

EFFECTO DEL INSECTICIDA CLORPIRIFOS SOBRE LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE *Metarhizium anisopliae* EN CONDICIONES DE LABORATORIO

THE INSECTICIDE CHLORPYRIFOS EFFECT ON GROWTH GERMINATION AND *Metarhizium anisopliae* UNDER LABORATORY CONDITIONS

Dolibeth Montilla-García
Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo. Perú.

RESUMEN

El crecimiento de la población hace que busquemos mejores formas de incrementar la producción de alimentos y mejorar el rendimiento de los cultivos; para lograr esta meta el agricultor mayormente hace uso de los químicos desde hace muchos años. Pero actualmente se propone un manejo integrado del cultivo usando el control biológico, el cual se presenta como una buena opción para desplazar el uso de los químicos; debido a esto fue necesario conocer el efecto que produce el insecticida clorpirifos sobre la germinación y el crecimiento del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en condiciones de laboratorio, para lo cual se realizaron cuatro concentraciones diferentes de clorpirifos (0, 720, 1200 y 2400 ppm) para evaluar tanto la germinación como el crecimiento de *M. anisopliae*. La lectura de los resultados se hizo midiendo el radio de crecimiento promedio alcanzado cada día, según cada concentración de clorpirifos. Se demostró que clorpirifos tiene efecto inhibitorio sobre la germinación y el crecimiento de *M. anisopliae*.

Palabras clave: plaguicida, entomopatógeno, *Metarhizium anisopliae*

ABSTRACT

The population growth makes us seek better ways to increase food production and improve crop yields, to achieve this goal the farmer mostly makes use of chemicals for many years. But currently proposed integrated crop management using biological control, which comes as a good option to displace the use of chemicals, because it was necessary to know the effect of the insecticide chlorpyrifos on the germination and growth of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in a laboratory, for which four different concentrations of chlorpyrifos (0, 720, 1200 and 2400 ppm) to evaluate both the germination and the growth of *M. anisopliae*. The reading of the results was done by measuring the radius of growth achieved average each day as each concentration of chlorpyrifos. Chlorpyrifos was shown that inhibitory effect on the germination and growth of *M. anisopliae*.

Key words: pesticides, entomopathogenic, *Metarhizium anisopliae*

Recibido: 9 Diciembre de 2012

Aceptado: 29 de Abril de 2013

INTRODUCCIÓN

El crecimiento de la población hace que busquemos mejores formas de incrementar la producción de alimentos y para ello necesitamos reducir los daños que ocasionan las plagas y enfermedades (Ware, 2000). La manera tradicional de mejorar el rendimiento en los cultivos se basa en el empleo de compuestos químicos (control químico) para controlar plagas (patógenos, insectos y malezas) a niveles que no causen daños económicos a los cultivos (Fuenmayor, 2008).

Uno de los químicos más usados es el clorpirifos, que es un insecticida organofosforado, que ha sido considerado como uno de los más utilizados para el control de plagas de cultivo de flores, banano y hortalizas. Igualmente, es catalogado como un compuesto tóxico para la fauna terrestre y acuática, y para las personas (Márquez, 2001 y Racke, 1993). A concentraciones de 0,25 µg/g de suelo, lo cual representa un riesgo para los microorganismos del suelo y para los agricultores

(González, 2003), puede provocar un efecto negativo en el ambiente si es mal aplicada o utilizada en altas dosis y causar la aparición de biotipos tolerantes de una especie anteriormente controlada por este plaguicida. (Tabener, 2009).

Para obtener mejoras perdurables en el control de las enfermedades agrícolas, la utilización del control químico no debe ser exclusivo sino complementario dentro de una estrategia de manejo integrado del cultivo (Ley 26744, 1997, Garrán y col. 2001), que involucra también el uso de métodos menos tóxicos tales como el control cultural y el control biológico; siendo los últimos base para una agricultura orgánica (Universidad Autónoma Chapingo, 2001).

El control biológico se define como la reducción de la cantidad de inóculo o de la actividad que produce la enfermedad de un agente patógeno, obtenido por o mediante uno o más organismos diferentes al hombre (Cook, 1983; Deacon, 1990). Dentro del control biológico están los hongos entomopatógenos, que pueden eliminar o mantener las plagas en niveles que no ocasionan daños económicos a los cultivos. Estos hongos se encuentran en la naturaleza; logrando un buen desarrollo en lugares frescos, húmedos y con poco sol. Constituyen, además, el grupo de mayor importancia en este control de insectos plagas. Prácticamente, todos los insectos son susceptibles a algunas de las enfermedades causadas por hongos, conociéndose aproximadamente 100 géneros y 700 especies de hongos entomopatógenos, teniéndose entre los géneros más importantes *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Paecilomyces* y *Lecanicillium* (Fragas y col., 1997).

Metarhizium anisopliae es un hongo inespecífico o de amplio espectro de acción, que fue descubierto por Eli Metchnikoff en 1879, infectando larvas del escarabajo gallo del trigo *Anisoplia austriaca*. Es a este científico ruso al que se le atribuye gran parte del mérito por el uso de microorganismos en el control de plagas, puesto que vislumbró el uso práctico de hongos y en especial de *M. anisopliae* en el control de insectos, apreciando también una evidencia de la importancia de las epizootias naturales en la reducción de las poblaciones de insectos, convirtiéndose actualmente en uno de los entomopatógenos más utilizados para controlar insectos plagas de los órdenes Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Orthoptera y Hemiptera (De Bach, 1968; Laverlam, 1999). Asimismo *M. anisopliae* ha sido aislado de un amplio rango de hospederos.

El ataque de los hongos entomopatógenos como *M. anisopliae* al insecto se inicia con la penetración por las partes blandas o por vía oral, este hongo inicia la colonización del insecto mediante la formación de estructuras de presión y la producción de enzimas extracelulares proteolíticas como subtilisina (PR1) y metaloproteasas, así como enzimas con actividad quitinolítica, produciendo la muerte del huésped en 3 a 4 días. Los síntomas en el insecto son la pérdida de sensibilidad, movimientos descoordinados y parálisis. Cuando el insecto muere, éste queda momificado (López & Orduz, 2004; Perkins, 2004).

Se han realizado varias investigaciones acerca del efecto de los pesticidas sobre *M. anisopliae*, según Padrón y col. (2000) evaluaron el efecto que producía el insecticida Endosulfan, encontrando que el crecimiento radial de las colonias resulta inhibido un cien por ciento en presencia de la mezcla de endosulfan a la dosis comercial como a la mitad de esta, manifestándose tóxico a estas concentraciones; mientras que a un décimo de la dosis comercial resultó ligeramente tóxico. Por su parte, Marcel y col. (2001) demostraron que los productos Dehydol KS 60, Sulpragil WP, Surfax 345, Surfion 950 y Texapon Zacd fueron estadísticamente diferentes al testigo, con valores menores en las dos variables evaluadas. El Sulfofon NSS presentó el menor diámetro de colonias.

Marques (1993) en un estudio sobre la compatibilidad de los hongos *M. anisopliae* y *B. bassiana* con agentes mojantes y emulsionantes, comprobó que Surfax 250 y Surfax 586 inhibieron *M. anisopliae* con 24 h de incubación, cuando fueron utilizados en una concentración de 2%, mientras que el efecto negativo de Surfax 250 fue observado hasta las 48 horas de

incubación. Drewfax 550 y Unitol L30 fueron perjudiciales en las dos concentraciones evaluadas, tanto para *M. anisopliae* como para *B. bassiana*.

Enrique y col. (2003) realizaron estudios de compatibilidad e indicaron que el efecto del Nimkol-L® sobre el crecimiento vegetativo de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* fue dependiente de la concentración. Cuando el producto fue incorporado al medio de cultivo para los hongos, el crecimiento de las colonias no fue significativamente afectado en la menor concentración evaluada (0,74%). Con el aumento de la concentración, el crecimiento vegetativo de los entomopatógenos fue menor, hasta la total inhibición en la mayor concentración evaluada (18,4%). La inhibición completa de los hongos indica el alto poder fungicida del Nimkol-L® en esa concentración.

Akbar y col. (2012) en estudios de compatibilidad entre *M. anisopliae* y diferentes insecticidas y fungicidas, demostraron que varios de esos compuestos inhiben parcialmente la germinación y crecimiento del entomopatógeno, pero compuestos de metaxyl+mancozeb inhibe totalmente la germinación.

Por otro lado, Marcel y col. (2001) comprobaron que la producción de conidias de *M. anisopliae* en medios de cultivo conteniendo Agrimul PW, Surfion PW, Surfion D-oxiteno, Sulfopon NSS y Vixilex fue 8,7; 8,3; 7,2; 4,8 y 4,0 veces mayor que la del testigo, respectivamente. En cuanto al crecimiento de las colonias los productos que presentaron diferencias significativas fueron Surfion D-oxiteno, Surfion PW, Vixil-S, Vixilex y Agrimul PW, siendo 1,6; 1,4; 1,2; 1,2 y 1,1 veces mayores, respectivamente que el crecimiento del tratamiento sólo con el entomopatógeno.

Ante la escasa información sobre el efecto de los químicos, específicamente insecticidas, sobre los hongos entomopatógenos surge la necesidad de investigar sobre dichos efectos, con el fin de que el agricultor planifique mejor sus métodos de control de plagas para la mejor eficiencia del mismo.

Por lo referido anteriormente, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de clorpirifos sobre la germinación y crecimiento de *M. anisopliae* en condiciones de laboratorio, teniendo como hipótesis de que a mayores concentraciones de clorpirifos se da un menor porcentaje de germinación y crecimiento de *M. anisopliae*.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material biológico fue proporcionado por la cátedra de Fitopatología (departamento de Microbiología) y el insecticida Troya 4 EC, cuyo principio activo es el clorpirifos, fue adquirido en las tiendas de venta de agroquímicos

1. Evaluación del efecto de Clorpirifos sobre la germinación de *M. anisopliae*.

Preparación de las soluciones doble concentradas de clorpirifos.

Se llevó a cabo diferentes diluciones de Clorpirifos en suero de papa estéril hasta alcanzar las concentraciones de 1440, 2400, 4800 ppm., a partir del producto Troya 4 EC.

Reactivación del cultivo de *Metarhizium anisopliae* y obtención de cultivos monospóricos.

Para la reactivación, a partir del cultivo puro, se resembró en tubo de ensayo conteniendo agar Sabouraud inclinado y luego se incubó a 25°C durante 7 días.

Preparación del inóculo de esporas

De los cultivos preparados se volvió a sembrar en frascos planos conteniendo agar Sabouraud inclinado y se incubó a 25°C por 7 días, luego se extrajo una porción de micelio y se suspendió en 9 mL de tween 80 0,1% agitándolo moderadamente, a fin de liberar las conidias

del hongo. Con la suspensión resultante se determinó la concentración de esporas mediante recuento en cámara de Neubauer, con lo cual se obtuvo una concentración final de $5,7 \times 10^3$ conidias/mL.

Inoculación e incubación

Se colocó 1 mL de cada dilución de clorpirifos doble concentrado en tubos de ensayo estériles, a los cuales se les agregó 1 mL de la suspensión de conidias obtenida previamente, con lo cual se obtuvo una dilución de 2.85×10^3 conidias/mL y concentraciones finales de clorpirifos de 720, 1200 y 2400 ppm. Se preparó también una suspensión de esporas control, agregándole 1 mL de la suspensión de esporas en 1 mL de agua destilada estéril.

Lectura de conidias germinadas

Luego del periodo de incubación se procedió a revisar los tubos donde se inoculó al hongo y se contó el número de conidias germinadas en cada una de las concentraciones del insecticida así como también del control. Los resultados fueron expresados como porcentaje promedio de germinación el cual se obtuvo comparando el número de conidias germinadas en los tubos con las diferentes concentraciones del insecticida en relación a las del grupo control.

2. Evaluación del efecto de clorpirifos sobre el crecimiento de *M. anisopliae*.

Preparación del medio de cultivo

Se preparó Agar Sabouraud en cuatro matraces conteniendo 100 mL de medio cada uno. El medio de cultivo se esterilizó en autoclave y se dejó enfriar hasta una temperatura aproximada de 50 °C. Estando aún fundido el medio, a tres de los matraces se les adicionó clorpirifos en cantidad suficiente para obtener una concentración final de 720, 1200 y 2400 ppm., respectivamente. Al medio contenido en el matraz restante no se le agregó el insecticida, a fin de utilizarlo como control. Luego, el medio de cultivo de cada uno de los cuatro matraces se sirvió en placas de Petri estériles (cuatro placas por cada concentración, incluyendo el control).

Siembra e incubación.

A partir de los cultivos puros del hongo contenido en los frascos planos se sembró por puntura en la parte central de las placas previamente preparadas en el paso 2.1 las cuales fueron incubadas a 25°C por nueve días.

Lectura de resultados

A partir del segundo día de siembra, y hasta el noveno día, se midió el radio de crecimiento (cm) de la colonia en diferentes direcciones, obteniéndose un radio promedio de crecimiento por día, por cada concentración de insecticida y el grupo control.

Los resultados de crecimiento de *M. anisopliae* se expresaron en centímetros (cm) y en porcentaje de crecimiento (%C), teniendo en cuenta el crecimiento alcanzado por el grupo control (100%), de la siguiente manera:

$$\%C = \frac{\text{Radio promedio de la colonia problema}}{\text{Radio promedio de la colonia testigo}} \times 100$$

3. Análisis de datos

El análisis estadístico se llevó a cabo en base a la prueba de Análisis de Varianza Unidireccional

(ANOVA) para la comparación entre los resultados obtenidos con cada concentración de clorpirifos, tanto para el porcentaje de germinación, como para el porcentaje de crecimiento de *M. anisopliae* para lo cual se utilizó el programa estadístico SPSS V. 15.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó que clorpirifos no permite la germinación de *M. anisopliae*, llegando a obtenerse valores de 0% de germinación de las conidias en todos los tratamientos evaluados.

La Fig. 1 representa el porcentaje de crecimiento de *M. anisopliae* en diferentes concentraciones de clorpirifos observándose que este porcentaje llega a ser aproximadamente 20% a la concentración de 2400 ppm de clorpirifos.

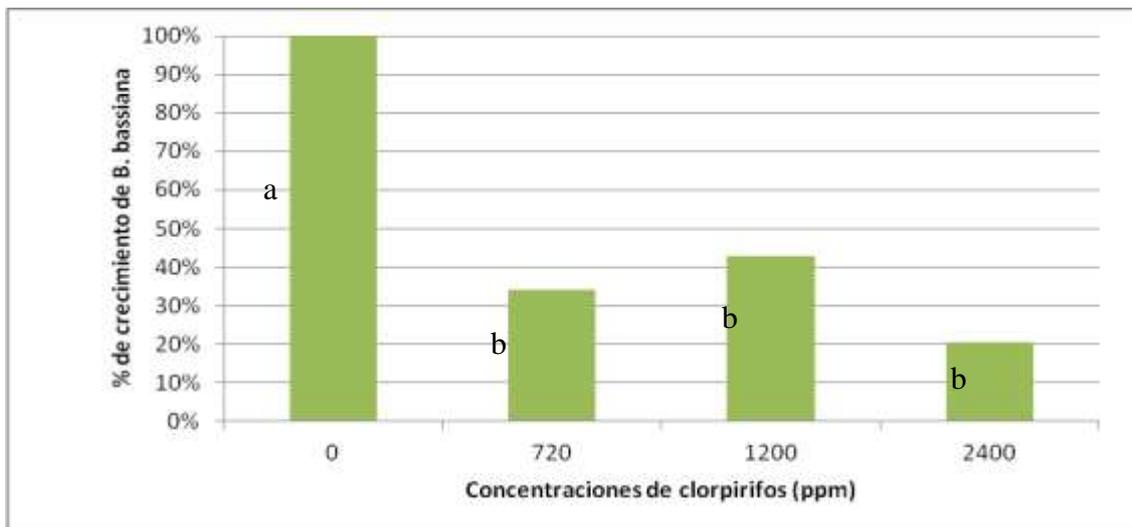


Fig. 1. Porcentaje de crecimiento lineal (radio) de *M. anisopliae* a las concentraciones de 720, 1200 y 2400 ppm. de clorpirifos. Las mediciones son de nueve días de incubación en condiciones de laboratorio.

a: $p < 0.05$ existe diferencia significativa

b: $p > 0.05$ no existe diferencia significativa

Tabla 1. Tratamiento estadístico sobre crecimiento radial de *M. anisopliae*

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1.780	3	.593	14.251	.000
Intra-grupos	.833	20	.042		
Total	2.612	23			

Crecimiento radial de *M. anisopliae*

Student-Newman-Keuls^a

Concentración de clorpirifos (ppm)	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
2400 ppm	6	.1751	
720 ppm	6	.2879	
1200 ppm	6	.3854	
0 ppm	6		.8883
Sig.		.197	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000.

De los resultados obtenidos se pudo observar que la germinación de *M. anisopliae* fue afectada en todos los tratamientos de clorpirifos (0%), con lo cual no se cumplen las normas establecidas por SENASA (2001), en las que se señala que todo biopreparado para ser usado como controlador biológico debe tener como característica una germinación de conidias mayor o igual a 90 %.

Asimismo se pudo comprobar que existe un efecto inhibitorio de clorpirifos sobre la germinación de las esporas de *M. anisopliae*, observándose gran diferencia entre el control y los tratamientos. Esto coincide con estudios realizados por Akbar y col. (2012), quienes demostraron que algunos herbicidas como el metaxyl + mancozeb son incompatibles con la germinación de los conidios de *Metarhizium anisopliae*.

En relación al crecimiento de *M. anisopliae* éste disminuyó, aunque en la concentración de 1200 ppm se aprecia un ligero aumento del crecimiento con respecto a la concentración de 720 ppm, pero en la concentración de 2400 ppm se ve una baja significativa del crecimiento (Fig. 1), lo que concuerdan con lo reportado por Castiñeiras y col. (1991) y Jiménez (1996), quienes demostraron que los agroquímicos Ametrina, Diuron y Diquat entre otros mencionados, son incompatibles con el crecimiento de *M. anisopliae*, sin embargo hay que mencionar que en dichos estudios se aplicaron concentraciones de 4 800, 8 000 y 9 600 ppm de los agroquímicos respectivamente, y se sabe que a concentraciones elevadas de estos herbicidas, se comportan como inhibidores del transporte de electrones mitocondrial (Bioagro, 2005).

En la actualidad no existen estudios que nos permitan conocer el mecanismo de acción de clorpirifos sobre *M. anisopliae* mediante el cual se afecte su germinación y crecimiento, lo cual se podría explicar de que el clorpirifos influye sobre la pared celular y/o la membrana citoplasmática y lo cual conlleva a la inhibición de la germinación y la disminución del crecimiento (Lindhart & Kjær, 2001).

Entre los fungicidas se encontró similitud estructural y funcional con la Famoxadona que es usado contra *Plasmopara viticola*, este fungicida actúa a nivel de la respiración del patógeno, y es un potente inhibidor del transporte de electrones en las mitocondrias de las células del hongo. El sitio primario de acción se localiza en el complejo III entre el citocromo b y el citocromo c₁ de la cadena respiratoria. Este flujo de electrones es necesario para que se lleve a cabo la fosforilación oxidativa, con la transformación de ADP a ATP. La acción fungitóxica tiene como resultado final la interrupción de los procesos metabólicos del hongo que requieren energía, incluyendo la germinación de las esporas y el crecimiento del micelio (ANVISA, 2003; Márquez, 2004).

Considerando que *M. anisopliae* es el agente patógeno de más de 300 especies de siete órdenes de insectos plaga y es el segundo hongo entomopatógeno más ampliamente usado en el control microbial, asimismo es el hongo más utilizado en Latinoamérica para el control de diferentes especies de Cercópodos que son plagas en la caña de azúcar (Carballo y col., 2003) y teniendo en cuenta que la duración de la actividad residual de clorpirifos en el suelo es de unos 6 a 8 semanas (Guadalquivir, 2000). Se recomienda que el producto DESTRIXIN WP (1999) a base de *M. anisopliae* cepa LAVERLAM no debe ser mezclado con fungicidas, productos químicos o coadyuvantes que alteren su efectividad, en cualquier mezcla debe probarse previamente su compatibilidad. Por lo tanto, si tenemos en cuenta que clorpirifos tiene un efecto inhibitorio tanto de la germinación como del crecimiento del entomopatógeno, y considerando que el porcentaje de germinación es más afectado que el porcentaje de crecimiento, es necesario un buen criterio de su utilización ya que si aplicamos el entomopatógeno antes de el insecticida, permitiéndole su germinación, esto repercutiría en un mejor control integrado de plagas, debido a que se favorecería el crecimiento del entomopatógeno.

CONCLUSIONES

Clorpirifos ejerce un efecto inhibitorio sobre la germinación y el crecimiento de *M. anisopliae* en condiciones de laboratorio.

Existen diferencias significativas en la germinación y el crecimiento de *M. anisopliae* a las diferentes concentraciones de clorpirifos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA.** 2003. Acción de la Famoxadona. URL: [http://www.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[513910\].PDF#search=Famoxadona](http://www.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[513910].PDF#search=Famoxadona)
- Badii, M.H.; J.L. Abreu.** 2006. Control biológico una forma sustentable del control de plagas. *International Journal of Good Conscience*; 1(1), p.82-89.
- Bioagro.** 2005. Alteraciones en el transporte de electrones tilacoidal y de la fotorrespiración. URL: http://www2.uah.es/tejedor_bio/bioquimica_ambiental/BA-RES-13.pdf
- Carballo, M.; E. Hidalgo & A. Rodríguez.** 2003. Control biológico de insectos mediante hongos entomopatógenos. *Lecuona, R.E.* pp.35–60. Buenos Aires, Argentina.
- Castiñeiras, A.; A. Calderón & M. López.** 1991. Efecto de los biocidas y de los fertilizantes empleados en el cultivo del plátano en Cuba sobre los hongos entomopatógenos. II. *Metarhizium anisopliae*.
- Cook, R.J. & K.F. Baker.** 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens.* American Phytopathological Society, St. Paul, Minn., U.S.A: 539
- Crespo, M.** 2001. El Control Biológico de los Fitonemátodos: Una Alternativa al Uso de Nematicidas y Cultivos Transgénicos. URL: http://www.maela-net.org/pasando/control_biologico_fitonematodos.html.
- Deacon, J.W.** 1990. *Introducción a la micología moderna.* México Ed. Limusa.
- De Bach, P.** 1968. *Control Biológico de las Plagas de Insectos y Malas Hierbas.* Edit. Continental, S.A. México, D.F.
- DESTRUXIN.** 1999. *Metarhizium anisopliae* cepa LAVERLAM. URL: <http://www.laverlam.com.co/destru.html>
- Castiglioni, E.; J. Vendramim & S. Alves.** 2003. Compatibilidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* con Nimkol-L® para el combate de *Heterotermes tenuis*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* N°. 69 p.38-44.
- Fragas, I.; G. Fleitas & L. Hidalgo.** 2004. Evaluación toxicológica de plaguicidas microbianos de origen fúngico. Cuba.
- Fuenmayor, M.** 2008. Plaguicidas Microbianos. *Revista de difusión de tecnología agrícola y pesquera del FONAIAP.* URL: <http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd52/plaguicidas.htm>
- Garrán, S.; G. Montangie & R. Mika.** 2001. Control químico de la sarna de los cítricos en base al fungicida estrobilurin BAS 500F. Informe Final. Convenio Basf-EEA Concordia del INTA. 38 p.
- González, J.** 2003. *Entrevista personal.* Laboratorio CIA. Universidad de Antioquia. Medellín.
- Guadalquivir, S.L.** 2000. Inhibidores del transporte de electrones. Sevilla, España. URL: <http://www.tragusa.com/esint/catalogo/ficha.php?producto=10mona>
- Jiménez, J.** 1996. Compatibilidad de los controladores biológicos con los agroquímicos. La Habana, Cuba. URL: <http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/BANA-BIO.htm>
- Laverlam, S.A.** 1999. *Metarhizium anisopliae* cepa laverlam. Productos de Línea Agrícola. Colombia. URL: <http://www.cali.cetcol.net.co/~laverlam/index.html>.
- Ley 26744, Congreso del Perú.** 1997.: Ley sobre el manejo integrado sobre el control de plagas. URL: <http://www.congreso.gob.pe/comisiones/1996/ambiente/lib05/LEY26744.htm>.
- Lindhart, B. & J. Kjær.** 2001. Overvågning af pesticider i grundvand. URL: <http://www.geus.dk/publications/aarsberetning00/aab0002.htm>
- López E. & S. Orduz.** 2004. *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma viride* controlan colonias de *Atta cephalotes* en campo mejor que un insecticida químico. *Clon* 2(1). España. URL: www.unipamplona.edu.co/upw_pdf/clon_3_art_7.pdf.
- Marcel R.T.; B.A.Sérgio; A. Setten & T.A. Nilson.** 2001. Compatibilidad de agentes tensoactivos con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* No. 59 p. 15 - 18.
- Marques, E.J.** 1993. Efeitos de formulacoes na preservacao de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sob diferentes condicoes de armazenamento. Tese de Doutorado. Piracicaba, Brasil, ESALQ/USP. 146 p.
- Márquez, S.** 2001. Evaluación de algunos efectos de la contaminación por aplicación de lorsban (clorpirifos) en un suelo y un cultivo de kikuyo (*Pennisetum clandestinum* hochst ex chiov) en el norte antioqueño. Trabajo de grado. Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia. Medellín. 143 p.
- Padrón, N. B.; C. Toledo; L.A. Rodríguez; D. Núñez; I. Pérez.** 2000. Compatibilidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* con endosulfan 50% C.E. en condiciones de laboratorio. *Fitosanidad*, vol. 4, núm. 1-2, marzo-junio, pp. 57-61. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, La Habana, Cuba.
- Perkins.** 2004. Hongos entomopatógenos. URL: <http://www.perkinsltda.com.co/Metarhizium.html>.

- Racke, K.** 1993. "Environmental fate of chlorpyrifos". En: Rev. Environmental contamination Toxicology. N.º 13. pp. 1-154.
- Akbar, S.; S. Freed; A. Hameed; H. Gul; M. Akmal; M. Malik; M. Naeem & M. Khan.** 2012. Compatibility of *Metarhizium anisopliae* with different insecticides and fungicides. African Journal of Microbiology Research Vol. 6(17), pp. 3956-3962, 9.Santa Clara Valley Urban Runoff Pollution Prevention Program - SCVURPPP. 2006. Manejo Integrado de Plagas.
- SENASA.** 2001. Manual de Procedimientos para Verificación de Calidad de Agentes Biológicos para el Control de Plagas Agrícolas, producidos por laboratorios en convenio con SENASA. Directiva General N° 24/2001-SENASA-DGSV-PNCB. Lima. Perú.
- Universidad Autónoma Chapingo - SAGARPA.** 2001. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. 2da. Ed. México. URL: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/InfOMer/analisis/organico.html>.
- Taberner A.** 2007. Manejo de poblaciones de malezas resistentes a herbicidas 100 preguntas sobre resistencias. [Internet]. Roma. FAO. URL: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1422s/a1422s00.pdf>