad de huevos (Figura 1).

En el caso de los 66 aislamientos de *M. anisopliae*, 53 presentaron algún grado de mortalidad en huevos de *T. absoluta*, de los cuales cuatro causaron del orden del 80 a 90% de mortalidad, pero no produjeron esporas sobre los huevos, siendo por tanto descartados para pruebas posteriores. Solamente uno logró el más alto porcentaje de mortalidad y esporulación (60%) (Qu-M558), y además estadísticamente diferente al testigo ( $P = 0,0033$ ). Sólo 12 aislamientos no provocaron mortalidad de huevos, al igual que el testigo (Figura 2).

En la mayoría de los aislamientos evaluados, se observó que no hubo una relación directamente proporcional entre los porcentajes de huevos muertos y los porcentajes de esporulación sobre ellos, observándose en algunos casos una alta mortalidad de huevos pero baja esporulación. Diversas razones pueden explicar la reducida esporulación, tales como baja temperatura y humedad relativa en el ambiente

de incubación de los huevos muertos, falta de nutrientes o factores esenciales para el desarrollo de las esporas (Gottwald y Tedders, 1984; Tanada y Kaya, 1993), o la presencia de sustancias alcaloides que pueden colocar las hembras sobre o dentro de los huevos, para protegerlos contra el ataque de depredadores, parasitoides y microorganismos patógenos (Rupert y Kellner, 2002). Las diferencias en los grados de virulencia de cepas pertenecientes a una misma especie de hongo, se pueden deber a las variaciones genéticas dadas por la especialización hacia un determinado hospedero y por la distribución geográfica de las cepas (Alves, 1998; Coates *et al.*, 2002).

La capacidad de esporulación del hongo sobre su hospedero es fundamental para la diseminación de la enfermedad en condiciones de campo, esto permite reinfestaciones a partir de insectos parasitados (Gottwald y Tedders, 1984). De acuerdo a esto y a los resultados obtenidos, se seleccionaron los aislamientos Qu-B911, Qu-B912, Qu-B928 de *B. bassiana* y Qu-M558 de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, como los más promisorios para el control de huevos de la plaga.

**Selección de aislamientos.** Los mayores porcentajes de mortalidad y esporulación (60 y 80%) se lograron a la dosis de  $10^8$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  de los

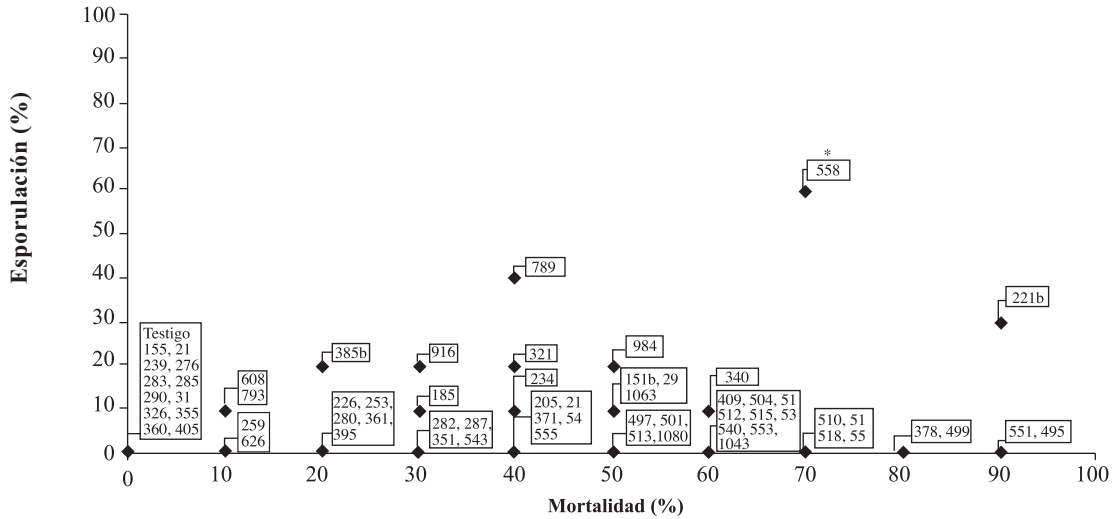


Figura 2. Mortalidad y esporulación de huevos de *Tuta absoluta*; los números indican los diferentes aislamientos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Qu-M)

Figure 2. Mortality and esporulation of *Tuta absoluta* eggs; the numbers indicate the different *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* isolates (Qu-M).

\* Indica diferencias significativas en cuanto a mortalidad y esporulación, de acuerdo al test de Chi cuadrado múltiple ( $P < 0,05$ ).

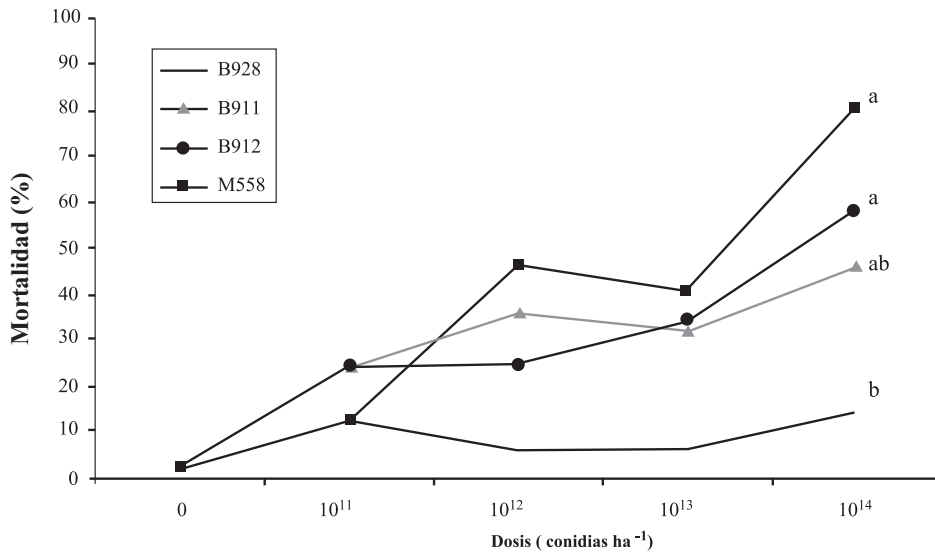


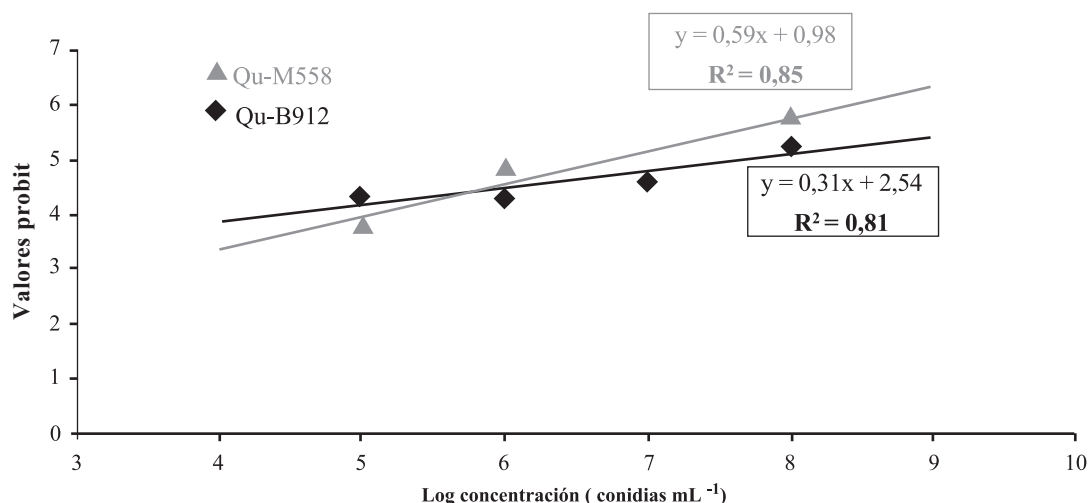
Figura 3. Mortalidad de huevos de *Tuta absoluta*, inoculados con diferentes concentraciones de los aislamientos Qu-B911, Qu-B912 y Qu-B928 de *Beauveria bassiana* y Qu-M558 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

Figure 3. Mortality of *Tuta absoluta* eggs, inoculated with different concentrations of Qu-B911, Qu-B912 and Qu-B928 isolates of *Beauveria bassiana* and Qu-M558 of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

Letras diferentes al final de cada curva indica diferencias estadísticas del área bajo la curva del progreso de la mortalidad, de acuerdo a la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ).

aislamientos Qu-B912 y Qu-M558, respectivamente. La concentración menos efectiva fue de  $10^5$  conidias  $mL^{-1}$  para todos los aislamientos. Al comparar el área bajo la curva de mortalidad de huevos

no se observaron diferencias estadísticas entre Qu-B912 y Qu-M558, ambas superaron el 60% de mortalidad a la máxima concentración. Sin embargo, sí fueron diferentes estadísticamente a



**Figura 4.** Regresión probit para la curva de mortalidad de huevos de *Tuta absoluta* inoculados con distintas concentraciones de los aislamientos Qu-B912 de *Beauveria bassiana* y Qu-M558 de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

**Figure 4.** Probit regression for the mortality curve of *Tuta absoluta* eggs, inoculated with different concentrations of *Beauveria bassiana* (Qu-B912) and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Qu-M558) isolates.

Qu-B911 y Qu-928 (< 40%), las que no mostraron diferencias entre ellas ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 3).

La curva de mortalidad de huevos a diferentes concentraciones de los aislamientos Qu-B912 y Qu-M558 se ajustó a una sigmoidea ( $P < 0,01$ ). Luego de la transformación probit, la ecuación de la recta para Qu-B912 fue:  $y = 0,317x + 2,54$  ( $R^2 = 0,82$ ) y para Qu-M558:  $y = 0,991x + 0,981$  ( $R^2 = 0,85$ ) (Figura 4).

La  $CL_{50}$  para el control de huevos con el aislamiento Qu-M558 fue  $10^{6,8 (\pm 0,44)}$  conidias  $mL^{-1}$ , en tanto que para el aislamiento Qu-B912 este valor fue de  $10^{7,8 (\pm 0,23)}$  conidias  $mL^{-1}$  ( $P \leq 0,05$ ).

Las diferencias en las concentraciones de inóculo necesarias para eliminar el 50% de huevos entre ambos aislamientos se pueden explicar si se considera que la temperatura de incubación utilizada en los ensayos (20°C) favoreció más el desarrollo de *M. anisopliae* que de *B. bassiana*. Glare (1992) y Alves (1998) señalan que las temperaturas óptimas para el crecimiento de *Metarhizium* varía entre 20 a 30°C, y para *Beauveria* de 23 a 28°C. De acuerdo a esto, a temperaturas superiores a las utilizadas se podrían esperar mayores tasas de mortalidad o bien obtener una menor concentración de esporas para matar el 50% de huevos. Esto es considerado impor-

tante, no sólo desde el punto de vista patogénico, sino que también productivo, ya que una cepa que cause una alta mortalidad a bajas concentraciones de esporas es más económica para su producción masiva (Butt y Goettel, 2000).

Tanada y Kaya (1993) mencionan que durante el ciclo de vida de un insecto, las larvas y adultos son más susceptibles al ataque por entomopatógenos que los huevos y pupas. Sin embargo, existen reportes que indican a *M. anisopliae* como potencial patógeno de huevos de insectos, tales como *Diabrotica undecimpunctata* (Coleoptera: Chrysomelidae) y *Blissus antillus* (Hemiptera: Lygaeidae) (Tallamy *et al.*, 1998; Coracini y Samuels, 2002). Rupert y Kellner (2002) señalan que la susceptibilidad de los huevos al ataque de patógenos se debe a que éstos están inmóviles, y los recursos nutricionales que abastecen a las larvas neonatas hasta su eclosión, son también un buen sustrato para microorganismos.

A pesar de ello, el uso de *B. bassiana* y de *M. anisopliae* para controlar huevos de *T. absoluta* no ha sido reportado, probablemente porque su control se ha realizado mediante la integración de otros organismos como los parasitoides de huevos del género *Trichogramma* o bacterias larvicidas como *Bacillus thuringiensis* (Theoduloz *et al.*, 1997; Pra-

tissoli y Parra, 2000). El establecimiento de un sistema de control de *T. absoluta* con hongos entomopatógenos, podría complementarse al control que ejercen estos organismos en la actualidad, y reducir los problemas de resistencia y acumulación de residuos por uso indiscriminado de insecticidas.

### CONCLUSIONES

Existen aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativos patogénicos para huevos de *Tuta absoluta*, así como una variabilidad en la susceptibilidad de

éstos a los diferentes aislamientos de hongos. Los aislamientos más patogénicos para el control de huevos de esta plaga correspondieron a Qu-B912 de la especie *Beauveria bassiana* y Qu-M558 de *Metarhizium anisopliae*, con los que se alcanzaron porcentajes de mortalidad y esporulación del orden de 60 a 80%, respectivamente. La capacidad patogénica de estos aislamientos hacia huevos de *T. absoluta*, permite considerar a los hongos entomopatógenos como una nueva alternativa de control para esta plaga.

### LITERATURA CITADA

- Alves, S.B. 1998. Fungos entomopatogenicos. p. 289-370. In S.B. Alves (ed.) Controle microbiano de insetos. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), Piracicaba, Sao Paulo, Brasil.
- Alves, S.B., J.E. Almeida, A. Minor Jr., e L.F. Alves. 1998. Tecnicas de laboratorio. p. 637-710. In S.B. Alves (ed.) Controle microbiano de insetos. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), Piracicaba, Sao Paulo, Brasil.
- Azevedo, J. L. 1998. Controle microbiano de insetos pragas e seu melhoramento genético. p. 69-93. In I.S. de Melo y J.L. de Azevedo y S.P. Jaguariúna (eds.). Controle biológico. Vol. 1. Ministerio da Agricultura e do Abastecimento, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria (EMBRAPA), Piracicaba, Sao Paulo, Brasil.
- Bielikova, L., Z. Landa, L. Osborne, and V. Curn. 2002. Characterization and identification of entomopathogenic and mycosporasitic fungi using RAPD-PCR technique. Plant Prot. Sci. 38:1-12.
- Butt, T.M., and M.S. Goettel. 2000. Bioassays of entomogenous fungi. p. 141-196. In A. Navon y K.R. Ascher (eds.). Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. CAB International, Wallingford, UK.
- Cisternas, E., M. Gerding, A. France, y M. Villagra. 2002. Evaluación de *Beauveria bassiana* (Aislación 931) sobre *Dalaca pallens* Blanchard (Lepidoptera: Hepialide) en praderas de la X Región. p. 43. XXIV Congreso Nacional de Entomología. 12-14 de noviembre. Servicio Agrícola y Ganadero y Sociedad Chilena de Entomología, Santiago, Chile.
- Coates, B., R. Hellmich, and L. Lewis. 2002. Allelic variation of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) minisatellite is independent of host range and geographic origin. Genome 45:125-132.
- Coracini, D., and R. Samuels. 2002. Natural enemies of the Chinch Bug, *Blissus antillus* Leonard (Hemiptera: Lygaeidae: Blissinae), pasture pest in Rio de Janeiro State, Brazil. Neotropical Entomol. 31:165-167.
- Gerding G., M., M. Gerding P., y A. France. 2002. Evaluación de aislamientos de *Metarhizium* y *Beauveria* en diferentes concentraciones sobre *Rhyacionia buoliana* Denis & Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae). p. 55. XXIV Congreso Nacional de Entomología. 12-14 de noviembre. Servicio Agrícola y Ganadero y Sociedad Chilena de Entomología, Santiago, Chile.
- Glare, T.R. 1992. Fungal pathogens of scarabs. p. 63-77. In T.R. Glare and T.A. Jackson (eds.). Use of pathogens in scarab pest management. Intercept Andover, Hampshire, England.
- Goettel, M.S., and D.G. English. 1997. Fungi: Hyphomycetes. p. 213-249. In Lacey, L.A. (ed.) Manual of techniques in insect pathology. Academic Press, London, UK.
- Gomez, K., and A. Gomez. 1984. Statistical procedures for agricultural research. 680 p. Wiley & Sons, New York.
- Gottwald, T.R., and W.L. Tedders. 1984. Colonization, transmission and longevity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hypomycetes) on pecan weevil larvae (Coleoptera: Curculionidae) in the soil. Environ. Entomol. 13:557-560.
- Hafez, M., F.N. Zaki, A. Moursy, and M. Sabbour. 1994. Biological effects of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on the Potato Tuber Moth *Phthorimaea operculella* (Seller). Journal of Islamic Academy of Sciences. Vol. 7, N° 4. Available at [http://www.medicaljournal-ias.org/7\\_4/Hafez.htm](http://www.medicaljournal-ias.org/7_4/Hafez.htm). Accessed December 2004.

- Larraín, P. 1992. Plagas en cultivos bajo plástico. Investigación y Progreso Agropecuario La Platina N° 73. p. 41-52.
- Pratissoli, D., and J.R.P Parra. 2000. Fertility life table of *Trichogramma pretiosum* (Hym., Trichogrammatidae) in eggs of *Tuta absoluta* and *Phthorimea operculella* (Lep., Gelechiidae) at different temperatures. J. Appl. Entomol. 124:339-342.
- Rodrigues, R., A.I. Ciociola, L.V. Costa, e W.R. Maluf. 1999. Aspectos biológicos de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) em dois genótipos de tomateiro contrastantes quanto ao teor de 2-Tridecanona nos folíolos. Ciênc. e Agrotec., Lavras. 23(2):247-251.
- Rupert, L., and L. Kellner. 2002. The role of microorganisms for eggs and progeny. p. 149-164. In M. Hilker and T. Meiners (eds.). Chemoecology of insect eggs and egg deposition. Blackwell Publishing Ltd., Berlin, Germany.
- Samson, R.A., H.C. Evans, and J.P. Latgé. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. 187 p. Springer-Verlag, New York, USA.
- Tallamy, D., D. Whittington, F. Defurio, D. Fontaine, P. Gorski, and P. Gothro. 1998. Sequestered Cucurbitacins and pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Moniliales: Moniliaceae) on spotted cucumber beetle eggs and larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). Environ. Entomol. 27:366-372.
- Tanada, Y., and H. Kaya. 1993. Fungal infections. p. 318-366. In Y. Tanada and H. Kaya (eds.). Insect pathology. Academic Press, Inc., San Diego, California, USA.
- Theoduloz, C., P. Roman, J. Bravo, C. Padilla, C. Vásquez, L. Meza Zepeda, and L. Meza Basso. 1997. Relative toxicity of native Chilean *Bacillus thuringiensis* strains against *Scrobipalpus absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). J. Appl. Microbiol. 82:462-468.
- Thomsen, L., and J. Eilenberg. 2000. Time-concentration mortality of *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) and *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae from different destruxins. Environ. Entomol. 29:1041-1047.
- Trougakos, I., and L. Margaritis. 2002. Novel morphological and physiological aspects of insect eggs. p. 3-36. In M. Hilker and T. Meiners (eds.). Chemoecology of insect eggs and egg deposition. Blackwell Publishing Ltd., Berlin, Germany.