

**RESPUESTA DE DOS AISLAMIENTOS CHILENOS DE *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN A LA ADICIÓN DE UN PROTECTOR SOLAR<sup>1</sup>**

**Response of two Chilean *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin isolates to the addition of a solar sunscreen<sup>1</sup>**

**Luis Devotto M.<sup>2\*</sup> y Marcos Gerding P.<sup>2</sup>**

**A B S T R A C T**

Two Chilean isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (QU-M363 and QU-M221b) were exposed to increasing doses of ultraviolet light (UV) under laboratory conditions. Conidia suspended in aqueous solution were spread on Petri dishes containing agar-agar and were placed under a UV lamp ( $\lambda = 254$  nm). Without sunscreen, exposure of conidia to UV-C light reduced germination after 40 s from 80-95% to 5-2%, for QU-M221b and QU-M363, respectively. Using the solar screen Blankophor P167® at 1% w/v, conidia germination decreased after 40 s from 68-82% to 50-33% for QU-M221b and QU-M363, respectively. Results indicate that the sunscreen Blankophor P167 is a potential adjuvant to be used in biopesticides based on *M. anisopliae*.

**Key words:** solar radiation, entomopathogenic fungi, sunscreen, biopesticides, UV light.

**R E S U M E N**

Dos aislamientos chilenos de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (QU-M363 y QU-M221b) fueron expuestos a dosis crecientes de luz ultravioleta (UV), en condiciones de laboratorio. Conidias en suspensión acuosa fueron esparcidas en placas Petri con agar y éstas fueron puestas bajo una lámpara de luz UV-C ( $\lambda = 254$  nm). Sin el protector solar, la exposición de las conidias durante 40 s redujo su germinación de 80-95% a sólo 5-2%, para QU-M221b y QU-M363, respectivamente. Usando el protector solar Blankophor P167® al 1% p/v, la germinación de las conidias, tras 40 s de exposición, se redujo desde 68-82% a 50-33% para QU-M221b y QU-M363, respectivamente. Los resultados indican que este protector solar es un potencial adjuvante para ser usado en biopesticidas basados en *M. anisopliae*.

**Palabras clave:** radiación solar, hongos entomopatógenos, protector solar, biopesticida, luz ultravioleta.

<sup>1</sup> Recepción de originales: 06 de diciembre de 2002.

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Casilla 426, Chillán, Chile. \*Autor para correspondencia. Dirección actual: Universidad Austral, Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Casilla 567, Valdivia, Chile.

E-mail: luisdevotto@universia.cl

## INTRODUCCIÓN

Diversos organismos (hongos, bacterias, protozoos y nemátodos) y partículas virales son usados como ingrediente activo de bioplaguicidas desarrollados contra numerosos artrópodos plaga. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin es uno de los hongos entomopatógenos más utilizados como base para desarrollar bioplaguicidas, varios de los cuales se usan comercialmente en el control de plagas aéreas y subterráneas en regiones tales como el África sub-sahariana y Oceanía (Bateman *et al.*, 1993; Shah *et al.*, 1998).

La región del espectro solar comprendida entre los 100-400 nm es conocida como radiación ultravioleta (UV), la que se divide en tres tipos: UV-A (400-320 nm), UV-B (320-290) y UV-C (290-100 nm). La radiación solar, incluyendo la luz UV, juega diversos roles en la vida de los hongos, tanto positivos como negativos. Este factor reduce la sobrevivencia de las esporas de diversos hongos entomopatógenos (Inglis *et al.*, 1995), incluyendo el género *Metarhizium* (Bateman *et al.*, 1993; Fargues *et al.*, 1996; Morley-Davies *et al.*, 1996). La radiación UV induce efectos negativos en las células como consecuencia de su acción sobre diversas moléculas: porfirinas, carotenoides, esteroides, quinonas, proteínas y ácidos nucleicos (Diffey, 1991). En hongos, estos efectos negativos pueden causar retraso del crecimiento, mutaciones o muerte celular (Braga *et al.*, 2001a).

El ADN expuesto a la radiación UV puede sufrir lesiones directas e indirectas. El daño directo resulta de la formación de fotoproductos tales como dímeros de pirimidinas (aparición de enlaces covalentes entre bases pirimidínicas adyacentes: citosina-citosina o citosina-timina), hidratos de pirimidina y entrecruzamientos entre ADN y proteínas. El daño indirecto se debe principalmente a la aparición de especies de oxígeno reactivo (peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete y radicales hidroxilos) que oxidan la pentosa presente en el ADN y rompen la hebra de la molécula (Diffey, 1991). Ambos tipos de daño

interfieren la replicación normal del ADN, si superan los mecanismos de reparación de la célula y producen mutaciones o la muerte de la célula, dependiendo de la cantidad de energía recibida (Cerdeira-Olmedo *et al.*, 1996).

Numerosas estrategias, solas o en combinación, han sido usadas para evitar o paliar el efecto negativo del exceso de radiación UV en los biopesticidas: aplicación en épocas del año y horas del día con menor insolación, uso de cubiertas, incorporación al suelo, encapsulación, adición de anti-oxidantes y uso de adyuvantes (Shah *et al.*, 1998; Ragaee, 1999). Entre los adyuvantes más comunes, se citan diversos aceites (Bateman *et al.*, 1993), además de protectores solares de la industria cosmética, blanqueadores de pulpa de papel y realzantes del color de la ropa (Argauer y Shapiro, 1997). La eficacia de estos adyuvantes en el campo se ha demostrado para algunos virus entomopatógenos (Shapiro y Vaughn, 1995), pero los estudios en *Metarhizium* están en etapas iniciales o no han resultado efectivos (Shah *et al.*, 1998), por lo cual se ha intensificado la búsqueda de nuevas sustancias que sirvan para este fin.

Un protector solar derivado del ácido 4,4-diamino-estilbena-2,2-disulfónico (Blankophor P167, Bayer, Alemania) se utiliza como abrillantador óptico en el blanqueado del papel y para prevenir el desteñido de la ropa. Este protector solar ha incrementado la eficacia del *Baculovirus de la polilla gitana* (*Lymantria dispar* (L.)) (Lepidoptera: Lymantriidae), disminuyendo la inactivación del virus por la luz solar (Argauer y Shapiro, 1997). Una mayor persistencia de las esporas podría incrementar la eficacia, reducir el costo y el número de aplicaciones requeridas para lograr un control adecuado, especialmente de aquellas plagas que tienen un largo período de emergencia. En consecuencia, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de este protector solar en la sobrevivencia de dos aislamientos chilenos de *M. anisopliae* expuestos a la luz ultravioleta, en orden a incorporarlo en un futuro biopesticida basado en este hongo entomopatógeno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamientos utilizados

Se utilizaron dos aislamientos del hongo *M. anisopliae* pertenecientes a la Colección de

Organismos Entomopatógenos del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chillán, Chile (**Cuadro 1**).

**Cuadro 1. Origen de los aislamientos chilenos de *Metarhizium anisopliae*.**  
**Table 1. Origin of Chilean *Metarhizium anisopliae* isolates.**

Aislamiento	Procedencia	Localidad	Región	País	Latitud
QU-M363	Adulto de <i>Sericoides</i> sp. (Coleoptera: Scarabaeidae)	Pinto	VIII	Chile	36° S
QU-M221b	Suelo	Bahía Mansa	X	Chile	41° S

### Procedimiento

Las muestras originales se mantuvieron criopreservadas en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Para los ensayos, se inocularon placas Petri que contenían medio agar-papa-dextrosa (PDA) al 2%. Las placas se mantuvieron 20 días a  $20^{\circ}\text{C}$  en oscuridad, hasta que el micelio del hongo cubrió la superficie del medio y se observó una esporulación completa. La extracción de las conidias se realizó agregando agua no clorada y humectante (Tween 80 al 0,05%) a la placa y se raspó con un asa metálica. Esta suspensión se homogeneizó en un agitador magnético durante 5 min, al cabo de los cuales se determinó la concentración de conidias mediante un recuento microscópico en un hematocitómetro. Cada suspensión se diluyó hasta una concentración de  $1 \times 10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  y se extrajeron dos alícuotas, una de las cuales recibió protector solar al 1% peso/volumen (p/v), mientras que la otra alícuota no recibió ninguna sustancia.

Cada alícuota (1 mL) se esparció con una jeringa en placas Petri ( $\varnothing = 55$  mm, altura 13 mm) con medio agar-agua al 2%, con un espesor menor a 4 mm. La exposición de las esporas a la luz UV-C se realizó colocando las placas destapadas a 50 cm de distancia vertical de una lámpara de mercurio de 30 W (Philips, modelo TUV 30, Holanda), que emitía luz ultravioleta de  $\lambda = 254$  nm.

Una vez cumplido el tiempo de exposición, las placas se retiraron de la cámara, se taparon y sellaron. Posteriormente, se mantuvieron en oscuridad en una sala a  $20^{\circ}\text{C}$ . La viabilidad se determinó 24 h después de la exposición. De la zona media de cada placa se extrajo una faja de agar de 3 mm de ancho y de igual longitud que el diámetro de la placa. Este trozo de agar se puso en un portaobjeto y se examinó a 100X bajo un microscopio compuesto. Se consideró que una conidia había germinado cuando había emitido un tubo germinativo de igual o mayor longitud que el largo máximo de la espora. La germinación se calculó como 100 (número conidias germinadas/número total de conidias examinadas) y se examinó un total de 60 conidias por repetición.

Considerando que la germinación inicial de ambos aislamientos fue distinta, los resultados de germinación de cada tratamiento fueron transformados para crear una nueva variable llamada "actividad original remanente". Esta variable expresa la germinación de cada tratamiento como un porcentaje de la germinación alcanzada por su respectivo control. Dado que la germinación de cada control no estaría expuesta a los efectos de la radiación UV se consideró *a priori* como la germinación máxima. Esta transformación permitió evaluar ambos aislamientos en una escala equivalente. Para calcular esta variable se aplicó la siguiente fórmula (Aylor y Sanogo, 1997):

$$\text{AOR} = (G_i / G_0) \times 100$$

donde AOR = actividad original remanente;  $G_i$  = germinación (%) de las esporas al tiempo  $i$ -ésimo; y  $G_0$  = germinación (%) de las esporas del tratamiento control respectivo.

### Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar, con tres repeticiones por tratamiento. Los tratamientos

se dispusieron en un arreglo factorial, considerando como factores el tiempo de exposición (0, 10, 20, 30, y 40 s); adición de protector solar (con y sin protector solar); y los aislamientos (QU-M363 y QU-M221b). Las medias de cada tratamiento fueron sometidas a un ANDEVA (**Cuadro 2**) y se compararon, cuando correspondía, mediante el test de mínima diferencia significativa ( $\alpha = 0,05$ ), utilizando el programa IRRISTAT (IRRI, 2002).

**Cuadro 2. ANDEVA de tres vías para la actividad original remanente (%) de dos aislamientos de *Metarhizium anisopliae* expuestos a luz UV-C.**

**Table 2. Three-way ANOVA for original activity remaining (%) of two *Metarhizium anisopliae* isolates exposed to UV-C light.**

Fuente	gl	CM	F
Aislamiento	1	21470,4	118,25 **
Protector	1	13650,4	75,18 **
Tiempo	4	17048,7	93,90 **
Aislamiento x Protector	1	3360,02	18,51 **
Aislamiento x Tiempo	4	2088,42	11,50 **
Protector x Tiempo	4	1476,75	8,13 **
Aislamiento x Protector x Tiempo	4	1292,18	7,12 **
Residuo	40	181,567	
<b>Total</b>	<b>59</b>	<b>2260,47</b>	

\*\*  $P < 0,01$ ; gl = grados de libertad; CM = cuadrado medio; F = test F.

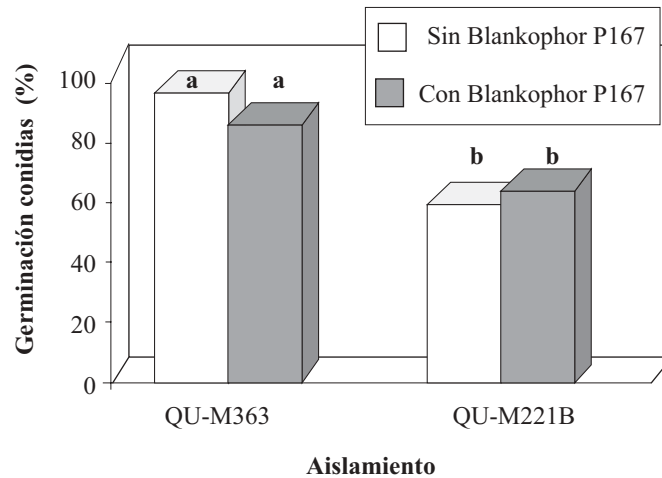
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Compatibilidad entre conidias y protector solar

La germinación de las conidias en suspensión acuosa no fue afectada por la adición del protector solar, a pesar que éste es un derivado del ácido 4,4'-diamino-estilbeno-2,2'-disulfónico, compuesto que contiene estilbeno en su estructura, al igual que numerosas fitoalexinas. Debido al reconocido efecto fungicida de las fitoalexinas (Kuc, 1994), una molécula afín estructuralmente podría haber tenido efectos similares. Sin embargo, este efecto deletéreo potencial no se produjo, y el porcentaje de germinación de las esporas sin contacto con Blankophor fue similar ( $P > 0,05$ ) al de las esporas que recibieron el protector solar, en ambos aislamientos (**Figura 1**).

### Efecto de la radiación UV en la germinación de las conidias

La germinación de las conidias expuestas a la radiación UV sin protector solar varió dependiendo del aislamiento considerado y de la dosis de luz UV ( $P < 0,05$ ). La exposición de 10 s no afectó la germinación de QU-M363, la que sólo se redujo a partir de los 20 s de exposición, mientras que en el aislamiento QU-M221b este efecto negativo ocurrió en todos los tiempos de exposición, en forma creciente (**Cuadro 3**). A los 20 s, la magnitud de la pérdida de viabilidad fue más marcada para QU-M221b que para QU-M363; éste mantenía aún el 37% de la germinación de su control, mientras que el primero perdió toda la capacidad de germinar. La exposición a tiempos mayores que 20 s afectó por igual a ambos aislamientos ( $P > 0,95$ ) cuando no se utilizó el protector solar (**Cuadro 3**).



**Figura 1. Compatibilidad entre esporas de dos aislamientos de *Metarhizium anisopliae* y un protector solar.**  
**Figure 1. Compatibility between spores of two *Metarhizium anisopliae* isolates and a sunscreen.**

Barras con las mismas letras son estadísticamente iguales según prueba de Mínima Diferencia Significativa ( $P \geq 5\%$ )

**Cuadro 3. Actividad original remanente (%) de dos aislamientos de *Metarhizium anisopliae* expuestos a luz UV-C.**  
**Table 3. Remaining original activity (%) of two *Metarhizium anisopliae* isolates exposed to UV-C light.**

QU-M221b			
Tiempo exposición (s)	Actividad original remanente (%)		
	Sin protector solar	Con protector solar	
0	100 a	100 a	0 ns
10	36,7 b	78,1 a	-41,4 *
20	0 c	31,3 b	-31,3 *
30	0 c	3,1 c	-3,1 ns
40	0 c	0 c	0 ns

QU-M363			
Tiempo exposición (s)	Actividad original remanente (%)		
	Sin protector solar	Con protector solar	
0	100 a	100 a	0 ns
10	101,8 a	120 a	-18,2 ns
20	36,8 b	122 b	-85,2 *
30	10,5 c	94 a	-83,5 *
40	1,8 c	41 c	-39,2 *

Medias con letras distintas en cada columna son significativamente diferentes (Mínima Diferencia Significativa MSD = 0,05).

En sentido horizontal, ns = no significativo, \* = significativo al 5%, indican la significancia de las diferencias entre medias (5% MDS = 22,23).

Estos resultados concuerdan con la existencia de variabilidad en la resistencia a la luz UV en *M. anisopliae* y coinciden con lo informado por diversos autores, quienes también encontraron variabilidad en la respuesta a diversos factores ambientales, incluyendo la luz solar (Tobar *et al.*, 1996; Morley-Davies *et al.*, 1996). Ignoffo y García (1992) informaron que conidias más

pigmentadas resisten mejor la luz solar. Si bien este parámetro no fue evaluado, las potenciales diferencias de color no fueron aparentes a simple vista, por lo que posiblemente otros mecanismos podrían ser responsables de estas diferencias. El incremento de la resistencia a la radiación obtenido en virus entomopatógenos utilizando antioxidantes o enzimas oxidativas (Ragaei, 1999) sugiere la

necesidad de evaluar si aislamientos de *M. anisopliae* difieren en la capacidad de producirlas, evitando el daño producido por compuestos con oxígeno reactivo.

La elección aleatoria de estos aislamientos y su reducido número dan base para especular que si se examinara esta variabilidad con un número mayor de aislamientos, provenientes de condiciones ecológicas muy diferentes, estas diferencias podrían acentuarse y servir para seleccionar aislamientos que tengan un mejor desempeño en condiciones de alta luminosidad o para transferir esos rasgos a otros aislamientos o especies.

### Efecto del protector solar

La adición del protector solar atenuó el efecto negativo de la radiación UV en ambos aislamientos ( $P < 0,05$ ). En el aislamiento QU-M363, la adición de este compuesto permitió que la germinación fuera similar a su control ( $P > 0,05$ ), excepto en la dosis más alta de luz UV (**Cuadro 3**). Al comparar las esporas protegidas con las no protegidas, las primeras germinaron 3,3 y 9,3 veces más que las segundas, para 20 y 30 s, respectivamente. La germinación de QU-M363 disminuyó sólo al recibir la dosis más alta de luz UV (40 s), pero este 37% de actividad remanente fue muy superior ( $P < 0,05$ ) si se compara con la germinación de las esporas no protegidas, la que fue totalmente suprimida por la misma dosis de radiación UV-C.

En el aislamiento QU-M221b (**Cuadro 3**), el efecto positivo del protector solar fue parcial y sólo ocurrió en los dos tiempos más breves de exposición ( $P < 0,05$ ), ya que las dos dosis mayores de luz UV inactivaron completamente las conidias, independientemente de la adición del protector solar ( $P > 0,05$ ). El origen de esta diferencia entre aislamientos podría atribuirse a diferentes presiones de selección debido a su origen geográfico (**Cuadro 1**), ya que existen antecedentes que indican una menor tolerancia hacia la irradiación a medida que aumenta la latitud de origen del aislamiento (Braga *et al.*, 2001b).

Los tiempos de exposición necesarios para reducir sustancialmente la germinación fueron

extremadamente bajos (menos de 1 min) en este ensayo, en comparación a los resultados informados en otros ensayos *in vitro*, en los cuales se señala que los tiempos letales 50 ( $TL_{50}$ ) variaron entre 1 a 4 h para algunos géneros de entomopatógenos representativos como *Metarhizium* sp., *Beauveria* sp. y *Nomuraea* sp. (Moore *et al.*, 1993).

Estas diferencias podrían ser explicadas por varias razones, principalmente metodológicas. En primer lugar, la fuente de luz en esos estudios consistió en un simulador de luz solar que emitía radiación UV-A (400-320 nm), radiación UV-B (320-290 nm), radiación fotosintéticamente activa (PAR, 400-700 nm) e infraroja (IR > 700 nm). Todos los tipos de radiación nombrados, por su menor longitud de onda, son menos energéticas que la radiación UV-C (254 nm) utilizada en este ensayo. En relación con lo anterior, Cerda-Olmedo *et al.* (1996) señalaron que la  $UV_{254}$  es, al menos, 10 veces más letal que la luz UV-B (320-290 nm).

En segundo lugar, las moléculas blanco de la radiación UV-C (tentativamente proteínas y ADN), tienen sus máximos de absorción entre 260-270 nm. En consecuencia, estas macromoléculas absorberían mucha más energía en la longitud de onda  $UV_{254}$ , ya que este valor está más cerca de los máximos de absorción del ADN (260-265 nm) y de las proteínas (220 y 280 nm) que otras longitudes de onda (Diffey, 1991).

El mecanismo que explicaría el efecto del protector solar estaría relacionado con la disipación de energía por medio de la fluorescencia. El estilbeno, la molécula de la cual deriva este compuesto, tiene dos máximos de absorción (220 y 294 nm) (Du *et al.*, 1998). Al incorporarse a la suspensión, el protector solar absorbería la energía y la emitiría como radiación de onda más larga (350 nm), compitiendo con las proteínas y el ADN, que tienen máximos de absorción cercanos a los de esta pantalla solar, como se señaló anteriormente.

De comprobarse su utilidad en campo, este grado de protección, aunque no total, podría representar

una diferencia importante en el desempeño de un biopesticida. A diferencia de los insecticidas químicos, los micoinsecticidas tienen ingredientes activos capaces de reproducirse. Un modelo desarrollado por Thomas *et al.* (1997), para describir el efecto de *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal (posteriormente *M. anisopliae* var. *acridum* Driver & Milner) en la población del acrídido *Hieroglyphus daganensis* Krauss, demostró que sólo el 48% de la mortalidad total se debió al contacto directo entre las esporas aplicadas y los insectos, mientras que la ruta de infección secundaria (esporas residuales) representó el 40% de la mortalidad total. De acuerdo a éstos y otros autores (Langewald *et al.*, 1997), incluso incrementos muy pequeños en la actividad residual de las esporas causaron grandes incrementos en la mortalidad total, tanto en la misma temporada como entre temporadas. Esta particular forma de acción de los micoinsecticidas reafirmaría la importancia de incrementar la actividad residual de *M. anisopliae* para que esas esporas se transformen en focos de una epizootia secundaria,

en la medida que las condiciones ambientales favorezcan el desarrollo de la enfermedad.

## CONCLUSIONES

Los aislamientos chilenos QU-M221b y QU-M363 de *M. anisopliae*, presentaron respuestas diferentes frente a dosis similares de luz UV-C.

El protector solar aminoró la pérdida de viabilidad de las conidias causada por la luz UV, cuando los tiempos de exposición fueron bajos o intermedios (entre 10-20 s).

La capacidad de protección e inocuidad hacia las conidias permiten que este protector solar sea un adyuvante potencial en la formulación de un biopesticida a base de *M. anisopliae*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Bayer S.A., representada por el Sr. Miguel Astorga, por facilitar el producto Blankophor P-167.

## LITERATURA CITADA

- Argauer, R., and M. Shapiro. 1997. Fluorescence and relative activities of stilbene optical brighteners as enhancers for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus. *J. Econ. Entomol.* 90:416-420.
- Aylor, D.E., and S. Sanogo. 1997. Germinability of *Venturia inaequalis* conidia exposed to sunlight. *Phytopathology* 87:628-633.
- Bateman, R.P., M. Carey, D. Moore, and C. Prior. 1993. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locust at low temperatures. *Ann. Appl. Biol.* 122:145-152.
- Braga, G.U.L., S.D. Flint, C.L. Messias, A.J. Anderson, and D.W. Roberts. 2001a. Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Res.* 105:874-882.
- Braga, G.U.L., S.D. Flint, C.L. Messias, A.J. Anderson, and D.W. Roberts. 2001b. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61° N to 54° S. *J. Invertebr. Pathol.* 78:98-108.
- Cerda-Olmedo, E., V. Martín-Rojas, and B. Cubero. 1996. Causes of cell death following ultraviolet B and C exposures and the role of carotenes. *Photochem. Photobiol.* 64:547-551.
- Diffey, B.L. 1991. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Physics in Medicine and Biology* 36:299-328.
- Du, H., R.A. Fuh, J. Li, A. Corkan, and J.S. Lindsey. 1998. PhotochemCAD: A computer-aided design and research tool in photochemistry. *Photochem. Photobiol.* 68:141-142.
- Fargues, J., M.S. Goettel, N. Smits, A. Ouedraogo, C. Vidal, L.A. Lacey, C.J. Lomer, and M. Rougierl. 1996. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. *Mycopathologia* 135:171-181.
- Ignoffo, C.M., and C. García. 1992. Influence of conidial color on inactivation of several entomogenous fungi (Hyphomycetes) by simulated sunlight. *Environ. Entomol.* 21:913-917.

- Inglis, G.D., M.S. Goettel, and D.L. Johnson. 1995. Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. Biol. Control 5:581-590.
- IRRI, 2002. IRRISTAT tutorial manual. 198 p. International Rice Research Institute, Biometric Unit, Manila, Philippines.
- Kuc, J. 1994. Relevance of phytoalexins - a critical review. Acta Hort. 381:526-539.
- Langewald J., M.B. Thomas, O.K. Douro-Kpindou, and C.J. Lomer. 1997. Use of *Metarhizium flavoviride* for control of *Zonocerus variegatus*: a model relating mortality in caged field samples with disease development in the field. Entomol. Exp. Appl. 82:1-8.
- Moore, D., P.D. Bridge, P.M. Higgins, R.P. Bateman, and C. Prior. 1993. Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. Ann. Appl. Biol. 122:605-616.
- Morley-Davies, J., D. Moore, and C. Prior. 1996. Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. spores with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. Mycological Res. 100:31-38.
- Ragaii, M. 1999. Radiation protection of microbial pesticides. J. Appl. Entomol. 123:381-384.
- Shah, P.A., O.K. Douro-Kpindou, A. Sidibe, C.O. Daffe, H.V.D. Pauuw, and C.J. Lomer. 1998. Effects of the sunscreen oxybenzone on field efficacy and persistence of *Metarhizium flavoviride* conidia against *Kraussella amabile* (Orthoptera: Acrididae) in Mali, West Africa. Biocontrol Sci. Tech. 8:357-364.
- Shapiro, M., and J.L. Vaughn. 1995. Enhancement in activity of homologous and heterologous baculoviruses infectious to cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) by an optical brightener. J. Econ. Entomol. 88:265-269.
- Thomas, M.B., S.N. Wood, J. Langewald, and C.J. Lomer. 1997. Persistence of *Metarhizium flavoviride* and consequences for biological control of grasshoppers and insects. Pestic. Sci. 49:47-55.
- Tobar, S.P., P.E. Vélez, y E.C. Montoya. 1996. Selección de aislamientos patogénicos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* por resistencia a la luz ultravioleta. p. 76. Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología (SOCOLEN), Cartagena, Colombia. 17-19 de julio de 1996. SOCOLEN, Cartagena, Colombia.