



Artículo / Article

Control del mosco fungoso negro, *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1839) y *Bradysia impatiens* (Johannsen, 1912) (Diptera: Sciaridae) en *Pinus montezumae* Lamb.

Black fungus gnats *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1839) and *Bradysia impatiens* (Johannsen, 1912) (Diptera: Sciaridae) in *Pinus montezumae* Lamb.

Víctor Hugo Marín-Cruz¹, David Cibrián-Tovar¹, José Tulio Méndez-Montiel¹, Omar Alejandro Pérez-Vera¹ y José Artemio Cadena-Meneses²

Resumen

Los moscos fungosos negros, *Lycoriella ingenua* y *Bradysia impatiens* son insectos que afectan significativamente la producción de plántulas de *Pinus montezumae* en algunos viveros e invernaderos forestales que se ubican en el centro de México. En los meses desde la primavera hasta el otoño, las condiciones ambientales de alta humedad y temperatura son adecuadas para que la población aumente rápidamente y sea abundante en pocas semanas. Para ofrecer una alternativa de control de ellos, en el vivero forestal de Temamatla se probaron cinco insecticidas químicos: oxamil, espirotetramat, imidacloprid, carbofuran, clorpirifos, y el bioplaguicida *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI). Estos productos se aplicaron en tres dosis, durante cuatro meses. La eficacia de los tratamientos se evaluó en porcentaje de plantas sin daño. De los tratamientos, el imidacloprid en dosis alta y media generó una protección de 100 %. Después, oxamil y espirotetramat en dosis alta, a 96.17 % y 95.75 % de la planta tratada. En cambio, la dosis media de clorpirifos lo hizo a 95.74 %, mientras que la dosis baja de imidacloprid, a 95.29 %. Ocho tratamientos protegieron de 91.5 % a 79.43 %, pero cuatro tratamientos no fueron diferentes al control. Los resultados sugieren que no todos los productos evaluados, en sus diferentes dosis, son efectivos para el control del mosco fungoso negro. Sin embargo, algunos pueden serlo para controlarlo en plántulas de *P. montezumae*.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Berliner, 1915), control químico, *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1839), mosco fungoso, *Pinus montezumae* Lamb., vivero forestal.

Abstract

The black fungus gnats *Lycoriella ingenua* and *Bradysia impatiens* are insects that affect meaningfully the seedling production of *Pinus montezumae* in some forest nurseries and greenhouses located at Central Mexico. During the months from springtime to autumn, the environmental conditions of high moisture and temperature are right for a fast growth of the population and it becomes abundant in a few weeks. To offer an alternative to control these insects, in a forest nursery located in *Temamatla*, Mexico, five chemical insecticides were tested: oxamil, spirotetramat, imidacloprid, carbofuran, chlorpyrifos and the biopesticide *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (BTI). These products were applied in three doses for a four month period. The efficiency of the treatments was evaluated on the percentage of unharmed plants. Of the treatments, the imidacloprid in a high and medium doses generated a protection of 100 %. Then, the spirotetramat and oxamil protected 96.17 % and 95.75 % of the treated plant respectively; the medium dose of chlorpyrifos protected 95.74 %, and the low dose of imidacloprid 95.29 %. Eight treatments protected from 91.5 % to 79.43 %. Four were no different to control. The results suggest that not all the evaluated products, in different doses, are effective to control the black fungus gnats. Nevertheless, some doses and products can be effective to control the pest in *P. montezumae* seedlings.

Key words: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Berliner, 1915), chemical, *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1839), black fungus gnats, *Pinus montezumae* Lamb., forest nursery.

Fecha de recepción/date of receipt: 8 de noviembre de 2013; Fecha de aceptación/date of acceptance: 20 de agosto de 2014.

¹ División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo. Correo-e: dcibrian48@gmail.com

² Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo.

Introducción

En México, el mosco fungoso negro *Bradysia* spp. (Diptera: Sciaridae) es considerado una plaga mayor en los viveros e invernaderos que se ubican en el centro del país (Cibrián *et al.*, 2008; García, 2008). En los meses de primavera a otoño, las condiciones ambientales de alta humedad y temperatura son adecuadas para que la población aumente rápidamente, siendo muy abundante en pocas semanas. Poblaciones grandes de adultos de mosco fungoso pueden ser un problema en la producción de plántulas, debido a que sobre su cuerpo pueden llevar esporas de hongos patógenos (Gillespie y Menzies, 1993; Pundt, 1999; Shamshad *et al.*, 2009; Springer, 1995a). Las larvas se alimentan de materia orgánica en descomposición, hongos y raíces de plantas sanas (James *et al.*, 1995; Mohrig y Menzel, 2009; Steffan, 1981); la raíz, al ser herida, queda expuesta a la entrada de hongos patógenos (James *et al.*, 1995; Kalb y Millar, 1986; Pundt, 1999). Gardiner *et al.* (1990) demostraron que las larvas de *Bradysia impatiens* (Johannsen, 1912) pueden servir como vector de *Pythium* spp., ya que ingieren estructuras fúngicas de este organismo y una vez que pasan por el tracto digestivo de las larvas, las oosporas germinan de manera normal.

En el vivero forestal Temamatla, Estado de México, las plántulas atacadas por larvas del mosco fungoso negro presentan síntomas que son confundidos con los de otros patógenos: pérdida de vigor, marchitez súbita, pudrición de raíz, follaje amarillento, escaso crecimiento y caída de hojas; estos síntomas también son reportados por Cibrián *et al.* (2008); Pundt (1999) y Springer (1995a; 1995b). En Canadá y Estados Unidos de América, el mosco fungoso causa daños en viveros que usan el sistema de producción en contenedores (Keates *et al.*, 1989; Landis *et al.*, 1989; James *et al.*, 1995).

De las especies de mosco fungoso negro que tienen mayor importancia económica, amplia distribución mundial y se alimentan de un gran número de especies de plantas y hongos comestibles en la dieta del hombre, están *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1939) y *Bradysia impatiens* (Johannsen, 1912) (Diptera: Sciaridae) (Mohrig *et al.*, 2012; Shin *et al.*, 2013).

L. ingenua es plaga principal en la producción del champiñón *Agaricus bisporus* Lange (Imbach) (Agaricaceae) (White, 1981; White, 1999; White *et al.*, 2000; O'Connor and Keil, 2005; Shamshad *et al.*, 2009; Erler *et al.*, 2011). En Rusia *L. ingenua* está registrada como plaga en invernaderos (Komarov, 2009).

B. impatiens es menos común que *L. ingenua* en la producción de hongos (White *et al.*, 2000), pero más en viveros e invernaderos de ornamentales, hortícolas y forestales; en Italia causa daños en donde se cultiva *Eucalyptus* (Mansilla *et al.*, 2001) y en Sudáfrica ataca las raíces de plántulas de pino en algunos viveros (Hurley *et al.*, 2007, 2010).

Introduction

In Mexico, the black fungus gnat *Bradysia* spp. (Diptera: Sciaridae) is considered a major pest in nurseries and greenhouses that are located at the Central part (Cibrián *et al.*, 2008; García, 2008). In the spring to autumn, the environmental conditions of high humidity and temperature are adequate for the population to grow rapidly, being very abundant in a few weeks. Large populations of fungus gnat adults can be a problem in the production of seedlings, as they can carry spores of pathogenic fungi on their body (Gillespie and Menzies, 1993; Pundt, 1999; Shamshad *et al.*, 2009; Springer, 1995a). The larvae feed on decaying organic matter, fungi and roots of healthy plants (James *et al.*, 1995; Mohrig and Menzel, 2009; Steffan, 1981); the root, when wounded, is exposed to the entrance of pathogenic fungi (James *et al.*, 1995; Kalb and Millar, 1986; Pundt, 1999). Gardiner *et al.* (1990) demonstrated that *Bradysia impatiens* (Johannsen, 1912) larvae can serve as *Pythium* spp. vectors, as they eat fungal structures of this organism, and once they pass through the digestive tract of them, oospores germinate normally.

In Temamatla forest nursery, State of Mexico, seedlings attacked by larvae of the black fungus gnat show symptoms that are mistaken for other pathogens: loss of vigor, sudden wilt, root rot, yellowing foliage, poor growth and leaf fall; these symptoms are also reported by Cibrián *et al.* (2008); Pundt (1999) and Springer (1995a; 1995b). In Canada and the United States, the fungus mosquito causes damage in nurseries using the production system in containers (Keates *et al.*, 1989; Landis *et al.*, 1989; James *et al.*, 1995).

Of the black fungus gnats that are more economically important, wide world distribution and that feed upon a great number of species of plants and edible mushrooms in human diet are *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1939) and *Bradysia impatiens* (Johannsen, 1912) (Diptera: Sciaridae) (Mohrig *et al.*, 2012; Shin *et al.*, 2013).

L. ingenua is a major plague in the production of *Agaricus bisporus* Lange (Imbach) (Agaricaceae) mushroom (White, 1981; White, 1999; White *et al.*, 2000; O'Connor and Keil, 2005; Shamshad *et al.*, 2009; Erler *et al.*, 2011). *L. ingenua* is reported as a plague in Russian greenhouses (Komarov, 2009).

B. impatiens is less common than *L. ingenua* in fungus production (White *et al.*, 2000), but it is more frequent in nurseries and greenhouses of ornamental, horticultural and forestry products; in Italy it causes damages where *Eucalyptus* spp. is cultivated (Mansilla *et al.*, 2001) and in South Africa it attacks the roots of pine seedlings in some nurseries (Hurley *et al.*, 2007, 2010).



El control del mosco fungoso se hace por medio de insecticidas químicos, reguladores de crecimiento y bioplaguecidas. Erler *et al.* (2011) obtuvieron buenos resultados de control de *L. ingenua* en la producción de *A. bisporus*, al aplicar diferentes reguladores de crecimiento en el riego. Mansilla *et al.* (2001) consignan que en condiciones de laboratorio en cajas de Petri los insecticidas flufenoxuron, diflubenzuron, deltametrina y azadiractina controlan las larvas de *Bradysia difformis* Frey, 1948.

Desde 2010 se registró el mosco fungoso negro en el vivero forestal de Temamatla, en el Estado de México, que atacaba las raíces de plántulas de *Pinus montezumae* Lamb. Los daños incidieron sobre todo el sistema de producción y redujeron las metas en 2011 y 2012. Para su control, los técnicos del vivero realizaron aplicaciones consecutivas de insecticidas, principalmente oxamil, carbofuran y clorpirifos, pero no lograron resultados aceptables; por ello, se decidió desarrollar el presente estudio con el objetivo de ofrecer nuevas alternativas de control químico y con bioplaguecidas para el combate de este insecto.

Materiales y Métodos

Ensayo de control del mosco fungoso negro

El ensayo se realizó en el vivero forestal de Temamatla, que se ubica a 2 270 m de altitud, entre los 19°45'11" norte y 99°11'15" oeste. El clima predominante en la región es templado subhúmedo; las temperaturas más altas se presentan de abril a junio. La máxima y mínima extremas son de 26 °C a 29 °C y de 5 °C a 3 °C, respectivamente. Las más bajas se verifican de octubre a enero y la media anual es de 12.5 °C, con lluvias en verano.

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Se usaron tres dosis por producto: media (recomendada por el fabricante); alta 20 % más que la media; baja 20 % menos que la media, y un testigo al que solo se le puso agua de riego (Cuadro 1). Cada dosis se incorporó a un contenedor de plástico con 54 tubetes de 210 ml de capacidad. La proporción del sustrato usado fue de 1 parte de turba, 2 de perlita, 2 de vermiculita y 66.66 g de fertilizante iniciador por contenedor. Las dosis se diluyeron en agua de riego, y se agregaron con regadera manual. Se realizaron seis aplicaciones, con un intervalo de 20 días entre ellas. La primera se hizo el 1 de febrero de 2013 a los cuatro meses de edad de las plántulas de *Pinus montezumae*, con el fin de que las plantas se infestaran de manera natural del mosco fungoso, que ya existían en las platabandas del vivero desde la producción anterior.

Antes de los tratamientos, se contaron y se registraron las plántulas sanas y las enfermas; las últimas se removieron 20 días después de la incorporación final. Para determinar si la causa de que parecieran enfermas se debía a las larvas del mosco fungoso, a cada una de ellas se le asignó una de cuatro

The black fungus gnat control is made by means of chemical insecticides, growth regulators and bioplaguecides. Erler *et al.* (2011) obtained good results of *L. ingenua* control in *A. bisporus* production when applying different growth regulators in watering. Mansilla *et al.* (2001) record that under laboratory conditions in Petri boxes, flufenoxuron, diflubenzuron, deltametrine and azadiractine control *Bradysia difformis* Frey, 1948 larvae.

Since 2010 the black fungus gnat was found in *Temamatla* forest nursery, State of Mexico, that attacked the roots of *Pinus montezumae* Lamb. seedlings. Damages acted upon the whole production system and reduced the 2011 and 2012 goals. In order to control these insects, the technicians of the nursery made of consecutive applications of insecticides, mainly oxamil, carbofuran and chlorpyrifos but that did not achieve satisfactory results; thus, it was decided to carry out this study with the aim to offer new options of chemical control and with bioplaguecides to combat this insect.

Materials and Methods

Black fungus gnat control assay

The assay was made at *Temamatla* forest nursery, which is located at 2 270 m high, between 19°45'11" north and 99°11'15" west. The prevailing climate in the region is subhumid mild; the highest temperatures occur from April to June. The maximum and minimum extremes are 26 °C to 29 °C and 5 °C to 3 °C, respectively. The lowest take place from October to January and the annual mean is 12.5 °C, with summer rains.

The experiment was established under a completely at random design with four replications by treatment. Three doses by product were used: mean (recommended by the manufacturer); high, 20 % over the mean; low, 20 % less than the mean, and one control in which only watering water was added (Table 1). Each dose was input into the plastic container with 54 tubettes of 210 ml each. The distribution of the substrate that was used was: 1 part of peat, 2 of perlite, 2 of vermiculite and 66.66 g of starting fertilizer by container. Doses were diluted in watering water and they were added by regular watering can. Six applications were made with an interval of 20 days. The first one was made on February 1st, 2013 on *Pinus montezumae* seedlings four months old, with the aim that these plants were infested naturally by the black fungus gnat as they existed in the plant-beds of the nursery since the previous production.

Before the treatments, all healthy or sick plants were counted and recorded; the latter were removed 20 days after the last application. To determine if the cause of their apparent sickness were the larvae of the black fungus gnat, each one of them was assigned into one of the following four categories: a) dead larvae inside the root; b) live larvae inside the root;

categorías: a) larvas muertas dentro de la raíz; b) larvas vivas dentro de la raíz; c) evidencia de que hubo larvas como: excremento, mudas de cabezas y túneles en la raíz; y d) larvas vivas, junto y fuera de la raíz.

Cada raíz fue examinada a partir de un corte longitudinal y se le retiró la corteza externa; además, se le revisó el cuello. Aleatoriamente, 10 % de las plantas sanas fueron revisadas para verificar la presencia de larvas. Las plantas que mostraron síntomas de enfermedad debido a otros factores como hongos, daño mecánico o ataque de otros insectos, no se incluyeron en el conteo del porcentaje de daño por larvas del mosco fungoso.

c) evidence that there were larvae such as: excrement, shedding of heads and tunnels in the root and d) live larvae, together and out of the root.

Each root was examined from a length cutting and the external bark was removed; in addition, the neck was reviewed. Randomly, 10 % of the healthy plants were analyzed to verify the presence of larvae. The plants that showed symptoms of disease due to other factors such as fungi, mechanical damage or attack of other insects, were not included in counting the percentage of damage by black fungus gnast larvae.

Cuadro 1. Tratamientos, ingrediente activo, formulación y dosis usada por tratamiento.
Table 1. Treatments, active ingredient, formulation and used dose by treatment.

Tratamiento	Ingrediente activo	Formulación	Dosis
T1	Oxamil	24 % L ⁻¹	Alta 1.2 mL L ⁻¹
T2	Oxamil	24 % L ⁻¹	Media 1 mL L ⁻¹
T3	Oxamil	24 % L ⁻¹	Baja 0.8 mL L ⁻¹
T4	Clorpirifos	480 g L ⁻¹	Alta 1.2 mL L ⁻¹
T5	Clorpirifos	480 g L ⁻¹	Media 1 mL L ⁻¹
T6	Clorpirifos	480 g L ⁻¹	Baja 0.8 mL L ⁻¹
T7	Imidacloprid	350 g L ⁻¹	Alta 0.6 mL L ⁻¹
T8	Imidacloprid	350 g L ⁻¹	Media 0.5 mL L ⁻¹
T9	Imidacloprid	350 g L ⁻¹	Baja 0.4 mL L ⁻¹
T10	Espirotermat	15.30 % L ⁻¹	Alta 0.6 mL L ⁻¹
T11	Espirotermat	15.30 % L ⁻¹	Media 0.5 mL L ⁻¹
T12	Espirotermat	15.30 % L ⁻¹	Baja 0.4 mL L ⁻¹
T13	Carbofuran	350 g L ⁻¹	Alta 1.2 mL L ⁻¹
T14	Carbofuran	350 g L ⁻¹	Media 1 mL L ⁻¹
T15	Carbofuran	350 g L ⁻¹	Baja 0.8 mL L ⁻¹
T16	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Berliner, 1915)	0.6 %	Alta 1.2 g L ⁻¹
T17	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Berliner, 1915)	0.6 %	Media 1 g L ⁻¹
T18	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Berliner, 1915)	0.6 %	Baja 0.8 g L ⁻¹
T19	Agua (testigo)	-	-



Eficacia de tratamientos

La eficacia de los tratamientos se calculó mediante el porcentaje de plantas dañadas, con presencia o evidencia de larvas. La evaluación se hizo con respecto al total de las 54 plántulas de *P. montezumae* por tratamiento.

$$\text{Porcentaje de plantas dañadas} = (\text{Plantas con presencia de daño o larvas} / \text{total de plantas}) \times 100$$

Con esta cifra se calculó el correspondiente a las plántulas sanas para los diferentes tratamientos.

$$\text{Porcentaje de plantas sanas} = 100 \% \text{ de plantas} - \text{porcentaje de plantas con daño}$$

Los datos en porcentaje se modificaron al usar la transformación angular o arcoseno, los que tienden a una distribución binomial, en lugar de una distribución normal. En esta las varianzas se relacionan con las medias (Daniel, 1996). La transformación angular se hizo con la siguiente fórmula:

$$\text{Arcoseno} \sqrt{\text{Porcentaje} / 100}$$

Con los datos originales en porcentaje y transformados se aplicó un análisis de varianza ANOVA y una prueba de medias de Tukey para identificar el tratamiento más eficiente. Además, para comparar la eficacia de los tratamientos se compararon las medias de contrastes ortogonales con un nivel de significancia de 5 % ($\alpha = 0.05$). Dicha prueba se utiliza cuando se tiene un conjunto de tratamientos contra otro conjunto igual.

Resultados y Discusión

El análisis de varianza (ANOVA) del experimento mostró que hay evidencias estadísticas ($P < 0.0001$) para afirmar que la efectividad de que alguno de los insecticidas probados contra el mosco fungoso es diferente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis de varianza de porcentajes de protección de plántulas por tratamiento.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr>F
Insecticidas	18	7 866.734	437.047	75.14	<.0001
Error	57	331.543	5.816		
Total correcto	75	8 198.28			

Table 2. Analysis of variance of percentages of protection of seedlings by treatment.

Source	FD	Sum of squares	Mean square	Calculated F	Pr>F
Insecticides	18	7866.734	437.047	75.14	<.0001
Error	57	331.543	5.816		
Corrected Total	75	8198.28			

Treatment effectiveness

The calculation of the effectiveness of treatments was made by the percentage of damaged plants, with the presence or evidence of larvae. This assessment was made in regard to the total of 54 seedlings of *P. montezumae* by treatment.

$$\text{Percentage of damaged plants} = (\text{Plants with the presence of damage or larvae} / \text{total of plants}) \times 100$$

With this number the corresponding number of healthy seedlings for the different treatments were calculated.

$$\text{Percentage of healthy plants} = 100 \% \text{ of plants} - \text{percentage of plants with damage}$$

The data in percentage were changed by using the angular or arcsine transformation. These data tend to a binomial distribution instead of a normal distribution. In this distribution, variances are related with the means (Daniel, 1996). The angular transformation was made with the following formula:

$$\text{Arcsine} \sqrt{\text{Percentage} / 100}$$

With the original and transformed percentage data an analysis of variance ANOVA and a Tukey's mean test was made to identify the most efficient treatment. In addition, in order to compare the effectiveness of the treatments a comparison of means of orthogonal contrasts was made, with a significance level of 5 % ($\alpha = 0.05$). This test is used when there is a group of treatments against an equal group of treatments.

Results and Discussion

The analysis of variance (ANOVA) of the experiment revealed that there are statistical evidences ($P < 0.0001$) to state that the effectiveness of one of the tested insecticides against the black fungus gnast is different (Table 2).

El ANOVA indica que al menos un insecticida tiene efecto diferente; sin embargo, no precisa cuál o cuáles son los que actúan de forma distinta, por lo que se aplicó una prueba de comparaciones múltiples (Tukey). De ello resultó que los mejores tratamientos fueron el imidacloprid en dosis alta y baja, en los cuales las medias son significativamente diferentes al nivel de 5 %, lo que otorga una protección de 100 %. Espirotramat a dosis alta (96.17 %) también tuvo un buen desempeño, así como oxamil en igual dosis (95.75), clorpirifos en media (95.74), e imidacloprid en alta (95.29). Solamente oxamil en baja, carbofuran en alta, BTI en baja y carbofuran en baja no fueron significativamente diferentes al testigo, mismo que tuvo una mortalidad de plántulas de 43.39 % (Cuadro 3).

ANOVA indicates that at least the insecticide has a different effect; however, it does not specify which is or are the ones that act in such a way; thus, a multiple comparison test (Tukey) was applied, which revealed that the best treatments were imidacloprid at high and low dose, in which the means are significantly different at 5 %, which provides a 100 % protection. Spirotetramat at high dose (96.17 %) also had a good behavior, as well as oxamil in equal doses (95.75), chlorpyrifos in medium (95.74), and imidacloprid in high (95.29). Only oxamil at low, carbofuran in high, BTI in low and carbofuran in low were significantly different to control, which had seedling mortality of 43.39 % (Table 3).

Cuadro 3. Prueba de medias de Tukey, para eficacia de protección de plantas.
Table 3. Tukey's mean test for the effectiveness of plant protection.

Tratamiento	Media original %	Media transformada
T7 Imidacloprid alta	100.00 A	90.00 A
T8 Imidacloprid media	100.00 A	90.00 A
T10 Espirotramat alta	95.753 AB	79.675 B
T1 Oxamil alta	96.168 AB	78.733 BC
T5 Clorpirifos media	95.743 AB	78.130 BCD
T9 Imidacloprid baja	95.290 AB	77.800 BCD
T4 Clorpirifos alta	91.533 BC	73.173 CDE
T2 Oxamil media	90.490 BCD	72.113 DE
T14 Carbofuran media	86.443 CDE	68.430 EF
T12 Espirotramat baja	84.900 DEF	67.173 EF
T16 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Berliner, 1915) alta	84.618 DEF	67.063 EF
T18 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Berliner, 1915) baja	80.675 EFG	63.975 FG
T6 Clorpirifos baja	79.598 FG	63.200 FGH
T11 Espirotramat medio	79.438 FG	63.035 FGH
T3 Oxamil baja	75.003 GH	60.033 GHI
T13 Carbofuran alta	72.893 H	58.628 GHI
T17 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Berliner, 1915) baja	70.895 H	57.365 HI
T15 Carbofuran baja	70.090 H	56.890 HI
T19 Agua (testigo)	69.693 H	56.613 I

Se compararon grupos de insecticidas afines mediante la prueba de contrastes ortogonales (Cuadro 4). El contraste C1 compara todos los tratamientos contra el testigo, de lo que resultó que son significativamente diferentes al último. El contraste C2 compara los insecticidas químicos contra el BTI, y aquí los insecticidas químicos son significativamente diferentes al BTI; el contraste C3 compara los insecticidas que se han usado tradicionalmente en el vivero de Temamatla para controlar al

Groups of similar insecticides were compared by the orthogonal contrast test (Table 4). C1 compares all treatments against control, which resulted in that they are significantly different to the latter. C2 compares the chemical insecticides against BTI, and here they are significantly different to the product; C3 compares the insecticides that have been traditionally used in *Temamatla* nursery to control the black fungus gnast against two new insecticides and there are

mosco fungoso negro contra dos insecticidas nuevos; existen diferencias altamente significativas entre estos productos; y los más eficientes fueron imidacloprid y espirotetramat que son insecticidas de nueva generación; en el C4 se compararon oxamil, imidacloprid, espirotetramat y carbofuran contra clorpirifos, los cuales pertenecen a los organofosforados, también se obtuvieron diferencias altamente significativas.

highly significant differences among these products; the most efficient were imidacloprid and spirotetramat, which belong to the new generation; C4 compared oxamil, imidacloprid, spirotetramat and carbofuran to chlorpyrifos, which belongs to the organophosphates; in this last contrast there are also highly significant differences.

Cuadro 4. Contrastes ortogonales calculados a partir de transformación arcoseno.

Contraste	GL	SC	CM	Valor F	Pr>F
C1 Oxamil, clorpirifos, imidacloprid, espirotetramat, carbofuran y <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Berliner, 1915)vs testigo	1	710.02	710.02	117.60	0.0001
C2 Oxamil, clorpirifos, imidacloprid, espirotetramat y carbofuran vs <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Berliner, 1915)	1	809.97	809.97	134.16	0.0001
C3 Oxamil, clorpirifos y carbofuran vs imidacloprid, espirotetramat	1	1 518.97	1 518.97	251.59	0.0001
C4 Oxamil, imidacloprid, espirotetramat y carbofuran vs clorpirifos	1	1 648.97	1 648.97	273.13	0.0001

Table 4. Calculated orthogonal contrasts from the arcsine transformation.

Contraste	GL	SC	CM	Valor F	Pr>F
C1 Oxamil, chlorpyrifos, imidacloprid, spirotetramat, carbofuran y <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Berliner, 1915)vs testigo	1	710.02	710.02	117.60	0.0001
C2 Oxamil, chlorpyrifos, imidacloprid, spirotetramat, y carbofuran vs <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Berliner, 1915)	1	809.97	809.97	134.16	0.0001
C3 Oxamil, chlorpyrifos y carbofuran vs imidacloprid, spirotetramat	1	1 518.97	1 518.97	251.59	0.0001
C4 Oxamil, imidacloprid, spirotetramat y carbofuran vs chlorpyrifos	1	1 648.97	1 648.97	273.13	0.0001

Imidacloprid fue el mejor insecticida; en sus dosis alta y media lograron la protección de 100 % de las plantas y la dosis baja alcanzó 95.29 %. Los resultados concuerdan con los obtenidos por Cloyd y Dickinson (2006) quienes destacan a imidacloprid como efectivo para controlar las larvas de *Bradysia* sp. y de *Coprophila* sp. (Lintner) de segundo y tercer estadio en laboratorio. El alto grado de protección del imidacloprid se puede deber a que es un insecticida sistémico adsorbido por las raíces y transportado por toda la planta a través del xilema; sus propiedades permiten que los insectos que comen de la raíz se intoxiquen y mueran.

Imidacloprid was the best insecticide; in its high and medium dose they achieved a 100 % protection of plants and a low one, 95.29 %. The results of this study agree with those of Cloyd and Dickinson (2006) who declared that imidacloprid was effective to control the second to third stage larvae of *Bradysia* sp. and *Coprophila* sp. (Lintner) in the laboratory. This high degree of protection might be explained from the fact that it is a systemic insecticide adsorbed by the roots of the plants and transported by the whole of it by the xylem; their properties allow that the insects that eat the roots get intoxicated and die.

La dosis alta de espirotetramat protegió a 96.75 % de las plantas; en cambio, las baja y media, 84.90 % y 79.43 %. En todas las raíces evaluadas en estos tratamientos, solo en una se encontraron larvas muertas, en el resto se tuvieron rastros, por lo que es muy probable que el producto controlara a las larvas de

The high dose of spirotetramat protected 96.75 % of the plants; conversely, the low and medium 84.90 % and 79.43 %. In all the analyzed roots with this treatments, only in one, dead larvae were found; in the rest, there were only traces of them, which suggests that it is very probable that the product controlled the black fungus gast. This systemic product belongs to the derivatives of the tetrone and tetramic acids, it does not persist in the environment and it is not bioaccumulative; its action mode inhibits lipid synthesis: it has double mobility, and that is why it could be applied to foliage and to the ground, which favors its application.



mosco fungoso. Este es un producto sistémico perteneciente a los derivados de los ácidos tetrónicos y tetrámicos, no es persistente en el ambiente y no es bioacumulable; su modo de acción inhibe la síntesis de lípidos; es de movilidad dual, por lo que podría ser aplicado al follaje y al suelo, lo que facilita su empleo.

Las dosis alta y media de oxamil lograron la protección de 96.17 % y 90.49 % de las plantas. Sin embargo, en la dosis baja se obtuvo una protección de 75 %, que no fue significativamente diferente al testigo. Este producto es un insecticida-nematicida de acción sistémica que actúa por ingestión y contacto, en los insectos atraviesa la cutícula y penetra al interior hasta llegar al sistema nervioso. El oxamil es incompatible si se utilizan nemátodos entomopatógenos como *Steinernema* sp. (Pundt, 1999).

Con las dosis media, alta y baja de clorpirifos se obtuvieron 95.74 %, 91.53 % y 79.60 % de protección de plántulas. Los resultados de clorpirifos concuerdan con los de Aguilera y Ortega (1996) al asperjar en bolsas de plástico clorpirifos en dosis de 0.58 L ha⁻¹ mensualmente en *Trifolium pratense* L. para controlar a *Bradysia coprophila* Lintner. Erler *et al.* (2011) refieren que clorpirifos pueden reducir la emergencia de adultos de *Lycoriella ingenua* Dufour, 1839 en el cultivo de *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Emil J. Imbach en 81 %. Este dato corrobora el nivel de protección alcanzado en el presente trabajo. White (1981) indica que *Lycoriella auripila* Winnertz ha desarrollado resistencia a los insecticidas organofosforados.

La dosis media de carbofuran registró 86.44 % de protección. La dosis alta y baja lograron 72.89 % y 56.89 % de la planta, sin una diferencia significativa del testigo. Además, la dosis alta causó clorosis en las plántulas de *P. montezumae*, lo que sugiere que les resulta fitotóxica, les causa estrés y tuvieron mayor número de larvas en ellas, por lo que es posible que les genere mayor susceptibilidad al ataque de los insectos. En los cortes de las raíces que recibieron dosis alta y media se encontraron larvas muertas y evidencia de las mismas, mientras que en la dosis baja se identificaron larvas vivas, muertas y evidencia de larvas. Los resultados sugieren que el carbofuran no controló eficientemente al mosco fungoso negro y que posiblemente ya exista resistencia al insecticida, pues es de los más utilizados en el vivero de Temamatla, lo que puede responder, además, a que este insecto tiene generaciones de ciclo corto, sobrepuestas y las hembras son de alta fertilidad.

En dosis alta y baja los BtI protegieron de 84.62 % a 80.67 %, porcentajes significativamente diferentes al testigo, pero la dosis media de 70.89 % no fue diferente al testigo. Varios estudios indican que BtI puede ser efectivo para el control de larvas de mosco fungoso negro (James *et al.*, 1995; White, 1999). Van Epenhuijsen *et al.* (2001) consigna que el BtI reduce las poblaciones *Bradysia* sp. nr. *paupera* Tuomikoski en plántulas de tabaco. Sin embargo, la efectividad es por unos cuantos días (James *et al.*, 1995; Pundt, 1999). Según Pundt (1999) el BtI tiene una efectividad de 48

The high and medium doses of protected 96.17 % and 90.49 % of plants. However, the low dose protected 75 %, which was not significantly different from control. This is a nematicide-insecticide product of systemic action, that acts by ingestion and contact; in the insects it goes through the cuticle and penetrates into them up to the nervous system. Oxamil is incompatible with entomopatogenous nemathods like *Steinernema* sp (Pundt, 1999).

With medium, high and low doses of chlorpyrifos, 95.74 %, 91.53 % and 79.60 % of plant protection, results that agree with those of Aguilera and Ortega (1996) as they sprayed this product in plastic bags at 0.58 L ha⁻¹ dose monthly upon *Trifolium pratense* L. to control *Bradysia coprophila* Lintner. Erler *et al.* (2011) refer that chlorpyrifos may reduce the emergence of *Lycoriella ingenua* Dufour, 1839 adults in the cultivation of *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Emil J. Imbach around 81 %. This datum confirms the protection level accomplished in the actual experiment. White (1981) states that *Lycoriella auripila* Winnertz has developed resistance to the organophosphates insecticides.

The medium dose of carbofuran was 86.44 % of protection. The high and low doses accomplished 72.89 % and 56.89 % of the plant, without a significant difference from control. Also, the high dose caused chlorosis in the seedlings of *P. montezumae*, which suggests that it is phytotoxic for them, it causes them stress and had a greater number of larvae in them; thus, it is possible that it even provokes susceptibility to the attack of insects. In the cuttings of roots that had high and medium doses, dead larvae were found as well as traces of them, while in the low dose, live, dead and traces were observed. These results suggest that carbofuran did not control efficiently the black fungus gast and that possibly there is resistance to the insecticide, since it is one of the most regularly used in *Temamatla* nursery, which might be explained, too, by the fact that this insect has short-cycle overlapped generations, and that females have high fertility.

High and low doses of BtI protected 84.62 % to 80.67 %, which are significantly different from control, but the medium 70.89 % dose was not different from it. Several studies indicate that BtI may be effective for the control of the black fungus gast larvae (James *et al.*, 1995; White, 1999). Van Epenhuijsen *et al.* (2001) records that BtI may reduce the *Bradysia* sp. nr. *paupera* Tuomikoski populations in Tabaco seedlings. However, the efficiency is for only a few days (James *et al.*, 1995; Pundt, 1999). According to Pundt (1999), BtI has a 48 hour efficiency, which makes it necessary to repeat the treatment twice or thrice. Cloyd and Dickinson (2006) found evidence that *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* has no effect on the control of the larvae of second and third instar of the black fungus gast. When the bacteria is suspended in water, it is ingested by the larva during its feeding process, which makes that the efficiency of BtI over the larva depends basically on the amount of ingested toxin in a specific time (WHO, 1989). Therefore, the protection levels achieved by BtI in this study may be due

horas, por lo que es necesario repetir el tratamiento de dos a tres veces. Cloyd y Dickinson (2006) observaron evidencia que el *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* no tiene efecto para controlar larvas de segundo y tercer instar del mosquito fungoso negro. La bacteria, al estar suspendida en agua, es ingerida por la larva durante su alimentación, por lo que la eficacia de BtI sobre la larva depende básicamente de la cantidad de toxina ingerida en un tiempo determinado (WHO, 1989). Por tal motivo, los niveles de protección logrados por el BtI en este estudio pueden deberse a que la evaluación de larvas se realizó a los 20 días de la última aplicación. Además, pudo contribuir el hecho de que entre aplicaciones se dejó un periodo de 20 días, tiempo suficiente para que se volvieran a infestar de larvas.

Las dosis bajas de clorpirifos, carbofuran y oxamil no protegieron a las plántulas satisfactoriamente, pues se identificaron larvas dentro de las raíces. Esto se puede explicar porque el mosquito fungoso ha desarrollado resistencia a dosis bajas de estos productos. En Temamatla se han usado en repetidas ocasiones para combatirlo.

La resistencia al mosquito fungoso negro se atribuye al ciclo biológico de aproximadamente un mes (Frouz y Nováková, 2001; Lewandowski *et al.*, 2004; Mansilla *et al.*, 2001; Pundt, 1999; Steffan, 1974; Wilkinson y Daugherty, 1970), a lo que contribuye la estrategia de sobreponer sus generaciones, y a que los tratamientos aplicados en el experimento fueron de 20 % menos que las dosis recomendadas por el fabricante. Al respecto, White (1981) describe la resistencia de *Lycoriella auripila* a los organofosforados (clorpirifos), lo que puede contribuir a explicar los resultados obtenidos.

Conclusiones

Los insecticidas oxamil, spirotetramad, imidacloprid, carbofuran y clorpirifos, son efectivos para el control de las larvas del mosquito fungoso negro. El carbofuran en dosis alta puede ser tóxico para las plántulas de *P. montezumae*, pero en dosis bajas no controla al mosquito fungoso, por lo que este producto no se recomienda para el manejo del insecto en cuestión.

Con BtI no se tuvieron buenos resultados, por lo que se sugiere realizar estudios posteriores para conocer sus alcances para controlar al organismo de interés en viveros forestales. Las aplicaciones de este producto deben ser de dos a tres con un periodo entre aplicación de cuatro días. 🍃

to the assessment of larvae that was made after 20 days of the last application. Also, a contribution might come from the fact that between applications a 20 day period was left, enough time to have a new larvae infestation.

Chlorpyrifos, carbofuran and oxamil at low doses did not protect seedlings in a satisfactory way, since larvae were found inside the roots. This could be attributed to the possibility that the black fungus gnat has developed resistance to low doses of these products. They have been repeatedly used in Temamatla to fight this insect.

The resistance to the black fungus gnat is attributed to the fact that it has an almost one-month long biological cycle (Frouz and Nováková, 2001; Lewandowski *et al.*, 2004; Mansilla *et al.*, 2001; Pundt, 1999; Steffan, 1974; Wilkinson and Daugherty, 1970), to which helps the overlapping of its generations, and, as well as to a 20 % less than the recommended doses by the manufacturer that were applied in these treatments. In this context, White (1981) describes the resistance of *Lycoriella auripila* to organophosphates (chlorpyrifos), which could explain this outcome.

Conclusions

Oxamil, spirotetramad, imidacloprid, carbofuran and chlorpyrifos are effective for the control of the black fungus gnat larvae.

High doses of carbofuran may be toxic for *P. montezumae* seedlings, but in low doses it does not control the gnat; therefore, this product is not recommended for the management of this insect.

There were no good results with BtI, which suggests it is necessary to carry on further studies to know its potential to control the organism in forest nurseries. Applications of this product must be two to three with a four day period between them. 🍃

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Major of Cavalry Teodoro Ariel Ake Dzib chief of the forest nursery, to Engineers Alberto González Enríquez, Oscar Andrés Azuara González y Alejandro Castro Moreno, technicians of Temamatla nursery, for their support in field work in the black fungus gnat control.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Contributions by Author

Victor Hugo Marín-Cruz: Establishment of the bioassay, review at the field, writing and structure of the document, data taking at the field and data processing; David Cibrián-Tovar: Selection of study units, dose and products



Agradecimientos

Al Mayor de Caballería Teodoro Ariel Ake Dzib, Jefe del vivero forestal militar Temamatla; a los Ingenieros Alberto González Enríquez, Óscar Andrés Azuara González y Alejandro Castro Moreno personal técnico del Vivero de Temamatla, por su apoyo en la fase de campo en el control del mosco fungoso negro.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos no tener conflicto de intereses

Contribución por Autor

Victor Hugo Marín-Cruz: establecimiento del bioensayo, revisión en campo, elaboración y estructura del manuscrito, toma de datos en campo y en procesamiento de datos; David Cibrián-Tovar: selección de unidades de estudio, determinación de dosis y productos, elaboración y revisión del manuscrito; José Tulio Méndez-Montiel: determinación de diseño experimental, análisis estadístico, interpretación de resultados, revisión del manuscrito; Omar Alejandro Pérez-Vera: revisión de material biológico, trabajo de biología molecular y revisión del manuscrito; José Artemio Cadena-Meneses: determinación del diseño experimental, revisión del manuscrito.

determination, preparation and review of the document; José Tulio Méndez-Montiel: Experimental design, statistical analysis, interpretation of results and review of the document; Omar Alejandro Pérez-Vera: Review of biologic material, molecular biology work and review of the document; José Artemio Cadena-Meneses: Experimental design and review of the document.

End of the English version



Referencias

- Aguilera, P. A. y K. F. Ortega. 1996. *Bradysia coprophyla* (Lintner) (Diptera: Sciaridae) en trébol rosado (*Trifolium pratense* L.). *Agricultura Técnica* 56(2): 135-138.
- Cibrián T., D., D. S. García y M. B. Don Juan. 2008. Manual de identificación y manejo de plagas y enfermedades en germoplasma y planta producida en viveros. Comisión Nacional Forestal. Guadalajara, Jal., México. pp. 60-61.
- Cloyd, A. R. and A. Dickinson. 2006. Effect of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and neonicotinoid insecticides on the fungus gnat *Bradysia* sp. nr. *coprophyla* (Lintner) (Diptera: Sciaridae). *Pest Management Science* 62(2): 171-177.
- Daniel, W. W. 1996. Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la salud. UTHEA Noriega. México, D.F., México. 878 p.
- Erler, F., E. Polat, H. Demir, M. Catal and G. Tuna. 2011. Control of mushroom sciarid fly *Lycoriella ingenua* populations with insect growth regulators applied by soil drench. *Journal of Economic Entomology* 104(3): 839-844.
- Frouz, A., y A. Nováková. 2001. A new method for rearing the sciarid fly, *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae) in the laboratory: possible implications for the study of fly-fungal interactions. *Pedobiologia* 45: 329-340.
- García P., F. 2008. Fungus Gnast. Insecto plaga en ornamentales. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México, D.F., México. 6 p.
- Gardiner, R. B., W. R. Jarvis and J. L. Shipp. 1990. Ingestion of *Phytium* spp. by larvae of the fungus gnat *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). *Annals of Applied Biology* 116: 205-212.
- Gillespie, R. D. and J. G. Menzies. 1993. Fungus gnats vector *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Annals of Applied Biology* 123: 539-544.
- Hurley, B. P., B. Slippers, T. A. Coutinho, B. D. Wingfield, P. Govender and M. J. Wingfield. 2007. Molecular detection of fungi carried by *Bradysia difformis* (Sciaridae: Diptera) in South African forestry nurseries. *Southern Hemisphere Forestry Journal* 69(2): 103-109.
- Hurley, B. P., B. Slippers, B. D. Wingfield, P. Govender, J. E. Smith and M. J. Wingfield. 2010. Genetic diversity of *Bradysia difformis* (Sciaridae: Diptera) populations reflects movement of an invasive insect between forestry nurseries. *Biological Invasions* 12: 729-733.
- James, R. L., R. K. Dumroese and D. L. Wenny. 1995. *Botrytis cinerea* carried by adult fungus gnats (Diptera: Sciaridae) in container nurseries. *Tree Planters Notes* 46 (2): 48-53.
- Kalb, D. W. and R. L. Millar. 1986. Dispersal of *Verticillium albo-atrum* by the fungus gnats (*Bradysia impatiens*). *Plant Disease* 70: 752-753.
- Keates, S. E., R. N. Sturrock and J. R. Sutherland. 1989. Populations of adult fungus gnats and shore flies in British Columbia container nurseries as related to nursery environment and incidence of fungi on the insects. *New Forests* 3: 1-9.
- Komarov, S. S. 2009. A review of species of the sciarid-fly genus *Lycoriella* Frey (Diptera: Sciaridae) of the Altai fauna. *Entomological Review* 89 (2): 175-180.
- Landis, T. D., R. W. Tinus, S. E. McDonald and J. P. Barnett. 1989. The biological component: nursery pest and mycorrhizae. In: The container tree nursery manual. Vol. 5. USDA: Forest Service. Washington, D C, USA. Agriculture Handbook 674. 171 p.
- Lewandowski, M., A. Sznyky and A. Bedharek. 2004. Biology and morphometry of *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). *Biology Letters* 41(1): 41-50.
- Mansilla, J. P., M. I. Pastoriz y R. Pérez. 2001. Estudio sobre la biología y control de *Bradysia paupera* Tuomikoski (*Bradysia difformis* Frey) (Diptera: Sciaridae). *Boletín de Sanidad Vegetal- Plagas* 27: 411-417.
- Mohrig, W. and F. Menzel 2009. Sciaridae (Black fungus gnats) In: Brown, B. V., A. Borkent, J. M. Cumming, D. M. Wood, N. E. Woodley and M. A. Zumbado. (eds). Manual of Central American Diptera vol 1 Canada: National Research Council of Canada Monograph Publishing Program. pp. 279-292.
- Mohring, W., K. Helelr, H. Hippa, P. Vilkkama and F. Menzel. 2012. Revision of black fungus gnats (Diptera: Sciaridae) of North America. *Studia Dipterologica* 19(1-2): 141-286.
- O'Connor, L. and C. B. Keil. 2005. Mushroom host influence on *Lycoriella mali* (Diptera: Sciaridae) life cycle. *Journal of Economic Entomology* 98(2): 342-349.
- Pundt, L. 1999. Fungus gnats are a serious pest. *Yankee Grower*. De marzo de http://www.ladybug.uconn.edu/factsheets/tp_05_fungusgnats.html (22 de marzo de 2013).
- Shamshad, A., A. D. Cliff and S. Mansfield. 2009. The effect of tibia morphology on vector competency of mushroom sciarid flies. *Journal of Applied Entomology* 133(6): 484-490.

- Shin, S. G., H. S. Lee and S. Lee. 2012. Dark winged fungus gnats (Diptera: Sciaridae) collected from shiitake mushroom in Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 15: 174-181.
- Springer, T. L. 1995a. Vulnerability of pasture and range legumes to fungus gnats. *Crop Science* 35: 534-536.
- Springer, T. L. 1995b. Fungus gnats (Diptera: Sciaridae) feeding damage to legume seedling. *Journal of the Kansas Entomological Society* 68 (2): 240-242.
- Steffan, W. A. 1981. Sciaridae. In: McAlpine, J. F., B. V. Peterson, G. E. Shewell, H. J. Teskey, J. R. Vockeroth and D. M. Wood (eds.), *Manual of Nearctic Diptera*, Vol. 1. Canada. Research Branch Agriculture Canada Monograph 27: 247-255.
- Steffan, W. A. 1974. Laboratory studies and ecological notes on Hawaiian Sciaridae (Diptera). *Pacific Insects* 16(1): 41-50.
- Van Epenhuijsen, C. W., B. B. Page and J. P. Koolard. 2001. Preventative treatments for control of fungus gnats and shore flies. *New Zealand Plant Protection* 54: 42-46.
- Wilkinson, J. D. and D. M. Daugherty. 1970. The biology and immature stages of *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). *Annals of the Entomological Society of America* 63(3): 656-660.
- White, P. F. 1981. Chemical control of the mushroom sciarid, *Lycoriella auripila* (Winn.). *Mushroom Science* 12: 265-273.
- White, P. F. 1999. Comparative effects of three insect growth regulator insecticides and a dipteran-active strain of *Bacillus thuringiensis* on cropping of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Annals of Applied Biology* 134 (1): 35-43.
- White, P. F., J. E. Smith and F. Menzel (2000). Distribution of Sciaridae (Dipt.) species infesting commercial mushroom farms in Britain. *Entomologist's Monthly Magazine* 136: 207-209.
- World Health Organization (WHO). 1981. Informal consultation on bacterial formulations for cost-effective vector control endemic areas. Geneva, Switzerland. 979 p.



