

Selección de aislamientos de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café *Hypothenemus hampei*

.....

Selection criteria of *Beauveria bassiana* isolates for the control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*

.....

Amanda Varela-Ramírez¹

Resumen

Se seleccionaron seis aislamientos de *Beauveria bassiana* del cepario del Laboratorio de Investigaciones sobre la Química del Café y sus productos naturales (LIQC) con el fin de examinar algunas características de morfología macro y microscópica, fisiológicas y bioquímicas, para establecer cuáles de éstas podían ser utilizadas para diferenciar los aislamientos y si tenían alguna relación con la virulencia frente a *Hypothenemus hampei*. Dentro de las características de morfología macroscópica de colonia, como color, tipo, aspecto, producción de sinemas y de oosporeína, no se encontró ninguna que permitiera diferenciar los aislamientos, puesto que son muy variables. Las características microscópicas evaluadas, tamaño y forma de los conidios y de manera semicuantitativa, los blastoconidios, tampoco permiten distinguir entre aislamientos. La resistencia de los conidios a altas temperaturas y a la radiación ultravioleta, y la producción de lipasa, fueron los únicos caracteres que diferenciaron los aislamientos, pero por grupos y no individualmente. Los patrones de bandeo de α - y β -esterasas fueron distintivos de cada aislamiento, ya que presentaron bandas únicas, exceptuando el 8906 (origen Cuba). No se encontró que existiera relación entre las características evaluadas, ni entre ninguna de éstas y su virulencia frente a la broca de café. Sin embargo, con base en este estudio se puede sugerir que los aislamientos 8505 y 8905, incluso en mezcla, pueden ser usados en programas de control biológico, ya que reúnen una serie de características biológicas importantes. Sin embargo, su comportamiento en campo debería ser evaluado previamente.

Palabras claves: *Beauveria bassiana*, *Hypothenemus hampei*, Caracterización, Virulencia, Aislamientos.

Summary

Six isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* were selected from the culture collection of the Laboratorio de Investigaciones sobre la Química del Café y sus productos naturales (LIQC). The purpose of this study was to examine some of the macroscopic, microscopic, physiological and biochemical characteristics of these isolates, in order to establish which ones of these could be used for differentiation of isolates. Moreover, these characters were analyzed for their relation with virulence of isolates against *Hypothenemus hampei*. The macroscopic characteristics of the colonies such a color, type, aspect, sinemata and oosporein production, could not be used for isolates differentiation, because they are so variable. The microscopic characteristics evaluated, neither the size and form of the conidia, nor the relative abundance of blastoconidia, could be utilized for differentiate the isolates. The conidial resistance to high temperatures and conidial resistance to their exposition to ultraviolet light, and the lipase production were the only characters that differentiated isolates. However, these physiological features only classified the isolates in groups and they do not allowed their differentiation individually. The banding patterns of α - y β -esterases were clearly distinctive for each isolate, with unique bands, except the 8906 isolate (origin from Cuba). It was not find the existence of any type of relationship between the characteristics evaluated in this study, nor between these characters and the virulence of isolates against the coffee berry borer. However, based in the results of this study it can be suggested that the isolates 8505 and 8905, may be in a mixture, could be used in biological control programs. The reason for this suggestion is that these isolates have a group of important biological features. Any

case, before to use these isolates, its behaviour under field conditions might be evaluated.

Key words: *Beauveria bassiana*, *Hypothenemus hampei*, Characterization, Virulence, Isolates.

Introducción

El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* Bálamo (Vuillemin) ha sido ampliamente usado para el control de muchas plagas de importancia económica en varios cultivos en todo el mundo y ha sido probado en diferentes insectos plaga (Trefi 1984; Campbell *et al.* 1985; Rombach *et al.* 1986; Aguda *et al.* 1987; Hajek *et al.* 1987; Anderson *et al.* 1988; Ming-Guang y Johnson 1990; Leathers y Gupta 1993).

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), es considerada como una de las plagas más importantes del café (Bustillo *et al.* 1993). Este insecto pasa la mayor parte de su ciclo de vida dentro de la cereza de café, puesto que la copulación y todas las etapas de desarrollo del insecto se presentan allí. Solamente la hembra, que perfora el grano de café puede volar fuera de éste, mientras que el macho, que no posee alas, muere dentro del grano (Cárdenas 1993). Debido a esto es necesario realizar un control de la plaga que involucre un agente de amplia diseminación. Como el ciclo de vida de la broca se desarrolla principalmente dentro del grano, los agentes de control biológico que pueden transmitirse de un individuo a otro, podrían ser, en teoría, más efectivos que el control químico.

Además, la aplicación a gran escala de plaguicidas químicos, para controlar una plaga particular en áreas de cultivo altamente infestadas, favorecen la generación de resistencia por parte de la plaga, la resurgencia de la misma, la aparición de plagas secundarias, reducen las poblaciones de enemigos naturales y causan efectos adversos en los agricultores y el ambiente (Pedigo 1996). Todos estos problemas han renovado el interés por la utilización de métodos alternativos de control, entre los cuales los microorganismos que son capaces de atacar plagas constituyen una promesa alentadora (Charnley 1989).

Debido a que los hongos son los entomopatógenos potencialmente más versátiles, tienen un amplio rango de hospederos, infectan distintas edades y estados de desarrollo de sus hospederos y a menudo causan epizootias naturales (Ferron 1978) se seleccionó el hongo *Beauveria bassiana* para ser usado como agente de control biológico contra la broca del café *H. hampei*, dentro del marco de un programa para el control de esta plaga por parte de la Federación Nacional de Cafeteros de Colom-

¹ Profesora Asistente. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. A.A. 56710, Santafé de Bogotá-Colombia. E-mail: avarela@javercol.javeriana.edu.co

bia. La escogencia de esta especie se debió a que es un patógeno natural de este insecto y a que se ha encontrado como saprófito en zona cafetera.

Se puede lograr un control mejor de esta plaga utilizando los mejores patotipos que posean características adaptativas que favorezcan su supervivencia en campo y su efectividad como micoinsecticida.

Algunos estudios previos han investigado la posible relación existente entre ciertas características particulares de *Beauveria bassiana* y su relación con la virulencia del mismo, como ciertas características fisiológicas (Paris y Ferron 1979; Paris *et al.* 1985; Ming-Guang y Jonsson 1990) y la producción de enzimas (Bidochka y Kachatourians 1990; Sosa-Gómez *et al.* 1994). Sin embargo, es importante identificar un amplio rango de características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas que favorezcan la supervivencia del hongo en campo y su efectividad como micoinsecticida contra *H. hampei*.

En este estudio, llevado a cabo a nivel de laboratorio, se reporta la variabilidad de seis aislamientos de *B. bassiana*, con base en características de morfología microscópica y macroscópica y características fisiológicas, y se prueba el significado de estas variables en relación con la virulencia frente a *H. hampei*.

Materiales y Métodos

Aislamientos. Se seleccionaron seis aislamientos de *Beauveria bassiana* de la colección con que cuenta el Laboratorio de Investigaciones sobre la Química del Café y sus Productos Naturales (LIQC), los cuales diferían en su origen geográfico y de hospedero (Tabla 1). Cultivos de reserva de cada aislamiento fueron conservados mediante liofilización y cada vez que era necesario, el cultivo liofilizado fue reconstituido en Sabouraud líquido y luego, sembrado en Agar Sabouraud Dextrosa con 0,2% de extracto de levadura (ASDY) e incubado durante siete días a 27°C en oscuridad.

Para obtener el inóculo para todos los experimentos, el hongo crecido a partir de los cultivos anteriormente mencionados, fue recogido y suspendido en Tween 20 0,05%. Esta suspensión fue filtrada por un filtro Millipore #4, el cual tiene un tamaño de poro de 5-15 µm. La suspensión conidial obtenida fue ajustada a una concentración de 1×10^6 conidios/ml.

Se realizaron tres repeticiones para todos los experimentos.

Evaluación de la viabilidad de los conidios. Para la determinación de la viabilidad de los conidios en la mayoría de los experimentos, se utilizaron láminas portaobjetos impregnadas con una delgada capa de ASD, el cual es

Tabla 1. Aislamientos de *Beauveria bassiana* utilizados en el presente estudio.

Código de acceso	Hospedero	Localización geográfica
8505 var <i>lurida</i>	<i>Brassolis sophorae</i>	Cumarál (Meta)
8906 descomposición	Hojarasca en	Viotá (C/marca)
8911	<i>Hypothenemus hampei</i>	Chinchiná (Caldas)
8905	Desconocido	Cuba
8904	<i>Hypothenemus hampei</i>	Tailandia
9006	<i>Hypothenemus hampei</i>	La Plata (Huila)

una variación del método utilizado por Samuels *et al.* (1989). La capa de agar fue dividida en tres secciones iguales con ayuda de un bisturí estéril y cada sección fue inoculada con 0,6 ml de una alícuota de la suspensión de conidios preparada. Las láminas fueron incubadas por separado en cámara húmeda, utilizando cajas de Petri (HR>90%), a 27°C, en oscuridad, por 24 horas, y al final de este período de incubación se determinó el porcentaje de germinación.

Morfología macroscópica de colonias. Se inoculó 0,1 ml de una alícuota de la suspensión de conidios preparada a una concentración de 1×10^6 conidios/ml en cada una de tres cajas de Petri que contenían ASD. Las cajas fueron incubadas a 27°C, en la oscuridad. Después de 10 días de incubación, se registró el color, tipo, aspecto, formación de sinemas y de oosporeína. El color se determinó de acuerdo con la tabla de colores de Küppers (1978).

Características de los conidios. 300 conidios provenientes de cultivos de 10 días de edad, crecidos en ASD e incubados a 27°C, en la oscuridad, fueron examinados para determinar su forma y para medir su tamaño, mediante un microscopio al que se le adaptó un micrómetro.

Adicionalmente, la producción de conidios secundarios, con forma que varía de elipsoidal a cilíndrica (MacLeod 1954), llamados por Thomas *et al.* (1987) blastosporas, fueron detectadas 24 horas después de la incubación, de una suspensión conidial de concentración 1×10^6 conidios/ml que había sido inoculada en ASD, a 27°C, en la oscuridad. Como este evento es bastante inusual, se registró su presencia y abundancia relativa de manera semicuantitativa (de + a +++).

Esporulación. Con el fin de cuantificar la esporulación de los diferentes aislamientos, se colocó 0,1 ml de una suspensión de concentración 1×10^6 conidios/ml (concentración final: 1×10^6 conidios/caja), en cajas de Petri que contenían ASD y una película de celo-

fán sobre el medio de cultivo, método usado por Ritz y Crawford (1990), para evitar que las hifas penetraran en el agar. Después de un período de incubación de 10 días a 27°C y en oscuridad, todas los conidios fueron cosechados de la película de celofán y suspendidos en un erlenmeyer que contenía Tween 20 0,05%. Luego, la suspensión de conidios fue homogenizada con un homogenizador de aspas cortantes a 1200 rpm por dos minutos, para liberar todas los conidios en el agua.

A partir de esta suspensión, se realizó una dilución 1/100 y los conidios se contaron directamente en un hemocitómetro. Para determinar la producción de conidios, se realizaron tres conteos para cada erlenmeyer y se calculó la cantidad de conidios obtenido por cm².

Tasa de crecimiento de la colonia. A seis cajas de Petri de 90 mm de diámetro que contenían ASD, se les practicó un orificio de 2 mm de diámetro en el centro del agar. En cada orificio, se inoculó 0,1 ml de una suspensión de conidios de 1×10^6 conidios/ml. Las cajas se incubaron a 27°C en oscuridad. El diámetro de crecimiento de las colonias se midió diariamente durante 10 días, siempre sobre una línea previamente demarcada sobre la colonia, en el fondo de la caja.

Tasa de crecimiento hifal. Se realizaron mediciones del crecimiento de hifas individuales siguiendo el método descrito por Robinson (1978), pero introduciendo la variante de medir a intervalos de 10 minutos cada una, durante un período de una hora. Para la medición, se seleccionaron tres hifas de la periferia del crecimiento del hongo.

Germinación de los conidios. Se impregnaron láminas portaobjetos con una delgada capa de ASD. Cada una de tres láminas fue inoculada con 0,6 ml de una suspensión de conidios de 1×10^6 conidios/ml. Las láminas se incubaron en cámara húmeda (RH 90%) a 27°C, en oscuridad. A partir de las 12 horas de incubación y hasta las 24 horas, cada lámina fue examinada a intervalos de una hora, para

cuantificar el porcentaje de germinación y, luego, determinar el tiempo requerido para la germinación del 50% de las conidias, el cual se calculó mediante un análisis probit.

Sensibilidad de las conidias a la temperatura. Este parámetro fue determinado por la inoculación de 1 μ l de la suspensión de conidias en cada uno de tres tubos que contenían 10 ml de agua estéril (concentración final de 1×10^6 conidias/ml). Cada tubo fue colocado en un baño de agua a una de tres temperaturas: 45°, 50° y 55°C. Después de 10 minutos de exposición a cada temperatura, 0,6 ml de la suspensión de cada tubo fue sembrada en láminas portaobjetos impregnadas con una delgada capa de ASD. Las láminas fueron incubadas en cámara húmeda a 27°C y en oscuridad. El porcentaje de germinación fue registrado a las 24 horas, por el conteo de 600 conidias usando el microscopio. Se realizaron tres conteos de 200 conidias para cada tubo.

Susceptibilidad de las conidias a la radiación ultravioleta. Se tomaron tres alícuotas de 185 μ l cada una, a partir de una suspensión conidial de 1×10^6 conidias/ml y cada una se colocó en un pozo de 1,5 cm de diámetro, de una placa de poliestireno de 24 pozos, de fondo plano. La placa fue ubicada a 25 cm de una lámpara germicida standard de onda corta (GE 30T8, de 15 W, con una emisión de longitud de onda de 240-260 nm). La radiación incidente a esta distancia fue de 2.4×10^6 erg/cm². La exposición de las conidias a la radiación ultravioleta se realizó en la oscuridad, a 25°C durante 30, 60, 90, 120, 150 y 180 segundos. Las conidias utilizadas como control, fueron protegidas de la radiación. 60 μ l de cada alícuota irradiada con cada una de las dosis, fue inoculada en una lámina portaobjetos impregnada con ASD e incubada en cámara húmeda a 27°C y en oscuridad, durante 24 horas. Al final de este tiempo, el porcentaje de germinación fue determinado por el conteo de 600 conidias en el microscopio.

Producción de lipasa. El micelio usado para la extracción de las proteínas fue obtenido del crecimiento del hongo en ASD, usando el método de la película de celofán. El hongo fue incubado a 27°C, en oscuridad, durante diferentes períodos de tiempo (3, 4, 5, 6, y 7 días). Después de cada período de tiempo, el micelio fue recolectado de la película de celofán y se obtuvieron extractos de éste por maceración del micelio a 4°C en buffer Tris-maleato 0.1 M, pH 6.0. La actividad lipasa en los extractos de micelio fue visualizada usando la técnica de agar en placa descrita por Hankin y Anagnostakis (1975). Ensayos semicuantitativos se realizaron después de 24 horas de incubación a 27°C, para determinar el diámetro del halo de precipitación alrededor de orificios prac-

ticados en el agar, que contenían 10 μ l de extracto de micelio. Se realizaron tres réplicas por placa para cada aislamiento.

Electroforesis. Las proteínas del micelio fueron separadas por electroforesis vertical en condiciones no denaturantes, en geles de poliacrilamida, los cuales fueron preparados para obtener un gradiente del 5-25%. Muestras de 40 μ l de extracto de micelio, cada una con un contenido de proteína de 90 μ g, determinada por el método de Bradford (Bradford 1976) fueron colocadas en cada carril. Los geles se corrieron usando buffer Tris-glicina 1,5 M pH 8,8, durante 12 horas a 4°C con un poder constante de 200 volt y una intensidad inicial máxima de 11 mA. Las proteínas totales fueron teñidas con azul de Coomassie (Sigma) y las bandas de α - y β -esterasas con una coloración específica reportada por Shaw y Prasad (1970). Los geles fueron lavados con agua destilada y preservados en glicerol al 5%.

Extractos de los aislamientos de 3, 4, 5, 6 y 7 días de crecimiento fueron corridos en los geles. Las muestras que mostraron un número mayor de bandas fueron seleccionadas para la comparación entre aislamientos.

Pruebas de virulencia. Para probar la virulencia relativa de todos los aislamientos contra *H. hampei*, se inocularon insectos adultos con el hongo, poniéndolos en contacto con una suspensión de conidias de concentración 1×10^6 conidias/ml durante dos minutos. Los insectos inoculados y los controles (no inoculados) se mantuvieron individualmente en frascos estériles de vidrio de 10 ml de capacidad, taponados con algodón. En el fondo de cada frasco, se colocó papel de filtro humedecido con agua estéril, con el fin de mantener la humedad interna. Para simular el microhábitat del insecto, se introdujo un grano de café en cada frasco. Los frascos que contenían los insectos inoculados y los no inoculados se mantuvieron a 25°C, con un fotoperíodo de luz: oscuridad de 10:14 horas, durante 10 días.

Las brocas se observaron diariamente para determinar el tiempo letal medio (LT₅₀). Los insectos muertos se dejaron en cámara húmeda sin esterilización superficial para permitir el desarrollo saprofítico del hongo sobre la superficie del insecto. Para estas pruebas se usaron 10 insectos por réplica y cuatro réplicas para cada aislamiento. El experimento se repitió tres veces.

Análisis Estadísticos. Los análisis estadísticos para los datos de tamaño de conidias se realizaron mediante una prueba de Chi-cuadrado. Los datos de tasa de crecimiento de la colonia e hifal, la germinación de las conidias, la sensibilidad de las conidias a la temperatura, la susceptibilidad de las conidias a la radiación ultravioleta y la producción de lipasa se analizaron usando la

prueba de Kruskal-Wallis y un análisis a posteriori tipo Tukey. Los análisis de regresión probit se realizaron para obtener los valores del tiempo de germinación medio (TG₅₀ y LT₅₀). El test de rangos de Spearman fue usado para establecer la correlación entre todas las variables. El nivel α de confianza utilizado fue del 95%.

Resultados

En la Tabla 2 se presentan los resultados de la morfología macroscópica. El color de la colonia de los diferentes aislamientos presentó una amplia variación entre blanco y amarillo. El tipo y el aspecto de la colonia también fueron características que variaron, aun, para cada aislamiento. El aspecto está determinado por la proporción de micelio con respecto a la de conidios (MacLeod 1954). La producción de oosporina y la formación de sinemas solamente se presentaron en dos aislamientos: 8911 y 9006.

Con respecto a la morfología macroscópica, se encontraron tres rangos de tamaño y dos tipos de forma de las conidias: $\leq 2,5$ μ m (redondos), 2,6-3,5 μ m (redondos) y 4,0-5,0 x 2,5-3,0 μ m (subglobosos). La Tabla 2 muestra que los aislamientos 8505 y 8905 tienen conidias elipsoidales, que difieren de las conidias redondas típicas de esta especie. Estos mismos aislamientos fueron los únicos que tuvieron una cantidad abundante de blastoconidios.

El tamaño de las conidias varió entre 2,5 y 5,0 μ m. Algunos aislamientos tuvieron una alta proporción de conidios de 2,5 μ m y otros de 3,75 μ m de diámetro. Sólo dos aislamientos mostraron una proporción baja de conidios de 5,0 μ m de diámetro (Tabla 3).

Para descartar la posibilidad de contaminación de los aislamientos 8505 y 8905 con *Beauveria brongniartii*, que se caracteriza por presentar este tipo de conidias (Domsch *et al.* 1980), se realizaron cultivos monospóricos de todos los aislamientos y los resultados se muestran en la Tabla 4. La proporción de los diferentes tamaños de conidios encontrados en los cultivos monospóricos fue similar a la de los aislamientos originales.

La mayoría de los aislamientos mostró una producción total de conidios similar, a excepción de los aislamientos 8904 y 8911, los cuales produjeron una mayor cantidad y una menor cantidad (Tabla 4), respectivamente (P=0,040).

Los resultados de los parámetros fisiológicos analizados, se muestran en la Tabla 5. La tasa de crecimiento de la colonia es muy similar entre los aislamientos, pero la tasa de crecimiento hifal mostró que los aislamientos 8505 y 8905 tenían una tasa de crecimiento mayor y que el 9006 tenía la menor (P=0,001).

Tabla 2. Características de la morfología macroscópica de los aislamientos de *Beauveria bassiana*. Condiciones de cultivo: Medio ASD, 27±1°C, 10 días y en oscuridad.

Parámetros	Aislamientos					
	8505	8906	8911	8905	8904	9006
Color anverso:						
Blanco	+	-	-	+	-	+
Crema	+	+	+	+	+	+
Amarillo	-	-	+	-	+	-
Pálido	-	-	+	-	-	-
Amarillo limón	-	+	-	-	-	-
Rosado pálido	-	-	-	-	-	+
Rosado						
Color reverso:						
Crema	+	-	-	-	-	+
Amarillo	-	-	-	+	-	-
Pálido	-	-	+	-	+	-
Amarillo	-	+	-	-	-	-
Amarillo limón	-	+	+	-	-	-
Ambar	-	-	-	-	+	-
Ocre						
Tipo Colonia:						
Plana	-	+	-	-	-	-
Elevada	+	-	-	-	+	-
Convexa	-	-	+	+	-	+
Aspecto						
Colonia:						
Algodonosa	-	+	-	+	-	+
Aterciopelada	-	-	+	-	-	-
Pulverulenta	+	-	-	-	+	-
Sinemas	-	-	+	-	-	+
Oosporeína	-	-	+	-	-	+

Los aislamientos 8505, 8906 y 8905 tuvieron un tiempo de germinación más corto. Los aislamientos que presentaron tiempos de germinación largos poseen tasas de crecimiento bajas, con excepción del 8906.

El tiempo de germinación medio (TG_{50}) en ASD varió entre 14 y 19 horas para todos los aislamientos evaluados.

La viabilidad de los conidios disminuyó entre 45° y 50°C, con una mortalidad total a los 55°C para todos los aislamientos. Se encontró diferencia estadística entre los aislamientos de acuerdo con su respuesta a la temperatura ($P=0.019$). Una temperatura de 45°C no tuvo un efecto pronunciado en la viabilidad de los conidios. Esta sólo redujo en 10% a 20% la viabilidad para todos los aislamientos (datos no mostrados). Sin embargo, hay una alta mortalidad a 50°C, que varió entre el 82 y el 90%.

Los aislamientos 8906 y 8905 fueron los más resistentes a esta temperatura (Tabla 5).

Mayores dosis de radiación ultravioleta provocan una disminución en la sobrevivencia de los conidios. Este efecto se ve representado en las curvas dosis/mortalidad de los conidios de los diferentes aislamientos irradiados con ultravioleta (Fig. 1). A pesar que exhiben diferencias significativas en sensibilidad ($P=0.001$), solamente tres grupos pueden distinguirse basados en el efecto de este tipo de radiación.

El diámetro del halo de producción de lipasa varió entre 5,66 mm (baja producción) a 14,44 mm (alta producción), entre el tercero y séptimo día de crecimiento de los distintos aislamientos ($P=0.001$) (Tabla 6). Una comparación entre los aislamientos para cada uno de los días de producción de lipasa examinados, mostró que se presentan diferencias significativas entre éstos ($P=0.0001$) para todos los aislamientos. La cantidad de enzima producida por los aislamientos 8906, 8905 y 9006 es estadísticamente diferente del día 3° al 7° ($P=0.00021$, $P=0.0009$ y $P=0.0383$, respecti-

vamente). Se presentan dos grupos de aislamientos con una diferencia significativa de acuerdo con la producción de lipasa ($P<0,05$): 1) Tres aislamientos con una alta producción: 8505, 8906 y 8905; 2) Tres aislamientos con una baja producción: 8911, 8904 y 9006. Sólo dos aislamientos, 8906 y 9006 mostraron máxima producción al quinto día de crecimiento, el cual es significativamente diferente de los demás días. Los otros aislamientos no mostraron diferencias para la producción diaria de lipasa.

La comparación de las bandas de esterases de los aislamientos se realizó con base en el día de crecimiento en que se presentó mayor número de bandas. Se encontraron seis patrones electroforéticos, uno para cada aislamiento analizado (Fig. 2). Sin embargo, el 75% de las bandas son compartidas por dos o más aislamientos. Todos los aislamientos mostraron de una a cuatro bandas exclusivas de cada uno (bandas A a K), excepto el aislamiento 8905 que no presentó ninguna. El mayor número de bandas lo presentó el aislamiento 8906. Además, los aislamientos 8505, 8904 y 9006, con origen a partir de insectos, comparten un número apreciable de bandas.

Las pruebas de virulencia frente a *H. hampei* revelaron que todos los aislamientos son patógenos para la broca, pero en distinto grado. La mortalidad en todos los ensayos fue significativamente diferente de la del control ($P=0.0001$), con mortalidades que variaron entre 12,5 y 82,5% (Tabla 7). El aislamiento más virulento fue 8906, el cual difirió significativamente de los otros (Tabla 7). Este aislamiento mató el 75% de los insectos.

Los valores de LT_{50} no pudieron ser calculados para los aislamientos, puesto que menos del 25% de los insectos murieron, excepto para el aislamiento 8906, el cual mostró un LT_{50} de 6.25 días.

Discusión

Las características macroscópicas de colonia de los aislamientos examinados mostraron una amplia variabilidad, de tal manera que no pueden ser consideradas como criterios que ayuden a su caracterización y selección. Los aislamientos que produjeron oosporeína (pigmento rojo en el medio) mostraron una baja virulencia frente a *H. hampei*, lo cual significa que probablemente este pigmento no está directamente relacionado con la virulencia. Sin embargo, sería necesario examinar más aislamientos y cuantificar la producción de oosporeína.

El polimorfismo de los conidios encontrados en algunos aislamientos puede ser debido a la variabilidad genética inherente al aislamiento o a la contaminación con *B. brongniartii*. Los cultivos monospóricos realizados mostraron

Datos Figura 1

Aislamiento	Tiempo exposición	log viabilidad (%)
8505	0	2
	30	1.92
	60	1.6
	90	1.12
	120	0.1
	150	0.62
	180	0.48
8906	0	2
	30	1.88
	60	1.45
	90	0.9
	120	0.7
	150	0.25
	180	0.05
8911	0	2
	30	1.6
	60	1.45
	90	1.05
	120	0.72
	150	0.3
	180	0.45
8905	0	2
	30	1.9
	60	1.5
	90	1.3
	120	1.15
	150	0.7
	180	0.5
8904	0	2
	30	1.47
	60	1.2
	90	0.9
	120	0.5
	150	0.35
	180	-0.2
9006	0	2
	30	1.7
	60	1.12
	90	0.75
	120	0.24
	150	-0.15
	180	-0.1

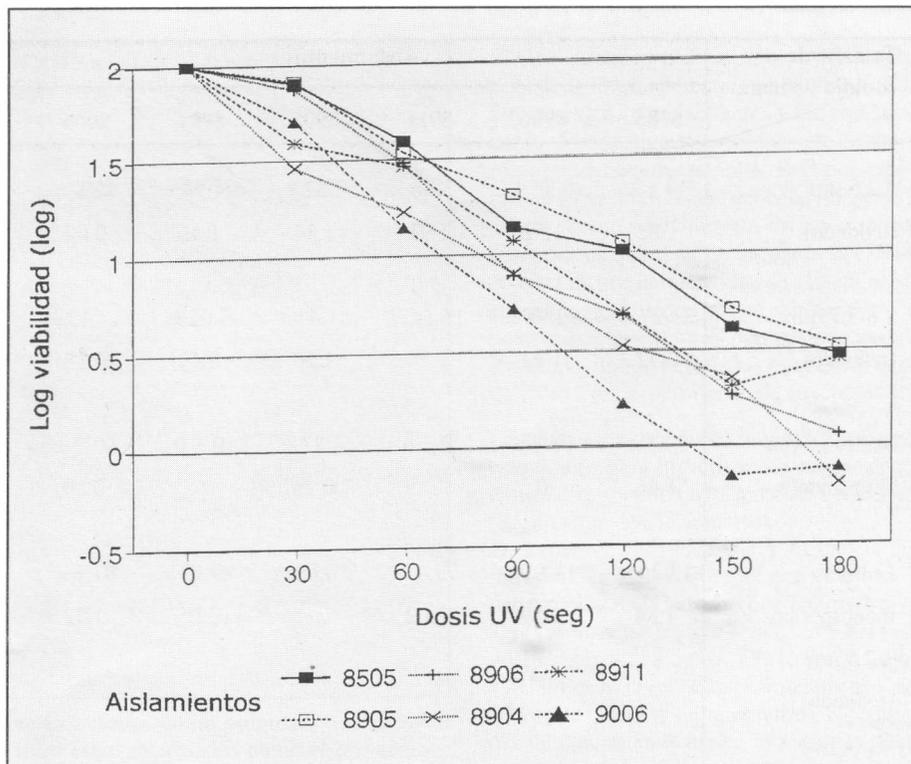


Figura 1. Aislamientos.

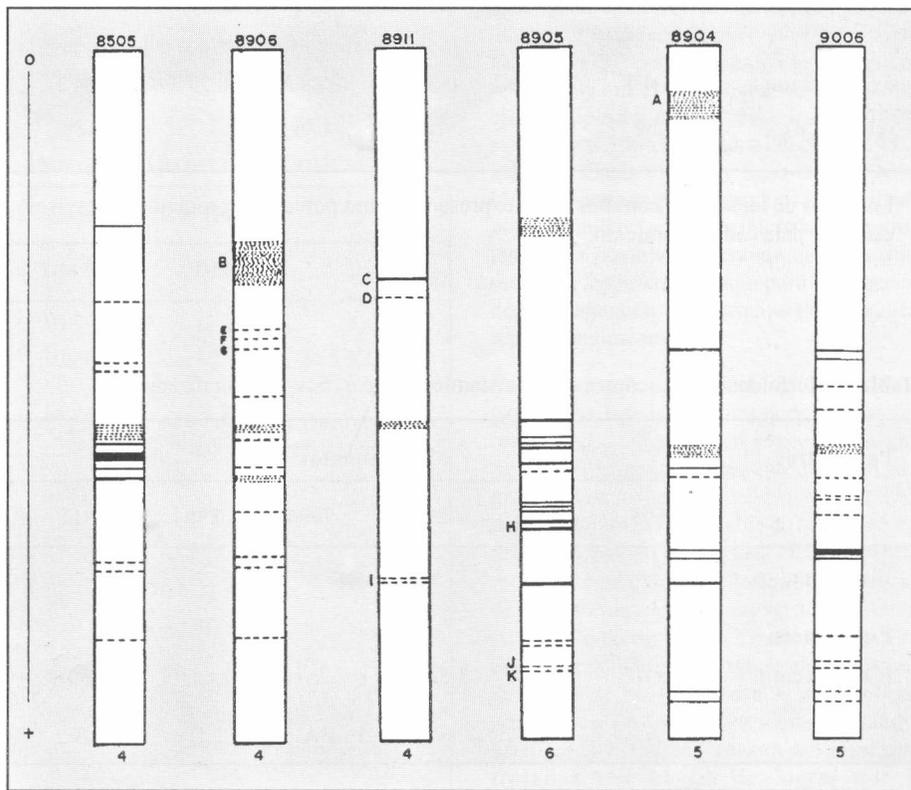


Figura 2. Comparación de los patrones electroforéticos de α - y β -esterasas de cada uno de los aislamientos. El número en la parte inferior de cada patrón corresponde al día de mayor producción de esterases. Las letras indican las bandas exclusivas de cada aislamiento.

Tabla 3. Tamaño y forma de los conidios de los aislamientos originales y de los monospóricos de *B. bassiana*.

Tamaño de conidio y forma	Aislamientos					
	8505	8906	8911	8905	8904	9006
≤ 2.5 μm (redondo)	14.1 ± 1.82	6.96 ± 1.52	83.46 ± 1.91	3.82 ± 1.54	94.98 ± 1.46	82.8 ± 0.09
2.6-3.75 μm (redondo)	83.27 ± 0.72	92.98 ± 1.42	16.54 ± 2.24	91.41 ± 1.54	5.02 ± 2.43	17.13 ± 0.18
5x2.5-3.0 μm (Elipsoidal)	2.63 ± 1.06	0.06 ± 0	0 ± 0	4.77 ± 0.75	0 ± 0	0.07 ± 0.10
Cultivos monospóricos	13.20 ± 1.84	13.83 ± 1.19	79.4 ± 2.02	10.69 ± 1.30	89.13 ± 2.05	91.6 ± 1.72
≤ 2.5 μm (redondo)	86.40 ± 1.76	84.70 ± 1.14	20.30 ± 2.17	86.43 ± 1.47	10.60 - 1.84	4.76 ± 1.16
2.6-3.75 μm (redondo)	0.04 ± 1.89	1.47 ± 2.13	0.30 ± 1.60	2.88 ± 1.11	0.27 ± 1.78	0.94 ± 1.89
5x2.5-3.0 μm (elipsoidal)						

Los datos de tamaño de conidios están expresados como porcentaje promedio ± desviación estándar, para cada aislamiento.

Tabla 4. Morfología microscópica de los aislamientos de *B. bassiana* analizados.

Parámetros	Aislamientos					
	8505	8906	8905	9006	8904	8911
Blastoconidios	+++	+	+++	+	-	-
Esporulación (Conidio/cm ²)	2 x 10 ⁸	1,5x10 ⁹	1,56x10 ⁹	2,2x10 ⁸	1,6x10 ⁹	4,8x10 ⁹
	A	B	B	A	B	B

Abundancia de blastoconidios en cultivo sólido: -=Ninguno, +=Pocos, +++= Abundantes.

Datos de esporulación son los promedios ± desviación estándar de nueve datos para cada aislamiento.

Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes (P>0,05).

que no había aislamientos contaminados con esta especie de *Beauveria*, ya que la proporción de los diferentes tamaños de conidios fueron similares a los del aislamiento original.

La presencia de blastoconidios es una característica importante, ya que son una forma de conidios parasítica dentro del insecto y, por tanto, pueden estar relacionados con la virulencia de un aislamiento particular, aunque los resultados no son concluyentes porque no fueron evaluados cuantitativamente. Además, los estudios realizados al respecto, tampoco son concluyentes (Paris *et al.* 1985; Paris y Ferron 1979).

Los aislamientos con alta producción de conidios, como 8911 y 8904, tienen una clara ventaja sobre los que mostraron bajos niveles de esporulación, porque producirían epizootias en campo en un tiempo más corto lo que reduciría la cantidad de inóculo necesario para cultivar el hongo en su producción comercial.

La tasa de crecimiento hifal es un método mejor para evaluar las diferencias en las tasas de crecimiento entre aislamientos por ser una medida más precisa y que permite obtener datos en menor tiempo (24 h). De acuerdo con esto, los aislamientos que presentaron una tasa de crecimiento mayor, pueden tener una ventaja como agentes de control, porque esto permite una reducción del tiempo necesario para la producción del hongo como bioinsecticida, mejoraría la posibilidad de competir con otros microorganismos durante su vida saprofítica y posiblemente aceleraría el nivel de control de la plaga debido a una infección más rápida del insecto.

Un tiempo corto requerido para la geminación es una característica importante pues los conidios están expuestos en el campo a desecación, antibiosis, inhibición por lípidos epicuticulares o a ser removidos por la muda del insecto antes de su germinación y penetración en la cutícula del mismo y, por tanto, una rápida geminación aumenta la eficacia del hongo como micoinsecticida, reduciendo su dependencia de niveles relativamente altos de humedad relativa (Fuxa 1987).

Domsch *et al.* (1980) registraron el punto térmico de muerte para *B. bassiana* como 50°C. Sin embargo, en este estudio, la total mortalidad de los conidios se registró por encima de esta temperatura (55°C). Esta temperatura mayor encontrada puede deberse al método usado para exponer los conidios (calor húmedo) o a una mayor resistencia de estos conidios a la temperatura. Tal resistencia podría aumentar el tiempo de viabilidad del hongo en condiciones de campo, donde está expuesto al sol.

Para determinar con exactitud el punto de muerte térmica para estos aislamientos sería

Tabla 5. Comparación de los aislamientos de *B. bassiana* con respecto a algunas características fisiológicas evaluadas.

Parámetro	Aislamientos					
	8505	8906	8911	8905	8904	9006
1) Tasa de crecimiento colonia (mm/día)	2.17 ± 0.26	2.59 ± 0.30	2.55 ± 0.23	2.66 ± 0.15	2.72 ^a ± 0.65	2.44 ^a ± 0.61
2) Tasa de crecimiento hifal (mm/min)	0.63a ± 0.08	0.27b ± 0.08	0.28c ± 0.06	0.92b ± 0.18	0.29b ± 0.09	0.17d ± 0.05
3) TG-50 (horas y minutos)	15 h 10 ^{ab}	15 h 50 ^b	16 h 25 ^c	14 h 57 ^a	19 h 5 ^d	17 h 29 ^c
4) Sensibilidad a Temperatura (a 50°C)	9.87 ^{ac}	13.34 ^a	11.- 66 ^{ab}	18.33 ^a 1.34 ^c	18.05 ^{ab}	
5) Susceptibilidad a UV (a 180 segundos)	3.24 ^a	0.98 ^a	7.55 ^b	8.19 ^{ab}	0.57 ^c	0.16 ^{bc}

(¹) Datos de tasa de crecimiento de colonia están expresados como promedio ± desviación standard. (²) Los datos de tasa de crecimiento hifal están expresados como el promedio ± desviación standard. (³) Los datos de tiempo de germinación (TG₅₀) están expresados como promedios. (⁴) Los datos de sensibilidad a la temperatura son porcentajes promedio de viabilidad de los conidios a 50°C. (⁵) Los datos de susceptibilidad de los conidios a radiación ultravioleta son promedios de la viabilidad de las conidios expuestas 180 segundos a 2.4x10⁶ erg/cm² x sec. (n=90 para todas las variables).

Los datos con la misma letra (a,b,c,d) conforman grupos en los cuales los promedios no son significativamente diferentes uno de otro, por un análisis a posteriori tipo Tukey.

Tabla 6. Comparación de los aislamientos con respecto a la detección de la actividad lipasa.

Aislamiento	Actividad Lipasa - Diámetro halo (mm)				
	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
8505	12.05 ±0.58	11.33 ±0.33	10.99 ±0.66	11.50 ±0.76	12.77 ±2.22
8906	9.27 ±1.33	9.72 ±1.75	14.44 ±2.87	8.33 ±0.72	12.61 ±0.78
8911	6.77 ±2.58	7.55 ±1.83	8.44 ±2.79	7.83 ±0.17	6.99 ±0.33
8905	10.16 ±0.73	12.77 ±1.36	13.33 ±2.18	11.55 ±0.48	12.16 ±2.92
8904	5.99 ±2.08	5.66 ±0.33	5.99 ±2.18	6.49 ±0.28	7.55 ±0.69
9006	6.99 ±2.18	7.32 ±0.57	8.88 ±2.83	7.11 ±1.02	8.16 ±1.75

Los datos son los promedios de las mediciones realizadas ± la desviación estándar e incluyen el área del orificio practicado en el agar para adicionar el extracto micelial (n=9/día para cada aislamiento).

necesario evaluar la viabilidad de las conidios entre 50° y 55°C.

El nivel de supervivencia de las conidios, después de la irradiación con ultravioleta, fue diferente entre los aislamientos y fue registrado como el porcentaje de conidios que germinaron después del tratamiento. Este porcentaje refleja tanto la severidad del daño inicial de la célula, como la eficiencia en los sistemas enzimáticos que reparan los daños del DNA. A pesar de que la intensidad de esta radiación es menor en el campo que en el laboratorio, el tiempo de exposición es más prolongado que en campo, donde los efectos pueden ser equivalentes a los experimentados en laboratorio.

La lipasa es una de las enzimas utilizadas por este hongo para hidrolizar los componentes cuticulares y penetrar la cutícula del insecto (Smith *et al.* 1981; Samsinakova *et al.* 1971; St. Leger *et al.* 1987) y hay evidencia que muestra que juega un papel importante en la degradación de la barrera cuticular lipídica de algunos insectos para la penetración del hongo (Samsinakova *et al.* 1971, Smith *et al.* 1981). Por lo tanto, los aislamientos con una mayor producción entre el tercero y séptimo día de crecimiento tienen una ventaja sobre los que producen bajas cantidades. A pesar de que la relación que existe entre la producción de esta enzima y la virulencia no se ha establecido aún, una actividad mayor de lipasa hace que la infección del insecto por parte del hongo sea más fácil (Paris *et al.* 1985; Paris y Ferron 1979). En este estudio, parece que no se presenta una clara relación entre la producción de lipasa y la virulencia. Este resultado está de acuerdo con Champlin *et al.* (1981), Pekrul y Grula (1979) y Sosa-Gomez *et al.* (1994) e indica que la producción de lipasa no es el único factor involucrado en la virulencia. Es posible que usando métodos diferentes de los señalados aquí para la detección de la producción de lipasa, se llegue a diferentes conclusiones.

De acuerdo con la comparación de bandas de isoesterasa, los aislamientos podrían estar más relacionados con el origen de hospedero (particularmente insectos), que con su origen geográfico. Los aislamientos 8505, 8905 y 8904 tienen un número apreciable de bandas en común. Sin embargo, corridas electroforéticas repetidas mostraron que los patrones de bandeado de esterases pueden ser inestables, como también lo ha registrado Tigano (1990). Esto puede ser debido a la variación en ciertas condiciones de cultivo y/o a la variabilidad genotípica de los aislamientos (Zhang y Changie 1991). Estos factores deben ser controlados con el fin de lograr que la electroforesis de esterases sea una herramienta útil para la caracterización de aislamientos.

Los resultados de las pruebas de virulencia con insectos demostraron que todos los aislamientos

Tabla 7. Comparación del porcentaje de mortalidad de *H. hampei* provocada por una suspensión de conidios de *B. bassiana* los aislamientos sobre *H. hampei*¹.

Aislamientos	Porcentaje de mortalidad ¹	Prueba de Tukey* (agrupamiento)
8505	27,5 ± 6,6	A
9006	31,6 ± 11,3	A
8911	30,0 ± 9,2	A
8905	35,0 ± 9,9	A
8904	24,1 ± 10,1	A
8906	75,0 ± 6,6	B
Control no inoculado	0 ± 0	C

¹ Insectos adultos de *H. hampei* inoculados por contacto con una suspensión que contenía 1x10⁷ conidios/ml.

Los datos de porcentaje de mortalidad son promedios después de 10 días ± desviación estándar de 12 datos.

* Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes (P>0,05).

tos pueden atacar el estado adulto de la broca del café, debido a que causaron la muerte de un porcentaje de insectos mayor con respecto al control no inoculado. Sin embargo, el aislamiento 8906 es el único que podría ser considerado para ser usado como micoinsecticida porque tiene la capacidad de matar una proporción relativamente alta de insectos dentro de un período de tiempo no muy largo (seis días).

Es interesante que los aislamientos derivados de *Coleoptera* 8911, 8904 y 9006 mostraron menor virulencia frente a *H. hampei* que el originado de materia orgánica en descomposición, 8906. Esto puede sugerir que el origen de hospedero no necesariamente es un buen indicador de la probable virulencia de un aislamiento específico de *B. bassiana* frente a un hospedero. Como la mayoría de los aislamientos provocaron la muerte a menos del 25% de los insectos después de 10 días, este bajo porcentaje puede indicar una pérdida de virulencia y la necesidad de aumentarla por pases a través de un hospedero susceptible a la misma o de otra especie del mismo género. Este aumento en la virulencia probablemente es un reflejo de respuestas fenotípicas que llevan a una habilidad aumentada de los conidios para germinar rápidamente, y puede aumentar la capacidad invasiva del hongo, implicando mecanismos enzimáticos inducibles (Daoust y Roberts 1982; Fargues y Robert 1983).

Conclusiones

Las características macroscópicas y microscópicas de la colonia de los aislamientos exa-

minados mostraron una amplia variación, que puede ser debida a la variabilidad genética inherente a los aislamientos, de tal manera que no pueden ser consideradas como criterios que ayuden a su caracterización y selección. Este polimorfismo resulta de los procesos que generan variabilidad en los hongos con reproducción asexual, tales como: mutaciones, hibridación y parasexualidad, y de procesos selectivos relacionados con factores bióticos y abióticos, como selección de los insectos hospederos, autólisis y heterólisis (Propawski *et al.* 1988).

En cuanto a las características fisiológicas evaluadas, sólo algunas como la tasa de crecimiento hifal y la viabilidad de los conidios frente a la temperatura permiten diferenciar entre aislamientos; mientras que otras permiten únicamente distinguir entre grupos de aislamientos, que se agrupan de acuerdo a su respuesta a la exposición a la radiación ultravioleta y en cuanto a la producción de lipasa.

De acuerdo con la comparación de bandas de isoesterasa, los aislamientos pueden distinguirse todos entre sí, ya que a pesar de compartir algunas bandas comunes, casi todos poseen bandas características, excepto el aislamiento 8905, originario de Cuba. En este sentido, esta técnica sería una herramienta útil para la diferenciación de aislamientos, si se logra hacer que arroje resultados estables.

A pesar de que los análisis de correlación no mostraron ninguna relación entre las características examinadas, ni entre éstas con la viru-

lencia de los aislamientos, es posible seleccionar el aislamiento 8906 por su mayor virulencia y los aislamientos 8505 y 8905 porque reúnen una serie de características adaptativas (blastoconidios abundantes, alta producción de conidios, tasa de crecimiento alta, corto tiempo de germinación, relativa resistencia a radiación ultravioleta y producción de lipasa alta), que favorecerían su supervivencia en campo y su efectividad como micoinsecticidas.

Estos aislamientos podrían ser usados para posteriores estudios de mejoramiento genético, si fuera posible combinar estas características o para aumentar la virulencia (en el caso de los aislamientos 8505 y 8905, por pases a través del insecto). Sin embargo, es recomendable examinar más aislamientos para éstas y otras características, y con respecto a su virulencia contra la broca del café, con el fin de lograr un mejor control de la plaga.

Finalmente, no se recomienda la utilización de un sólo aislamiento como base de un micoinsecticida comercial, puesto que esto reduce la variabilidad genética del hongo y por tanto sus posibilidades de enfrentarse con éxito a la plaga.

Bibliografía

- AGUDA, R.M.; ROMBACH, M.C.; IM D.J.; B.M. SHEPARD. 1987. Suppression of populations of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal) (Hom.:Delphacidae) in field cages by entomogenous fungi (Deuteromycotina) on rice in Korea. *J. Appl. Entomol.* v. 104, p. 167-172.
- ANDERSON, T.E.A.; ROBERTS D.W.; SOPER R.S. 1988. Use of *Beauveria bassiana* for suppression of Colorado potato beetle populations in New York State (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environ. Entomol.* v. 17, p. 140-145.
- BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOUPIANS, G. 1990. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invertebr. Pathol.* v. 56, p. 362-370.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* v. 72, p. 48-254.
- BUSTILLO, A.E.; VILLALBA, D.; CHAVES, B. 1993. Consideraciones sobre el uso de insecticidas químicos en la zona cafetera en el control de la broca del café, *Hypothenemus hampei*. XX Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología (SOCOLEN). Memorias. p. 152-158.
- CAMPBELL, R.K.; ANDERSON T.E.; SEMEL, M.; ROBERTS D.W. 1985. Management of the Colorado potato beetle using the entomogenous

- fungus *Beauveria bassiana*. Am. Potato. J. v. 61, p. 29-37.
- CARDENAS, R. 1993. Biología, hábitos y control cultural de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). Memorias. XX Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología (SOCOLEN). Cali, Colombia. p. 111-124.
- CHAMPLIN, F.R.; CHEUNG P.Y.K.; PEKRUL S.; SMITH R.J.; BURTON R.L.; GRULA E.A. 1981. Virulence of *Beauveria bassiana* mutants for the pecan weevil. J. Econ. Entomol. v. 74, p. 617-621.
- CHARNLEY, A.K. 1989. Mycoinsecticides: present use and future prospects. BCPC mono. Progress and prospects in insect control. no. 43, p. 165-181.
- DAOUST R.A.; ROBERTS D.W. 1982. Virulence of natural and insect-passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae. J. Inv. Pathol. v. 40, p. 107-117.
- DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON T.L. 1980. Compendium of Soil Fungi. Academic Press. New York. v. I, p. 136-140.
- FARGUES, J.; ROBERT P.H. 1983. Effects of passing through scarabeid hosts on virulence and host specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. Can. J. Microbiol. v. 29 no.5, p. 576-583.
- FERRON, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Ann. Rev. Entomol. v. 23, p. 409-42.
- FUXA, J.R. 1987. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. Ann. Rev. Entomol. v. 32, p. 225-251.
- HAJEK, A.E.; SOPER, R.S.; ROBERTS, D.W.; ANDERSON, T.E.; BIEVER, K.D.; FERRO D.N.; LEBRUN, R.A.; STORCH, R.H. 1987. Foliar applications of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin for control of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae): an overview of pilot test results from the northern United States. Can. Entomol. v. 119, p. 959-974.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. 1975. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. Mycol. v. 67, p. 597-607.
- KÜPPERS, H. 1978. Farben Atlas. Du Mont Buchverlag, Köln. p. 162.
- LEATHERS T.D.; GUPTA S.C. 1993. Suceptibility of the eastern tent caterpillar (*Melacosoma americanum*) to the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. J. Inv. Pathol. v. 61 no. 2, p. 217-219.
- MAC LEOD, D.M. 1954. Investigations on the Genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachum* Limber. Canad. J. Botany, v. 32, p. 818-890.
- MING-GUANG, F.; JOHNSON, J.B. 1990. Relative virulence of six isolates of *Beauveria bassiana* on *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). Environ. Entomol. v. 19 no. 3, p. 785-790.
- MUGNAI, L.; BRIDGE, P.D.; EVANS, H.C. 1989. A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*. Mycol. Res. v. 92 no, 2, p. 199-209.
- PARIS, S.; FERRON P. 1979. Study of the virulence of some mutants of *Beauveria brongniartii* (= *Beauveria tenella*) J. Inv. Pathol. v. 34, p. 71-77.
- _____; FERRON, P.; FARGUES, J.; ROBERT, P. 1985. Physiological characteristics and virulence of auxotrophic and morphological mutants of *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch (= *B. tenella*). Mycopathologia v. 91, p. 109-116.
- PEDIGO, L.P. 1996. Entomology and Pest Management. Second Edition. Prentice hall, Upper Saddle River. 679 p.
- PEKRUL, S.; GRULA E.A. 1979. A mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. J. Inv. Pathol. v. 34, p. 238-247.
- PROPAWSKI, T.J.; RIBA, G.; JONES, W.A.; AIOUN, A. 1988. Variation in isoesterase profiles of geographical populations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from *Sitona* weevils (Coleoptera: Curculionidae). Environm. Entomol. v. 17 no. 2, p. 275-279.
- RITZ, K.; CRAWFORD, J. 1990. Quantification of the fractal nature of *Trichoderma viridae*. Mycol. Research. v. 94 no. 8, p. 1138-1141.
- ROBINSON, P.M. 1978. Practical Fungal Physiology. John Wiley & Sons Ltd. Great Britain, p. 122.
- ROMBACH, M.C.; AGUDA, R.M.; SHEPARD, B.M.; ROBERTS, D.W. 1986. Infection of rice brown plant-hopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) by field application of entomopathogenic Hyphomycetes (Deuteromycotina). Environm. Entomol. v. 15, p. 1070-1073.
- SAMSINÁKOVÁ, A.; MISIKOVÁ, S.; LEOPOLD, J. 1971. Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). J. Inv. Pathol. v. 18, p. 322-330.
- SAMUELS, K.D.Z.; HEALE, J.B.; LLEWELLYN, M. 1989. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. J. Inv. Pathol. v. 53, p. 25-31.
- SHAW, C.R.; PRASAD, R. 1970. Starch Gel Electrophoresis of Enzymes-A compilation of Recipes. Biochemical Genetics. v. 4, p. 297-320.
- SMITH, R.J.; S. PEKRUL; GRULA E.A. 1981. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*). J. Inv. Pathol. v. 38, p. 335-344.
- SOSA-GÓMEZ, D.R.; BATISTA, S.; TIGANO, M. 1994. Characterization and phenetic analysis of geographical isolates of *Beauveria* spp. Pesq. Agropec. Bras. v. 29 no.3, p. 401-409.
- ST. LEGER, R.J.; COOPER R.M.; CHARNLEY, A.K. 1987b. Distribution of chymoelastases and trypsin-like enzymes in five species of entomopathogenic deuteromycetes. Arch. Biochem. Biophys. v. 258, p. 123-131.
- TIGANO, M.S. 1990. Study of polimorphic isoenzymatic systems for *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. An. Soc. Entomol. Bras. v. 19 no. 2, p. 485-491.
- THOMAS, K.C.; KHACHATOURIANS, G.G.; INGLEDEN, W. M. 1987. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. Can. J. Microbiol. v. 33, p. 12-20.
- TREFI, A.H. 1984. Use of *Beauveria bassiana* (Bals) to control the immature stages of the whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westw.). (Homoptera: Aleyrodidae) in the greenhouse. Arab. J. Plant Prot. v. 2, p. 83-86.
- ZHANG, Y.; CHANGIE, C. 1991. Influence of testing conditions on the appearance of the phyphostoma-isoesterase electrophoretogram of *Beauveria bassiana*. For Res v. 4 no. 4, p. 414-417.