

Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*

Optimum temperature and humidity determination in germination and sporulation of five *Beauveria bassiana* isolates

J.C. Godoy¹, R.E. Valera¹, C. Guédez¹, L.M. Cañizalez¹ y C. Castillo¹

¹Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico "Dr Carlos Diaz Polanco", Núcleo Universitario "Rafael Rangel" Universidad de los Andes.

Resumen

Beauveria bassiana es un hongo entomopatógeno caracterizado por controlar plagas a nivel mundial por sus excelentes características patogénicas. La eficacia de este hongo en el control depende de variables como aislamientos específicos, humedad y temperaturas adecuadas necesarias para la germinación y esporulación en el insecto. La finalidad de este trabajo fue determinar la esporulación de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana* en dos sustratos, tres temperaturas y tres humedades relativas diferentes y su capacidad germinativa a 25°C y 30°C. La esporulación se determinó a los trece días de crecimiento contando las esporas en la cámara de Neubauer, según el método de French. El porcentaje de germinación de esporas, se realizó en una cámara de crecimiento, realizando conteo entre 6 horas y 12 horas. El análisis de varianza factorial determinó que existen diferencias significativas ($P>0,05$) en la producción de esporas en los aislamientos en los dos medios de cultivo y tres temperaturas. El aislamiento Bb-05 el que presentó mayor cantidad de esporas a 100% de humedad relativa no existiendo diferencias significativas entre 80% y 90%. La mayor esporulación fue en el aislamiento Bb-05 en los medios de cultivos utilizados a 25°C y 30°C y a humedad relativa de 100%. La germinación de esporas presentó diferencias significativas ($P<0,05$) entre las temperaturas, con el mayor porcentaje de germinación a 25°C y con diferencias significativas entre aislamientos, presentándose la mayor germinación en el Bb-05. Los cinco aislamientos de *B. bassiana* presentaron una esporulación superior a 10^7 esporas/ml. *Beauveria bassiana* es un hongo entomopatógeno que tolera un rango

amplio de temperatura y humedad relativa, es así como se explica la capacidad de esta especie para adaptarse a diferentes áreas edafoclimáticas.

Palabras clave: Condiciones ambientales, Control biológico, *Beauveria bassiana*, entomopatógeno.

Abstract

The effectiveness of *Beauveria bassiana* to control insect plagues around the world, is by its excellent pathogenic characteristic. Biological control depends on variables as specific isolations, humidity and obligatory appropriate temperatures for germination and sporulation in insects. The objective of this research was to determine sporulation of five *Beauveria bassiana* isolations in two different substrates, three different temperatures and three different relative moistures and its germinating capacity at 25°C and 30°C. Sporulation was determined to thirteen days of fungal growth by counting the spores in Neubauer's camera, according to the French's method. Spores germination percentage was carried out in a growth camera, carrying out the counting between 6 and 12 hours. The factorial analysis variance determined that significant differences exist ($P>0,05$) in the production of spores in the isolations in the two culture medium and three temperatures, but there is no significant differences among the interaction between the variable culture medium and temperature ($P>0,05$). Significant differences were noted in the production of spores in the relative moistures. When carrying out the analysis mean comparisons of the spores' production differences were not noted between the temperatures 25°C and 30°C. The highest sporulation was in the isolation Bb-05 in the culture medium used at 25°C and 30°C and relative humidity of 100%. The spores germination showed significant differences ($P<0,05$) among the temperatures, with the highest germination percentage at 25°C and with significant differences among isolations. All *B. bassiana* isolations had a superior sporulation to 10^7 spores/ml. *Beauveria bassiana* is an entomopathogen fungi that tolerates a wide range of temperature and relative moisture, and as well as the capacity of this species is explained to adapt to different environmental conditions.

Key words: Environmental conditions, Biological control, *Beauveria bassiana*, entomopathogen.

Introducción

El hongo *Beauveria bassiana* ha sido utilizado exitosamente para controlar plagas de muchas regiones del mundo como parte de las estrategias de manejo integrado de plagas. Por

Introduction

Fungal *Beauveria bassiana* have been successfully used for controlling pests of many regions in world as a part of strategies of the integrated management of pests. For

sus características patogénicas para controlar insecto, su factibilidad de reproducción en forma artificial y la rentabilidad de su uso, este hongo representa una alternativa viable al ser utilizado sin perjuicios al medio ambiente y sin efectos tóxicos (2). Sin embargo, este hongo es afectado por una compleja interacción entre factores ambientales bióticos y abióticos entre los que se puede mencionar temperatura, humedad, pH, luz, hospedantes y sustratos (3, 13); por lo que es importante considerar que las limitaciones impuestas a la infección por un factor ambiental puede restringir la efectividad del hongo entomopatógeno sobre el control de insectos (6).

Los factores ambientales tienen gran importancia en la formación, germinación, sobrevivencia y penetración de las esporas en la cutícula del insecto (4, 14) y tanto las esporas como las hifas del hongo sobreviven asociados al hospedante o al sustrato influenciado por diferentes factores bióticos y abióticos (9).

Los hongos requieren de cierta temperatura mínima y alta humedad relativa para poder desarrollarse y efectuar sus actividades. *Beauveria bassiana* puede encontrarse en un amplio rango de temperatura que va desde los 15°C a los 30°C y una humedad relativa de 90% (1,2). Sin embargo, hay ciertas preferencias de estas condiciones ambientales dependiendo del aislamiento o cepa del hongo.

Las características principales para que un hongo entomopatógeno sea eficaz en el control de insectos plaga, son su formulación y aplicación

its pathogen characteristics for controlling insects, its reproduction feasibility in artificial way and its use rentability, this fungal represents a viable alternative of being used without damages to environment and without toxic effects (2). However, this fungal is affected by a complex interaction between biotic and abiotic environmental factors like temperature, moisture, pH, light, hosts and substrates (3, 13); so it is important to consider limitations imposed by infection by an environment factor can restrict the fungal entomopathogen effectiveness on the insect control (6).

The environmental factors have high importance in the formation, germination, survival and penetrating of spores in the insect cuticle (4, 14) and as well spores as fungal hyphen survives associated to host or to the substrate influenced by different biotic and abiotic factors (9).

Fungi requires of a minimum temperature and high relative temperature for developing and affecting its activities. *Beauveria bassiana* can be find in a wide rank of temperature from 15°C to 30°C and a relative moisture of 90% (1,2). However, there are preferences of these environmental conditions depending of isolations or fungal strain.

An entomopathogen is efficient for controlling pest according its formulation and the appropriate applying as well the high virulence of isolation (2).

The environmental factors act direct and indirectly by affecting fungi

apropiada, así como la elevada virulencia del aislamiento (2).

Los factores ambientales actúan directa e indirectamente afectando la persistencia y sobrevivencia de los hongos en la naturaleza (12, 15, 16). La temperatura y la humedad tienen influencia en todos los hábitats, los terrestres tienen mayor influencia la luz en la forma de radiación solar (16).

Estudios sobre el comportamiento de aislamientos de hongos entomopatógenos son indispensables para emplear estrategias de control de insectos de importancia económica, pertenecientes a diferentes órdenes y cuyo comportamiento varía en la naturaleza dependiendo de los factores ambientales imperantes. Es por ello que, se evaluó la esporulación y la capacidad de germinación de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*, provenientes de diferentes localidades y que son utilizados para el control biológico de insectos plaga en el estado Trujillo, Venezuela.

Materiales y métodos

Se utilizaron cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*, provenientes de 3 localidades del estado Trujillo, codificados de la siguiente manera: los aislamientos Bb-01 y Bb-02 fueron aislados de *Rodnius prolixus* y *Heliotaurus* sp, respectivamente, en la localidad de Monay; los aislamientos Bb-03 y Bb-04 de *Hypothenemus hampei*, encontrados en Cuicas, y el aislamiento Bb-05 fue aislado de *Premnotrypes vorax* en la localidad de Cabimbú. Todos los aislamientos son reproducidos y mantenidos en el La-

persistence and survival in nature (12, 15, 16). Temperature and moisture influences in all the habitats, at terrestrial one, light have a higher influence in the solar radiation way. (16).

Studies about entomopathogens fungi isolations behavior are essential for employing strategies for controlling insects of economical importance, belonging to different orders and with a behavior vary in nature depending on environmental factors. Therefore, sporulation and germination capacity of five *Beauveria bassiana* isolations coming from different localities that are used for biological control on pest insects at Trujillo state.

Materials and methods

Five isolations of *Beauveria bassiana*, coming from 3 places of Trujillo state were codified as follows: isolations Bb-01 and Bb-02 were selected of *Rodnius prolixus* and *Heliotaurus* sp, respectively, at Monay locality; isolations Bb-03 and Bb-04 of *Hypothenemus hampei*, found in Cuicas, and isolation Bb-05 was selected of *Premnotrypes vorax* in Cabimbu locality. All isolations are reproduced and maintained in the Phytopathology and Biological Control Laboratory "Dr. Carlos Diaz Polanco" of the Nucleo Universitario "Rafael Rangel" de la Universidad de los Andes in Trujillo.

All isolations were sowed in the Petri dishes containing culture medium potato-dextrose-agar (PDA) and a special medium (ME). Isolations

boratorio de Fitopatología y Control Biológico "Dr. Carlos Díaz Polanco" del Núcleo Universitario "Rafael Rangel" de la Universidad de los Andes en Trujillo.

Todos los aislamientos fueron sembrados en el centro de cajas de Petri que contenían medio de cultivo agar-papa-dextrosa (PDA) y Medio Especial (ME). Los aislamientos ya en las cajas de Petri, se incubaron en las diferentes temperaturas (10°C, 25°C y 30°C), colocando 5 cajas de Petri por medio de cultivo y temperatura.

Los niveles de humedad relativa (80%, 90% y 100%) fueron controlados utilizando el método de soluciones saturadas con Cloruro de Sodio (NaCl) en cámaras con PDA; descrito por Creahan (7).

Después de 13 días de crecimiento de los aislamientos de *Beauveria bassiana* en los dos medios de cultivos y en las 3 temperaturas se determinó la concentración de esporas, en todas las cajas de Petri y se calculó el promedio. Para determinar la esporulación (concentración de esporas) se tomó 1 cm² del medio conteniendo el hongo y se colocó en 9 ml de agua destilada estéril, se mezcló en el agitador magnético y de esta suspensión se realizó el conteo en la cámara de Neubauer, según el método de French y Hebert (8).

El porcentaje de germinación de esporas, se realizó en una cámara de crecimiento, que consiste en una caja de Petri que contiene papel absorbente, un triángulo de vidrio, un porta objeto y cubre objeto; se colocó un cuadrado de medio de cultivo PDA (2 cm x 2 cm) en el porta objeto, y sobre él,

in Petri dishes were incubated at different temperatures (10°C, 25°C and 30°C), by placing 5 Petri dishes by culture medium, by temperature.

Relative moisture levels (80%, 90% and 100%) were controlled by using the saturated solutions method with sodium chloride (NaCl) in chambers with PDA; described by Creahan (7).

After 13 days of Treatment in isolations of *Beauveria bassiana* in the two culture mediums and in the three temperatures, the spores' concentration was determined in every Petri dishes and mean was estimated. For determining sporulation (spores concentration) 1 cm² was taken from medium by containing fungal and it was placed in 9 ml of sterile distilled water; it was mixed with magnetic agitator and from this suspension the count was accomplished in the Neubauer chamber, according to French method (8).

The spores germination percentage was accomplished in a growing chamber that consist of a Petri dish with absorbent paper, a glass triangle, a slide and a cover slips; a square of PDA culture medium (2 cm x 2 cm) in the slide and above it a spores suspension of little concentration was applied, with the platinum handle of diameter of 4 mm. Observations to microscope were accomplished each 6 hours for determining number of germinated spores until 12 hours.

Data were processed through a factorial analysis of variance and means comparisons "Post Hoc" was accomplished by Tukey test, in the

se aplicó una suspensión de esporas de baja concentración, con el asa de platino de diámetro de 4 mm. Cada 6 horas se realizaban observaciones al microscopio para determinar el número de esporas germinadas hasta las 12 horas.

Los datos fueron procesados mediante un análisis de varianza factorial y las comparaciones de medias "Post Hoc" se realizaron a través de la prueba de Tukey, en el programa estadístico SPSS.11.0 para Windows.

Resultados y discusión

Esporulación de cinco aislamientos de *B. bassiana* en medio de cultivo PDA y ME a temperaturas de 10°C, 25°C y 30°C: Los cinco aislamientos presentaron una alta producción de esporas en PDA y ME, a 25°C y 30°C, a los 13 días de sembrados con valores mayores de 10^7 esporas/ml. El análisis de varianza determinó que existen diferencias significativas ($P > 0,05$) en la producción de esporas de los aislamientos en los dos medios de cultivo y las tres temperaturas (cuadro 1). Al realizar el análisis de comparaciones de medias "Post Hoc" (Tukey) de la producción de esporas no existen diferencias entre las temperaturas 25°C y 30°C y si existen diferencias significativas entre 10°C y 25°C y entre 10°C y 30°C.

Al analizar los aislamientos se determinó que existen diferencias significativas entre ellos ($P < 0,05$), y en la prueba de comparación de medias "Post Hoc", se comprobó que los aislamientos Bb-02 y Bb-05 produjeron

statistical program SPSS.11.0 for Windows.

Results and discusión

Sporulation of 5 isolations of *B. bassiana* in culture medium of PDA and ME to temperatures of 10°C, 25°C and 30°C.

Five (5) isolations showed a high spores production high in PDA and ME, to 25°C and 30°C, at 13 days after sowing with values higher of 10^7 spores/ml.

The analysis of variance determined that there is significant differences ($P > 0,05$) in the spores production in isolations of the two culture mediums and the three temperatures (table 1). When analyzing means comparisons «Post Hoc» (Tukey) of the spores production there is no differences between the spores production there is no differences between temperatures 25°C and 30°C and there are significant differences between 10°C y 25°C and between 10°C and 30°C.

When analyzing isolations it was determined that there are significant differences among them ($P < 0.05$) and in the mean comparison test "Post Hoc", isolations Bb-02 and Bb-05 produced a high spores quantity than the other isolations in the two culture medium to 25°C and 30°C.

Beauveria bassiana, is affected by a complex interaction of environmental factors biotic and abiotic likewise temperature, moisture, air, pH, exposition to ultra violet light, hosts and substrates (9,

Cuadro 1. Esporulación (esporas/ml) de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana* en medios de cultivo de PDA y ME a 10, 25 y 30°C a los 13 días.

Table 1. Sporulation (spores/ml) of five *Beauveria bassiana* isolates in PDA and ME culture means to 10, 25 and 30°C at 13 days.

Medios y Temp.	Esporulación					
	PDA10°C	ME10°C	PDA25°C	ME25°C	PDA30°C	ME30°C
Bb-01	5,6x10 ⁵ Bbc	7,0x10 ⁵ Bbc	1,6x10 ⁷ Abc	1,9x10 ⁷ Abc	1,0x10 ⁷ Abc	2,0x10 ⁷ Abc
Bb-02	5,2x10 ⁵ Bab	6,5x10 ⁵ Bab	2,7x10 ⁷ Aab	2,9x10 ⁷ Aab	1,5x10 ⁷ Aab	2,0x10 ⁷ Aab
Bb-03	1,1x10 ⁵ Babc	2,0x10 ⁵ Babc	2,1x10 ⁷ Aabc	3,0x10 ⁷ Aabc	1,6x10 ⁷ Aabc	2,1x10 ⁷ Aabc
Bb-04	3,8x10 ⁵ Bbc	4,0x10 ⁵ Bbc	1,6x10 ⁷ Abc	2,0x10 ⁷ Abc	1,0x10 ⁷ Abc	1,5x10 ⁷ Abc
Bb-05	1,3x10 ⁵ Ba	1,8x10 ⁵ Ba	5,5x10 ⁷ Aa	5,0x10 ⁷ Aa	3,1x10 ⁷ Aa	3,5x10 ⁷ Aa

Medias con letras mayúsculas iguales en las filas no difieren entre si, con la prueba de medias de Tukey al 5% de probabilidad y medias con letras minúsculas iguales en la columna no difieren entre si.

mayor cantidad de esporas que los demás aislamientos en los dos medios de cultivos a 25°C y 30°C.

Beauveria bassiana, es afectada por una compleja interacción de factores ambientales bióticos y abióticos, como la temperatura, la humedad, la aireación, el pH, la exposición a la luz ultravioleta, hospederos y sustratos (9, 10, 11). Mediante estos resultados determinamos que la producción de esporas de *Beauveria bassiana* depende del aislamiento, del sustrato y de condiciones ambientales como temperatura y humedad relativa. Sin embargo, estos aislamientos pueden adoptar un comportamiento diferente en condiciones de campo.

Esporulación de cinco aislamientos de *B. bassiana* a 80%, 90% y 100% de humedad relativa: El análisis de varianza determinó que existen diferencias significativas ($P>0,05$) en la esporulación de los aislamientos a diferentes humedades relativas, siendo el aislamiento Bb-05 el que presentó mayor cantidad de esporas a 100% de humedad relativa no existiendo diferencias significativas entre 80% y 90% (cuadro 2).

Germinación de esporas de cinco aislamientos de *B. bassiana* en PDA a 25° y 30°C. El porcentaje de germinación en los cinco aislamientos fue superior al 60% a 25°C, mientras que, a 30°C el porcentaje de germinación osciló entre el 28% y el 37% (cuadro 3). El análisis de varianza indicó que existen diferencias significativas ($P<0,05$) en la germinación y depende de la temperatura, presentando el mayor porcentaje de germinación el aislamiento Bb-05 de 100% a 25°C.

10, 11). Through these results it can be determined that spores production of *Beauveria bassiana* depends on isolation, substrate and environmental conditions like temperature and relative moisture. However, these isolations could adopt a different behavior in filed conditions.

Sporulation of five isolations of *B. bassiana* to 80%, 90% and 100% of relative moisture: The analysis of variance determined that there are significative differences ($P>0.05$) in the isolations sporulation to different relative moistures, being the isolation Bb-05 which showed the higher spores quantity to 100% of relative moisture; there was not significative differences between 80% and 90% (table 2).

Spores germination of five isolations of *B. bassiana* in PDA to 25° and 30°C:

Germination percentage of five isolations was superior at 60% to 25°C, whereas at 30°C. The germination percentage oscillates between 28% and the 37% (table 3). The analysis of variance showed that there are significative differences ($P<0.05$) in germination and depends on temperature, by showing the higher percentage of germination the isolation Bb-05 of 100% at 25°C.

These results agree with those found by Roberts and Humber (18) and Beyer *et al.* (4) who says that a high moisture ($>90%$) is required for many fungi for conidia germinating and also for sporulation. The optimum germination for conidia of *B. bassiana* occurs between 15°C and 25°C and 100% of relative moisture.

Cuadro 2. Esporulaci3n (esporas/ml) de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana* a 80%, 90% y 100% de humedad relativa a los 13 d1as.

Table 2. Sporulation (spores/ml) of five *Beauveria bassiana* isolates to 80, 90 and 100% of relative moisture at 13 days.

Humedad relativa	Aislamientos				
	Bb-01	Bb-02	Bb-03	Bb-04	Bb-05
80%	1,1x10 ⁷ b	1,0x10 ⁷ b	5,0x10 ⁷ b	4,5x10 ⁷ b	2,5x10 ⁷ b
90%	2,2x10 ⁷ a	6,5x10 ⁷ a	2,5x10 ⁷ a	1,3x10 ⁷ a	7,0x10 ⁷ a
100%	5,0x10 ⁷ a	7,0x10 ⁷ a	4,5x10 ⁷ a	3,0x10 ⁷ a	7,5x10 ⁷ a

Letras iguales no existe diferencias significativas en la esporulaci3n.

1stos resultados coinciden con los encontrados por Roberts y Humber (18) y Beyer *et al.* (4) quienes se1alan que una alta humedad (>90%) es requerida por muchos hongos para la germinaci3n de las conidias y tambi3n para la esporulaci3n. La germinaci3n 3ptima para las conidias de *B. bassiana* ocurre entre 15°C y 25°C y 100% humedad relativa.

Carre1o (5) and Tanada and Kaya (19) affirm that spores germination depends on a great extent on environmental moisture and temperature and in a lesser extent to light and nutritional conditions, and according to Gillespie (11) the water level is determinant in fungi growing and little differences at relative moisture levels alter conidia application could

Cuadro 3. Porcentaje de germinaci3n de cinco aislamientos de *B. bassiana* en PDA a 25°C.

Table 3. Germination percentage of five *B. bassiana* isolations in PDA to 25°C.

Aislamientos	Porcentaje de germinaci3n (%)	
	25°C	30°C
Bb-01	60	31
Bb-02	60	29
Bb-03	62	32
Bb-04	59	28
Bb-05	100	37

Carreño (5) y Tanada y Kaya (19) señalan que la germinación de las esporas depende en gran parte de la humedad ambiental y temperatura y en menor grado a las condiciones de luz y nutricionales, y según Guillespie (11) el nivel de agua es determinante en el crecimiento de los hongos, y pequeñas diferencias en los niveles de humedad relativa después de la aplicación de conidias, pueden determinar de un modo u otro el éxito del hongo en el control de insectos plaga.

Conclusiones

El aislamiento Bb-02 y Bb-05 tuvieron la mayor esporulación en los medios PDA y ME, a 25°C y 30°C y Bb-05 el mayor porcentaje de germinación de los cinco aislamientos evaluados.

El porcentaje de germinación de esporas fue mayor a 25°C, entre el 60% para Bb-01 y Bb-02 y 100% para Bb-05.

Beauveria bassiana es un hongo entomopatógeno que tolera un rango amplio de temperatura y humedad relativa, es así como se explica la capacidad de esta especie para adaptarse a diferentes áreas edafoclimáticas.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad de Los Andes por el financiamiento de este trabajo a través del proyecto Código: NURR-C-305-01-01-B.

Literatura citada

1. Agrios, G. N. 1999. Fitopatología. Editorial Limusa. México.

determine the fungi successful on pest insects control.

Conclusions

Isolation Bb-02 and Bb-05 had the higher sporulation in PDA and ME medium, at 25°C and 30°C and Bb-05 the higher germination percentage of the five isolation evaluated.

The spores' germination percentage was superior to 25°C between the 60% for Bb-01 and Bb-02 and 100% for Bb-05.

Beauveria bassiana is an entomopathogen fungal that put up with a wide rank of temperature and relative moisture, so the capacity of this specie for adapting to different edapho climatic areas.

Acknowledgements

Authors want to thanks to the Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico and Tecnológico (CDCHT) of the Universidad de Los Andes by the financing of this research, Code: NURR-C-305-01-01-B.

End of english version

2. Baeteman, R. 1997. The development of a mycoinsecticide for the control of locust and grasshoppers. Outlook on Agriculture. 26:13-18.
3. Berlanga-Padilla, A. y V. Hernández-Velázquez. 2003. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la virulencia de *Metarhizium anisopliae*, M. a. var. *acridum* y *Beauveria bassiana* en *Shistocerca piceifrons*. Centro Nacional de Control Biológico. SAGARPA-SENACICA- DGSV. Tecomán-México.

4. Beyer, M., J.A. Verreet y W. Ragab. 2005. Effect of relative humidity on germination of ascospores and macroconidia of *Gibberella zeae* and deoxynivalenol production. *Int. J. Food Microbiol.* 15; 98(3):233-40.
5. Carreño, I. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca bajo condiciones de invernadero. Bogotá, Colombia. p. 37.
6. Carruthers, R.I. y K. Hural, 1990. Fungi as naturally occurring entomopathogens. p. 115-138. In: R. Baker and P. Duna (eds). *New Directions in Biological Control*. Alan R. Liss. New York.
7. Creahan, J. 1991. Controlling relative humidity with saturated sodium chloride solutions. 13:17-18. *Waac Newsletter*.
8. French, E. y T. Hebert. 1988. Métodos de Investigación fitopatología. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Costa Rica. p. 289.
9. Glare R., T. 1992. Fungal pathogens of scarabs. p. 63-79. En: Jackson, T.A... and GLARE, R.T. *Use of pathogens in scarabs pest management*. London: Athanaeum Press.
10. Gottwald, T. R. y W. L. Tedders. 1984. Colonization, Transmission and longevity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on Pecan weevil larvae (Coleoptera: Curculionidae) in the soil. *Environ. Entomol.* 13:557-560.
11. Gillespie, A. 1988. Use of fungi to control pest of agricultural importance. p. 269 In: Burge, M. (Ed) *Fungi in biological control systems*. Manchester University Press, Manchester, England.
12. Hagstrum, P. 1987. Seasonal variation of stored wheat environment and insect populations. *Environ. Entomol.* 16:77-81.
13. Hastuti, B., T. Glare y R. Chapman. 1999. Effects of temperature and humidity on the susceptibility of *Paropsis charybdis* to *Beauveria bassiana*. *Proc. 52nd N.Z. Plant Protection Conf.* 1999: 103-107.
14. James, R., J. Buckner y T. Freeman. 2004. Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *J. Invertebr. Pathol.* 84:67-74.
15. Lord, J.C y D.W. Roberts 1985. Effects of salinity, pH, organic solutes, anaerobic conditions and the presence of other microbes on production and survival of *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) Zoospores. *J. Invertebr. Pathol.* 45:331-338.
16. McCoy, C., E. Quintela y M. De Faria. 1988. *Environmental Persistence of Entomopathogenic fungi*. University of Florida. U.S.A. p. 1-11.
17. Roberts, D. y A.S. Campbell. 1977. Stability of entomopathogenic fungi. *Miscell. Pub. Of the Entomol. Soc. Am.* 10:19-76.
18. Roberts y D. W. and R.A. Humber. 1981. Entomogenous fungi. p. 201-216. In: *Biology of conidial fungi*. Cole G. y B. Kendrick. Academic Press. New York.
19. Tanada, Y. y H. Kaya. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press. Inc., San Diego.