

## Capacidad insecticida de *Beauveria bassiana* cultivada en hidrocarburos para control de coleópteros en granos almacenados

Pedrini Nicolás<sup>1</sup>, Dal Bello Gustavo M.<sup>2</sup>, Padín Susana B.<sup>3</sup>, Juárez M. Patricia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (CCT La Plata CONICET-UNLP), calle 60 y 120 (1900) La Plata, Argentina. Correo electrónico: mjuarez@isis.unlp.edu.ar

<sup>2</sup>Comisión de Investigaciones Científicas Provincia de Buenos Aires y CIDEFI, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, calle 60 y 119 CC 31 (1900) La Plata, Argentina.

<sup>3</sup>Cátedra de Terapéutica Vegetal, Departamento de Ambiente y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, calle 60 y 119 (1900) La Plata, Argentina.

Recibido: 21/9/10 Aceptado: 16/2/11

### Resumen

El objetivo de este trabajo fue optimizar la interacción entre los hongos entomopatógenos y la cutícula de coleópteros plaga de granos almacenados. Dos cepas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Bb GHA y Bb ARSEF 5500) fueron cultivadas en medios de cultivo conteniendo dos fuentes de carbono diferentes: hidrocarburos análogos a los de insecto o glucosa. Tanto los porcentajes de mortalidad de *Acanthoscelides obtectus* (gorgojo del poroto) y *Rhyzopertha dominica* (taladrillo de los granos) como el desarrollo del micelio sobre la cutícula del huésped aumentaron significativamente luego de rociar los insectos con suspensiones de esporas de hongos desarrolladas *in vitro* en medios de cultivo con hidrocarburos respecto a los crecidos en glucosa. Los resultados demostraron que es posible incrementar la virulencia de los hongos entomopatógenos mediante una modificación nutricional del medio de cultivo.

**Palabras clave:** hongos entomopatógenos, virulencia, insectos plaga, cutícula de insectos

### Summary

## Insecticidal capacity of hydrocarbon-grown *Beauveria bassiana* to control coleoptera in stored grain

The aim of this study was to optimize the interaction between entomopathogenic fungi and the cuticle of coleopteran pests of stored grains. Two strains of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Bb GHA y Bb ARSEF 5500) were grown in culture medium containing two different carbon sources, either insect-like hydrocarbons or glucose. Both, mortality percentage of *Acanthoscelides obtectus* (bean weevil) and *Rhyzopertha dominica* (lesser grain borer) and micelial growth on the host cuticle increased significantly after spraying the insects with hydrocarbon-grown fungal suspensions compared to glucose-grown. These results showed that increasing entomopathogenic fungal virulence is feasible by changing the nutrient composition of the culture medium

**Key words:** entomopathogenic fungi, virulence, insect pest, insect cuticle

## Introducción

Debido a las estrictas normas de seguridad impuestas para el uso de insecticidas químicos en los alimentos, su utilización para el control de plagas en granos almacenados es muy limitada. Los plaguicidas biológicos resultan ventajosos por no dejar residuos nocivos para el hombre y el medio ambiente y por no generar fenómenos de resistencia en los insectos (Roberts, 1989; Lecuona, 1996). Entre los bioplaguicidas conocidos, los hongos entomopatógenos tienen la particularidad de penetrar al hospedante a través de su cutícula, característica no común en otros entomopatógenos. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) es uno de los hongos más utilizados y ha sido demostrada su potencial capacidad insecticida sobre diferentes coleópteros (Adane *et al.*, 1996; Padín *et al.*, 1997, 2002; Moino *et al.*, 1998; Rice y Cogburn, 1999; Pedrini *et al.*, 2010a). La infección fúngica comienza por la germinación de los conidios sobre la cutícula del insecto blanco, la cual cumple una función dual: sirve de sustrato para la adhesión de los conidios y provee las señales químicas para la producción de propágulos. La superficie cuticular, esencial para la supervivencia del insecto, está cubierta por una delgada capa de lípidos cuya principal función es restringir la pérdida de agua, controlar la absorción de sustancias químicas y actuar en procesos de comunicación química (Blomquist *et al.*, 1987; Juárez, 1994). La composición y estructura química de los lípidos cuticulares de una gran variedad de especies de insectos, pertenecientes a diferentes órdenes, han sido caracterizadas detalladamente (Blomquist y Dillwith, 1985; Lockey, 1988; Nelson y Blomquist, 1995). Predominan compuestos de muy larga cadena y escasa reactividad: principalmente hidrocarburos, alcoholes grasos, ceras, glicéridos y ácidos grasos libres, de muy variadas estructuras. La composición de los hidrocarburos cuticulares de los insectos es de gran importancia en la función de barrera que ejerce la cutícula frente a infecciones fúngicas (Pedrini, *et al.*, 2007).

Para el éxito de los programas de control microbiano basados en el empleo de hongos entomopatógenos no basta con la detección de cepas virulen-

tas, es necesario además establecer los tratamientos de aplicación y diseñar formulados que optimicen su eficiencia. En este sentido, es posible incrementar la capacidad insecticida de *B. bassiana* cultivando el hongo en un medio conteniendo hidrocarburos similares a los cuticulares de los insectos como única fuente de carbono (Crespo *et al.*, 2000; 2002; Pedrini *et al.*, 2009).

El objetivo de este trabajo fue incrementar la eficiencia insecticida de *B. bassiana* mediante la modificación nutricional del hongo para el control de coleópteros plaga de granos almacenados.

## Materiales y métodos

### Hongos entomopatógenos

Se utilizó *B. bassiana* cepas GHA, aislada de un formulado comercial (Mycotech, Butte, USA), y ARSEF 5500 (USDA-ARS, Ithaca) (Humber, 1998), aislada en 1993 a partir de larvas de *Diatraea saccharalis* en la localidad de Oliveros (Santa Fe, Argentina). Las mismas fueron mantenidas mediante resiembras periódicas en placas conteniendo Sabouroud dextrosa agar modificado y/o mediante pasajes por el insecto hospedador. Los cultivos fúngicos se realizaron en placas de Petri descartables de 9 cm de diámetro. La composición del medio completo fue: 0,4 g de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , 1,4 g de  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$ , 0,6 g de  $\text{SO}_4\text{Mg}$ , 1 g ClK, 1,4 g de  $\text{NO}_3\text{NH}_4$ , 20 g de glucosa, 10 g de extracto de levadura y 15 g de agar disueltos en 1000 ml de agua destilada. La composición del medio mínimo fue similar a la descrita anteriormente pero sin el agregado de glucosa ni de extracto de levadura. Se denominó «CC» (cultivos control) a los hongos crecidos en medio completo, y «CHC» a los hongos crecidos en medio mínimo suplementado con un hidrocarburo sintético (de estructura similar a los cuticulares de insecto) como única fuente de carbono. Se emplearon soluciones de *n*-hexadecano (*n*-C16) y *n*-octacosano (*n*-C28) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), disueltos en hexano (15% p/v). Estas soluciones (2,5 ml) se esparcieron sobre la superficie del medio de cultivo y posteriormente se evaporó el solvente. Los cultivos se realizaron a  $26 \pm 1^\circ \text{C}$  durante 14 días.

## Insectos

Se utilizaron como modelo ejemplares adultos (15 días de edad) de *Acanthoscelides obtectus* Say (gorgojo del poroto) y *Rhyzopertha dominica* Fabricius (taladrillo de los granos). Los insectos fueron criados y mantenidos durante los ensayos en cámara climatizada a  $27 \pm 2$  °C y  $70 \pm 5$  % HR, con una dieta consistente en granos enteros de poroto (*Phaseolus vulgaris*) para *A. obtectus* y de trigo para *R. dominica*. Los insectos fueron colocados en frascos de vidrio de 250 ml con sus respectivas dietas y tapados con malla metálica para permitir el intercambio gaseoso.

## Microscopía electrónica de barrido

Los conidios de Bb GHA fueron suspendidos en agua destilada estéril (ADE) y centrifugados a 1000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y la masa fúngica se resuspendió en una solución de ADE y Tween 80 al 0,05% para preparar suspensiones de  $1 \times 10^9$  conidios/ml de CC y CHC, que fueron inoculados sobre ejemplares de *A. obtectus* mediante la técnica de pulverización. A las 6 o 24 horas desde el tratamiento, las muestras fueron fijadas 1 hora en formol 0,5% y luego 24 horas en formol 1%. El fijador se reemplazó tres veces durante ese período y finalmente se lavó varias veces con ADE. La deshidratación se realizó con concentraciones crecientes de etanol absoluto pro análisis (Carlo Erba, Italia): 30, 50, 70, 90 y 100%. Se realizaron tres lavados, de 15-20 minutos cada uno, con cada una de las distintas concentraciones. Las muestras fueron posteriormente procesadas con el método del punto crítico (Baltec CP 30) y metalizadas con oro paladio en argón en cámara de alto vacío. Distintos campos de la superficie del insecto se observaron y fotografiaron utilizando el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-T100.

## Bioensayos

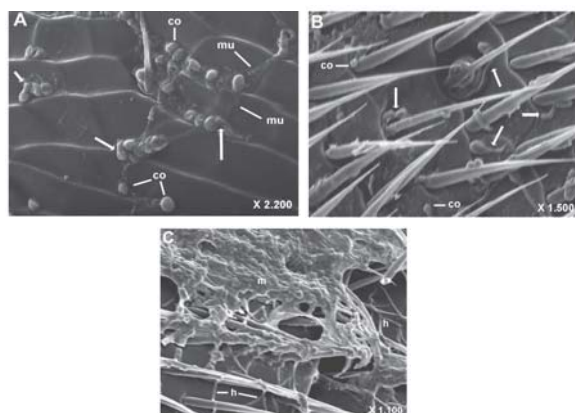
Se pulverizaron ejemplares de *A. obtectus* y *R. dominica* con suspensiones acuosas de CC y CHC obtenidas como se describió en el ítem anterior. Las concentraciones ensayadas fueron  $4 \times 10^6$  conidios/ml (Bb ARSEF 5500) y  $8 \times 10^7$  conidios/ml (Bb GHA). Para cada tratamiento (CC y CHC), se realizaron cinco repeticiones de 10 insectos cada una. Luego de la

inoculación los insectos se colocaron en frascos de vidrio de 250 ml con sus respectivas dietas y se llevaron a la cámara climatizada. El registro de insectos muertos se realizó a los 7 y 14 días post tratamiento. Los cadáveres fueron separados y sumergidos un minuto en etanol 70%, lavados con ADE, secados y mantenidos cinco días en cámara húmeda. Se registraron como infectados los insectos que mostraron el crecimiento de las hifas característico de *B. bassiana*.

## Resultados

Los análisis de microscopía electrónica revelaron la presencia de cúmulos de conidios sobre toda la superficie cuticular de *A. obtectus*, en particular asociados a pelos, luego de la inoculación con suspensiones acuosas de Bb GHA. A las seis horas posteriores al tratamiento se observó la adhesión de los conidios a la cutícula, con una abundante secreción de sustancias mucilaginosas. Se vieron también algunos conidios comenzando la etapa de germinación (Figura 1A). A las 24 horas post-inoculación, la mayor parte de los conidios de CC ya estaban germinados y comenzaban a desarrollar largos tubos germinales (Figura 1B). En experimentos similares empleando CHC, a las 24 horas se observó una invasión masiva de micelio (Figura 1C), a diferencia de las cutículas tratadas con CC (Figura 1B).

En los bioensayos realizados con las dos cepas fúngicas se detectaron importantes diferencias entre CC y CHC. Utilizando Bb GHA sobre *A. obtectus*, se obtuvo un mayor porcentaje de mortalidad empleando hongos crecidos en *n*-C28 ( $67 \pm 3$ %) respecto a los controles ( $43 \pm 3$ %) a los siete días post-tratamiento, con diferencias significativas según el test de *t*-student ( $p < 0,05$ ). También se obtuvieron diferencias significativas entre ambos tratamientos a los 14 días, cuando la mortalidad alcanzó el 100% empleando CHC (Cuadro 1). Similares resultados se consiguieron empleando la misma cepa sobre *R. dominica*, determinándose un mayor porcentaje de mortalidad cuando los insectos se trataron con CHC respecto a los controles ( $p < 0,05$ ). Los valores alcanzados fueron  $69 \pm 16$ % y  $90 \pm 12$ % para CHC a los 7 y 14 días, respectivamente y  $42 \pm 7$ % para CC, tanto a los siete como a los 14 días (Cuadro 1). Utili-



**Figura 1.** Microscopía electrónica de barrido de *B. bassiana* GHA sobre cutícula de *A. obtectus*. Las muestras fueron fijadas a las seis horas (A) y 24 horas (B, C) luego del tratamiento como se describe en Materiales y métodos. (A, B) hongos crecidos en medio completo; (C) hongos crecidos en medio mínimo suplementado con hidrocarburos. Las estructuras germinativas se indican con flechas. co: conidio, m: micelio, h: hifas, mu: sustancia mucilaginosa.

zando Bb ARSEF 5500 también se obtuvieron diferencias significativas entre ambos tratamientos tanto para *A. obtectus* (Crespo *et al.*, 2002) como para *R. dominica*. En este último caso los porcentajes de mortalidad fueron de  $6 \pm 4\%$  y  $33 \pm 13\%$  (CC), elevándose a  $26 \pm 8\%$  y  $51 \pm 17\%$  para los CHC a los 7 y 14 días, respectivamente ( $p < 0,05$ ) (Cuadro 1). Es interesante destacar que en todos los casos ensa-

yados la mortalidad alcanzada a los siete días con hongos crecidos en hidrocarburos (CHC) fue similar a la obtenida con hongos crecidos en medio completo (CC) a los 14 días post-tratamiento.

## Discusión

La definición de virulencia más aceptada actualmente en patología de invertebrados es el grado de patogenicidad de un microorganismo dentro de un grupo o especie (Shapiro-Ilan *et al.*, 2005). En hongos entomopatógenos la virulencia puede variar con distintos sustratos nutritivos, presencia de otros microorganismos, factores climáticos, cuando se realiza el pasaje sobre insectos de distinta susceptibilidad al patógeno, o cuando se multiplican en medios de cultivo sintéticos (Lecuona y Alves, 1996). La virulencia de hongos entomopatógenos también es frecuentemente relacionada con la rapidez en la germinación y el crecimiento sobre la cutícula de los insectos hospedadores. Un alto porcentaje de germinación puede ayudar a incrementar la probabilidad de infección antes que los conidios sean removidos de la cutícula (Altre *et al.*, 1999). En el presente trabajo se muestra que a las 24 horas post-infección se produjo una proliferación masiva del hongo adaptado a crecer en hidrocarburos sobre la cutícula de *A. obtectus*, mientras que en los cultivos de control sólo se observa la adhesión de conidios con escasos tubos germinativos. Este aspecto reve-

**Cuadro 1.** Porcentajes de mortalidad de *Acanthoscelides obtectus* y *Ryzopertha dominica* tratados con *Beauveria bassiana*.

Cepa fúngica	Insecto	Mortalidad (%)				Dosis (conidios/mL)
		Día 7		Día 14		
		CC	CHC	CC	CHC	
Bb GHA	<i>A. obtectus</i>	$43 \pm 6$	$67 \pm 11$	$66 \pm 6$	100	$8 \cdot 10^7$
	<i>R. dominica</i>	$42 \pm 7$	$69 \pm 16$	$42 \pm 7$	$90 \pm 12$	$8 \cdot 10^7$
Bb ARSEF 5500	<i>A. obtectus</i> <sup>1</sup>	$22 \pm 4$	$44 \pm 11$	$26 \pm 5$	$60 \pm 7$	$4 \cdot 10^6$
	<i>R. dominica</i>	$6 \pm 4$	$26 \pm 8$	$33 \pm 13$	$51 \pm 17$	$4 \cdot 10^6$

CC: hongos crecidos en medio completo (cultivos control).

CHC: hongos crecidos en medio mínimo suplementado con hidrocarburos. Se emplearon *n*-C28 (Bb GHA) y *n*-C16 (Bb ARSEF 5500) como únicas fuente de carbono, como se describe en Materiales y métodos.

Los valores representan las medias de cinco repeticiones (10 insectos *c/u*)  $\pm$  desviación estándar. En todos los casos, los valores difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) entre los cultivos controles y adaptados.

<sup>1</sup> Reproducido de Crespo *et al.*, 2002.



la que además de las ventajas metabólicas disponibles en los hongos CHC para degradar los hidrocarburos de la cutícula del insecto (Juárez *et al.*, 2000; Crespo *et al.*, 2000; Pedrini, 2006), la interacción hongo-cutícula se ve favorecida debido a un incremento de la afinidad de los conidios hidrofóbicos por los componentes cuticulares, disponiendo así de una ventaja inicial durante el proceso infectivo.

Una vez producida la adhesión y germinación de los conidios, la penetración a través de la cutícula es la siguiente etapa del ciclo infectivo. La degradación de los hidrocarburos comienza con una reacción de hidroxilación catalizada por complejos enzimáticos de citocromo P450 monooxigenasas, generando compuestos más hidrofílicos que son fácilmente metabolizables (Tanaka y Fukui, 1989). En *B. bassiana*, varios genes de P450 fueron clonados y caracterizados, exhibiendo una elevada expresión en hongos adaptados a crecer en hidrocarburos de insecto (Pedrini, *et al.*, 2010b). A continuación, una serie de enzimas de la vía de  $\beta$ -oxidación metabolizan completamente estos compuestos hidrofílicos; utilizándolos para la obtención de energía e incorporándolos en constituyentes celulares (Crespo, *et al.*, 2000; Pedrini *et al.*, 2006; 2007).

Los resultados de los bioensayos son concordantes con los obtenidos en estudios anteriores en *A. obtectus* y en *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) utilizando cultivos adaptados a crecer en hidrocarburos, permitiendo concluir que mediante esta metodología es posible aumentar la virulencia favoreciendo las etapas iniciales de la infección (Crespo *et al.*, 2002; Pedrini *et al.*, 2007; 2009). Este incremento se evidencia tanto por un aumento en el porcentaje de mortalidad (Crespo *et al.*, 2002; este trabajo) como por una disminución del tiempo letal medio (Pedrini *et al.*, 2009). En el presente trabajo, se confirmó la susceptibilidad de *A. obtectus* a *B. bassiana* (Crespo *et al.*, 2002), incrementando la mortalidad hasta 60-100%, dependiendo de la cepa, luego de 14 días de su inoculación con hongos CHC. Asimismo, en *R. dominica* se detectó un significativo incremento en este parámetro en hongos CHC, alcanzando un 90% de mortalidad con la cepa GHA, en tanto que este valor fue <50% empleando hongos CC a las dosis y condiciones ensayadas. En conclu-

sión, el mejoramiento producido luego de la modificación del medio de cultivo implicaría una adaptación metabólica ventajosa para la colonización del insecto, pero no la modificación genética del microorganismo; de este modo la bioseguridad en relación al hombre y la fauna benéfica no sufriría alteraciones.

## Bibliografía

- Adane K., Moore D. and Archer S.A. 1996. Preliminary Studies on the Use of *Beauveria bassiana* to Control *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in the Laboratory. *Journal of Stored Products Research*, 32(2): 105-113.
- Altre J.A., Vanderberg J.D. and Cantone F.A. 1999. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosaroseus* Isolates to Diamondback moth, *Plutella xylostella*. Correlation with Spore Size, Germination Speed, and Attachment to Cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73(3): 332-338.
- Blomquist G.J. and Dillwith J.W. 1985. Cuticular Lipids. En: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Kerkut G.A y Gilbert L.I. (Eds.) Oxford: Pergamon Press, pp. 117-154: v. 3.
- Blomquist G.L., Nelson D.R. and De Renobales M. 1987. Chemistry, Biochemistry and Physiology of Insect Cuticular Lipids. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 6(4): 227-265.
- Crespo R., Juárez M.P. and Cafferata L.F.R. 2000. Biochemical Interaction Between Entomopathogenic Fungi and their Host-like Hydrocarbons. *Mycologia* 92(3): 528-536.
- Crespo R., Juárez M.P., Dal Bello G.M., Padín S.B., Calderón Fernández G.M. and Pedrini, N. 2002. Increased Mortality of *Acanthoscelides obtectus* by Alkane-grown *Beauveria bassiana*. *BioControl* 47(6): 685-696.
- Humber R.A. 1998. Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures. USDA-ARS (Suppl. to the 1992 Catalog), Ithaca, NY, USA.
- Juárez M.P. 1994. Inhibition of Insect Surface Lipid Synthesis, and Insect Survival. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 25(3): 177-191.
- Juárez M.P., Crespo R., Calderón Fernández G.M., Lecuona R.E. and Cafferata L.F.R. 2000. Characterization and Carbon Metabolism in Fungi Pathogenic to *Triatoma infestans*, a Chagas Disease Vector. *Journal of Invertebrate Pathology*, 76(3): 198-207.
- Lecuona R.E. 1996. Control microbiano, utopía o realidad. En: *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*. Lecuona, R.E. (Ed.) Buenos Aires: M. Mas, pp. 13-15.
- Lecuona R.E. y Alves S.B. 1996. Epizootiología. En: *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*. Lecuona, R.E. (Ed.) Buenos Aires: M. Mas, pp. 17-34.
- Lockey K.H. 1988. Lipids of the Insect Cuticle: Origin, Composition and Function. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 89B: 595-645.
- Moino A. Jr., Alves S.B. and Pereira R.M. 1998. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin Isolates for Control of Stored-grain Pests. *Journal of Applied Entomology* 122(1-5): 301-305.
- Nelson D.R. and Blomquist G.J. 1995. Insect Waxes. En: *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*. Hamilton, R.J. (Ed.) Londres: W. W. Christie, The Oily Press, pp. 1-90.
- Padín S.B., Dal Bello G.M. and Vasicek A.L. 1997. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* for Adults of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) in Stored Grains. *Entomophaga* 42(4): 569-574.

- Padin S.B, Dal Bello G.M. and Fabrizio M. 2002. Grain Loss Caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in Stored Durum Wheat and Beans Treated with *Beauveria bassiana*. *Journal of Stored Products Research*, 38(1): 69-74.
- Pedrini N. 2006. Enzimas fúngicas involucradas en el catabolismo de hidrocarburos. Su aplicación a la optimización de bioinsecticidas. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Pedrini N., Crespo R., Juárez M.P. and de Alaniz M.J.T. 2006. Clues on the Role of *Beauveria bassiana* catalases in Alkane Degradation Events. *Mycologia* 98(4): 528-534.
- Pedrini N., Crespo R. and Juárez M.P. 2007. Biochemistry of Insect Epicuticle Degradation by Entomopathogenic Fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146C(1-2):124-137.
- Pedrini N., Mijailovsky S.J., Girotti J.R., Stariolo R., Cardozo R.M., Gentile, A. and Juárez M.P. 2009. Control of Pyrethroid-resistant Chagas Disease Vectors with Entomopathogenic Fungi. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3(5): e434, <http://www.plosntds.org/doi/pntd.0000434>, abril 2011.
- Pedrini N., Villaverde M.L., Fuse C.B., Dal Bello G.M. and Juárez M.P. 2010a. *Beauveria bassiana* Infection Alters Colony Development and Defensive Secretions of the Beetles *Tribolium castaneum* and *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*, 103(4): 1094-1099.
- Pedrini N., Zhang S., Juárez M.P. and Keyhani N.O. 2010b. Molecular Characterization and Expression Analysis of a Suite of Cytochrome P450 Enzymes Implicated in Insect Hydrocarbon Degradation in the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology* 156(8): 2549-2557.
- Rice W.C. and Cogburn R.R. 1999. Activity of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) against Three Coleopteran Pests of Stored Grain. *Journal of Economic Entomology*, 92(3): 691-694.
- Roberts D.W. 1989. World Picture of Biological Control of Insects by Fungi. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 84(S3): 89-100.
- Shapiro-Ilan D.I., Fuxa J.R., Lacey J.A., Onstad D.W. and Kaya Y.H.K. 2005. Definitions of Pathogenicity and Virulence in Invertebrate Pathology. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88(1): 1-7.
- Tanaka A. and Fukui S. 1989. Metabolism of *n*-alkanes. En: Tanaka, A., Fukui, S., (Eds.) v. 3. *The Yeast*, 2nd ed. Academic Press: New York, pp. 261-287.