

EFFECTOS DE GRADIENTES TÉRMICOS, SALINOS Y pH SOBRE LA GERMINACIÓN *in vitro* DE UN AISLADO NATIVO DE *Beauveria bassiana* (BÁLSAMO) VUILLEMIN, PATÓGENO PARA *Rhodnius prolixus* Y *Triatoma maculata*

Effects of Thermal, Saline and pH Gradients on *in vitro* Germination of a Native Isolate of *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, Pathogenic to *Rhodnius prolixus* and *Triatoma maculata*

Dalmiro José Cazorla Perfetti, Pedro Morales Moreno y María Eugenia Acosta Quintero

Laboratorio de Entomología, Parasitología y Medicina Tropical (L.E.P.A.M.E.T.), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda", Apartado Postal 7403, Coro 4101, estado Falcón, Venezuela. E-mail: Lutzomyia@hotmail.com

RESUMEN

Beauveria bassiana (Bálsamo) Vuillemin es un hongo entomopatógeno empleado en muchos países como agente de control microbiano. En un intento por determinar la influencia de factores ambientales sobre el proceso germinativo, se estudió *in vitro* en medio sólido agar-Lactrimel, los efectos de gradientes térmicos (6 a 40°C), salinos (4 a 70% de NaCl) y pH (1,32 a 12) sobre la germinación de conidios de un aislado nativo (LF14) de *B. bassiana*, que posee una elevada virulencia hacia *Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata*, vectores de la tripanosomiasis americana en Venezuela. Los conidios no germinaron en las temperaturas extremas (6 y 40°C), obteniéndose porcentajes de germinación >99% en el rango de 21-34°C. La germinación del hyphomycete decreció significativamente con el incremento de la concentración de NaCl ([NaCl]), inhibiéndose completamente a partir de la [NaCl] del 7%, y a los pH 1,32 y 11-12. Los porcentajes de germinación fueron significativamente más elevados (>99%) en el rango de pH de 4 a 10. A pesar de que aún se necesitan otra serie de estudios para establecer la influencia de otras variables abióticas o bióticas, por su demostrada tolerancia *in vitro* hacia factores estresantes ambientales (temperatura, pH, [NaCl]), el aislado nativo LF14 de *B. bassiana* aparece como un potencial patotipo a ser utilizado en futuros programas integrados de control biorracional de triatomíneos.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, germinación de conidios, temperatura, salinidad, pH.

ABSTRACT

Beauveria bassiana (Bálsamo) Vuillemin is an entomopathogenic fungus widely used as a microbial control agent in many countries. As an attempt to determine the influence of environmental factors on germinative process, the *in vitro* effects on Lactrimel-agar medium of thermal (6 to 40°C), saline (4 to 70%NaCl) and pH (1.32 to 12) gradients on conidial germination of a native isolate (LF14) of *B. bassiana*, highly virulent to *Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata*, vectors of American tripanosomiasis in Venezuela, were studied. Conidios were not able to germinate at extreme temperatures (6 and 40°C), whereas the germination rates were high at thermal range of 21-34°C. Germination rates decreased significantly with increases of NaCl concentration ([NaCl]) and the germinative process was fully inhibited over a range of [NaCl] 7% and at pH 1.32 and 11-12. Germination rates were significantly higher (99%) at pH range of 4 to 10. In spite of the influence of further abiotic and biotic factors need to be determined, the native isolate LF14 of *B. bassiana* showed a high *in vitro* level of tolerance for a wide range of environmental stressant factors (temperature, pH, [NaCl]). Thus, this fungal isolate appeared to be considered as a potential biocontrol agent to be used in integrated control strategies against triatomine vectors.

Key words: *Beauveria bassiana*, conidial germination, temperature, salinity, pH.

INTRODUCCIÓN

Beauveria bassiana (Bálsamo) Vuillemin, es un hongo hyphomycete mitospórico (Deuteromycetes) que se reproduce mediante conidios, los cuales se forman aéreamente sobre conidióforos que se elevan desde el sustrato [4]. Este hongo entomopatógeno se ha evaluado y empleado en varios países, incluyendo Venezuela, como micoinsecticida para el control y manejo bio-ecológico de insectos plagas de plantaciones agrícolas, así como también de aquellos considerados como vectores biológicos y mecánicos de interés en la salud pública humana y animal [1, 2, 7]. En este sentido, este hongo ha demostrado ser patógeno para varias especies de triatominos, vectores de la enfermedad de Chagas, a nivel de laboratorio y de campo, con resultados promisorios, especialmente hacia aquellas especies triatominas de hábitos peridomésticos y selváticos, donde los insecticidas de origen químico resultan ecológicamente inviables o han resultado poco efectivos o imprácticos en el control de las poblaciones de éstos [10, 14, 15].

La ruta más comúnmente empleada por *B. bassiana* para invadir a los artrópodos terrestres es a través del exoesqueleto. En este sentido, la infección se inicia cuando el conidio se adhiere y germina sobre el tegumento externo, formando un tubo germinativo y un apresorio, desde el cual produce hifas que penetran la cutícula [4, 13].

Al ser la germinación de los conidios uno de los primeros eventos para que ocurra la infección fúngica, resulta importante y relevante estudiar la influencia de los factores, especialmente a nivel estresante, incluyendo los ambientales (e.g., temperatura), sobre el proceso germinativo, en un intento por comprender y clarificar cómo se genera el proceso de infección de *B. bassiana* sobre sus hospedadores invertebrados.

En virtud de lo planteado, en el presente trabajo se evaluó los efectos de gradientes de temperatura, concentraciones de cloruro de sodio ([NaCl]) y pH sobre la capacidad de germinación *in vitro* de conidios de un aislado nativo (LF14) de *B. bassiana*, el cual ha resultado en bioensayos previos, altamente virulento contra *Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata* [3], vectores biológicos de los agentes etiológicos de la tripanosomiasis americana (*Trypanosoma cruzi*) y rangeliana (*T. rangeli*) en Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos fúngicos y preparación de la suspensión de conidios

Los ensayos se realizaron con el aislado LF14 de *B. bassiana*, de la micoteca del laboratorio de Fitopatología, Núcleo Universitario "Rafael Rangel", Universidad de Los Andes, Trujillo, estado Trujillo, Venezuela. El mismo fue aislado en 1992, a partir de cadáver, esporulado de un insecto coleóptero no identificado recolectado en la población de Monay, estado Trujillo, en la re-

gión andino-venezolana. Para su identificación específica, se utilizaron criterios morfológicos macroscópicos y microscópicos [8]. Todos los ensayos de germinación se realizaron en placas de Petri de 90 mm de diámetro conteniendo el medio sólido Lactrimel-agar (30 gr de harina de trigo; 20 cc de leche pasteurizada; 1 cc de miel de abejas; 18 gr de agar y 1000 cc de agua destilada), a las cuales se les esparcía 200 µl de una suspensión fúngica ajustada mediante hemocitómetro, a 1×10^7 conidios/ml. Los conidios se obtuvieron raspando la superficie de cultivos esporulados de 15 días crecidos sobre el medio sólido (Lactrimel), y mantenidos a temperatura ambiente (25-27°C). El material fúngico cosechado se suspendió en agua destilada estéril, y se filtró a través de gasa para separar el micelio de los conidios.

Efecto de la temperatura

Una vez sembrados los conidios sobre el medio Lactrimel, las placas de Petri se incubaron por 24 horas a 6; 12; 14; 15; 17; 18; 19; 21; 23; 26; 30; 32; 34; 35; 38 y 40°C en cámara de ambientación (Biotronette® Mark II, modelo 84, Lab Line Instruments, Inc., Illinois, EUA), bajo condiciones de saturación de humedad relativa (HR) (>90%); luego, se agregó azul de lactofenol para detener la germinación y dar contraste a los conidios. Se hicieron cortes del cultivo y se colocaron sobre lámina portaobjetos y cubiertos con una laminilla cubreobjeto. Se realizaron 3 repeticiones por temperatura, contabilizándose 1000 conidios por cada repetición y 3000 por cada temperatura. Los conidios se consideraron germinados cuando tenían un tubo germinativo igual o superior a su diámetro [4].

Efecto de la concentración de NaCl ([NaCl])

Para estos ensayos, el medio Lactrimel-agar se preparó añadiendo diversas concentraciones de NaCl, incluyendo 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 50 y 70%. Como testigo (control) se incluyó un cultivo al cual no se le añadió NaCl. Las placas se incubaron por 24 h a 26°C y HR >90%, en una cámara de ambientación. Similarmente, se realizaron 3 repeticiones por concentración de NaCl, y se contabilizaron 1000 conidios por cada repetición y 3000 por cada [NaCl]. El criterio de germinación se tomó como en los ensayos de temperatura.

Efecto del pH

Para estos bioensayos, el medio Lactrimel-agar se ajustó a pH 1,32; 2; 3; 4; 10; 11; 12 y 6,8 (testigo o control) mediante la adición de HCl 1N o NaOH 1N. Los ensayos se realizaron bajo las mismas condiciones de temperatura y HR de la experiencia con [NaCl]. Por cada pH se hicieron 3 repeticiones. La contabilización y el criterio de germinación de los conidios, se hicieron similarmente como en los ensayos anteriores.

Análisis estadístico

Antes de realizar los análisis, a los datos se les aplicó una transformación angular o arcoseno, de manera tal de homogeni-

zar las varianzas. La significancia estadística de las diferencias entre las medias de los porcentajes de germinación de los diferentes ensayos, se calculó mediante las pruebas de Análisis de Varianza (ANOVA) y de comparación múltiple de Student-Newman-Keuls (SNK) [17]. Los datos se analizaron mediante paquetes estadísticos MINITAB versión 13,20 (Mini Tab Inc., 2000) y STATGRAPHICS plus for Windows 20 (Statistical Graphic Corp., 1999-1996), y Página Web para cálculos estadísticos StatPages.net (members.aol.com/johnp71/javastat.html).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con excepción de los 6 y 40°C, los conidios del aislado LF14 de *B. bassiana* germinaron en las restantes temperaturas probadas (12-35°C) (TABLA I). Los porcentajes de germinación se incrementaron significativamente desde los 12, 14 y 15°C hasta 19-34°C ($P < 0,00001$), alcanzándose porcentajes de germinación >99% en el rango de 21-34°C.

En la TABLA II se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la [NaCl]. La germinación del hyphomycete

decreció significativamente con el incremento de la [NaCl] ($P < 0,00001$), y se inhibió completamente a partir de la [NaCl] del 7%.

En la TABLA III se dan los resultados de la influencia del pH; el aislado LF14 de *B. bassiana* mostró un porcentaje de germinación elevado (>99%) en el rango de pH entre 4 y 10, inhibiéndose significativamente el proceso germinativo a los pH 1,32-2 y 11-12 ($P < 0,00001$).

Cuando se realiza un programa de control de plagas con micopesticidas, la germinación de los conidios es uno de los pasos más importantes, ya que el inicio de las epizootias se encuentra condicionado a la capacidad de éstas estructuras para germinar sobre los hospedadores [16]. Los mejores patotipos del hyphomycete a seleccionar para un Programa de Manejo Integrado de Plagas (MIP), serán aquellos cuyos conidios aéreos sean capaces de germinar y persistir bajo las condiciones climáticas locales. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que los conidios del aislado LF14 de *B. bassiana* toleran satisfactoriamente un gradiente térmico con temperaturas extremas, al obtenerse porcentajes de germinación >99% en el rango de temperatura entre 21 y 34°C. Hallazgos similares a los del presente estudio observaron Luz y Fargues [13], con el aislado INRA 297 del hyphomycete, igualmente patogénico para *R. prolixus*, al obtener elevados porcentajes de germinación (>95%) *in vitro* en el rango térmico entre 20-35°C. Por contraste, Lecuona y col. [11] reportaron tan sólo 3% de germinación para la cepa Bb10 del hyphomycete, patógena para *T. infestans*, expuesta a 34°C. Estas diferencias de respuestas detectadas pudieran estar relacionadas con la variabilidad genética entre las cepas [9].

TABLA I
PORCENTAJE DE GERMINACIÓN RELATIVO DE
CONIDIOS DEL AISLADO LF14 DE *Beauveria bassiana*
SOMETIDO A UN GRADIENTE DE TEMPERATURA Y
HUMEDAD RELATIVA >90%/ RELATIVE GERMINATION
PERCENTAGE OF CONIDIOS OF ISOLATE LF14 OF *Beauveria*
***bassiana* EXPOSED TO A TEMPERATURE GRADIENT**
AND RELATIVE HUMIDITY >90%.

Temperatura (°C)	% Germinación $\bar{X}^{++} \pm$ D.S.
6	0,00 ^a $\pm$ 0,00
12	0,57 ^a $\pm$ 1,00
14	1,27 ^a $\pm$ 0,65
15	27,17 ^{b,c} $\pm$ 9,56
17	53,27 ^b $\pm$ 8,05
18	55,5 ^b $\pm$ 2,04
19	75,87 ^{b,d} $\pm$ 19,24
21	99,37 ^{b,d,e} $\pm$ 0,58
23	99,37 ^{b,d,e} $\pm$ 0,58
26	99,67 ^{b,d,e} $\pm$ 0,31
30	99,73 ^{b,d,e} $\pm$ 0,32
32	99,07 ^{b,d,e} $\pm$ 0,18
34	99,33 ^c $\pm$ 0,36
35	2,73 ^a $\pm$ 2,02
38	0,23 ^a $\pm$ 0,26
40	0,00 ^a $\pm$ 0,00

++ En el análisis de comparación múltiple (SNK), cuando dos medias posean letras iguales sus diferencias resultaron estadísticamente no significativas ($P > 0,05$). $\bar{X}$ = Media aritmética; D.S. = Desviación Standard.

TABLA II
PORCENTAJE DE GERMINACIÓN RELATIVO DE
CONIDIOS DEL AISLADO LF14 DE *Beauveria bassiana*
CULTIVADO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE
NaCl ([NaCl]) Y MANTENIDO A 26°C Y HUMEDAD
RELATIVA >90%/ RELATIVE GERMINATION PERCENTAGE OF
CONIDIOS OF ISOLATE LF14 OF *Beauveria bassiana* CULTURED IN
DIFFERENT NaCl CONCENTRATIONS ([NaCl]) AND KEPT AT 26°C
AND RELATIVE HUMIDITY >90%.

[NaCl] (%)	% Germinación $\bar{X}^{++} \pm$ D.S.
0*	99,70 ^a $\pm$ 0,25
4	97,33 ^b $\pm$ 1,82
5	97,45 ^b $\pm$ 1,98
6	2,00 ^d $\pm$ 1,63
7-20**	0,0 ^c $\pm$ 0,00
50	0,0 ^c $\pm$ 0,0
70	0,0 ^c $\pm$ 0,0

* Cultivo control (testigo), al cual no se le añadió NaCl. ** Incluye el rango de [NaCl] desde 7 al 20%. ++ En el análisis de comparación múltiple (SNK), cuando dos medias posean letras iguales sus diferencias resultaron estadísticamente no significativas ($P > 0,05$). $\bar{X}$ = Media aritmética; D.S. = Desviación Standard.

TABLA III
PORCENTAJE DE GERMINACIÓN RELATIVO DE
CONIDIOS DEL AISLADO LF14 DE *Beauveria bassiana*
CULTIVADO A DIFERENTES [H⁺] (pH) Y MANTENIDO
A 26°C Y HUMEDAD RELATIVA >90%/ RELATIVE
GERMINATION PERCENTAGE OF CONIDIOS OF ISOLATE LF14 OF
Beauveria bassiana CULTURED IN DIFFERENT [H⁺] (pH) AND KEPT
AT 26°C AND RELATIVE HUMIDITY >90%.

pH	% Germinación ++ ± D.S.
1,32	0,00 ^a ± 0,00
2	0,27 ^a ± 0,26
3	97,57 ^c ± 2,52
4	100 ^b ± 0,00
6,8*	99,40 ^{b,e} ± 0,31
10	99,17 ^{d,e} ± 0,24
11	0,00 ^a ± 0,00
12	0,00 ^a ± 0,00

* Cultivo control (testigo). ++ En el análisis de comparación múltiple (SNK), cuando dos medias posean letras iguales sus diferencias resultaron estadísticamente no significativas (P>0,05). $\bar{X}$ = Media aritmética; D.S. = Desviación Standard.

Los resultados revelaron que el aislado LF14 de *B. bassiana* no es capaz de germinar a partir de la adición de una [NaCl] ≥7% al medio de cultivo. Un aumento en la concentración de NaCl en el sustrato puede conllevar a que la disponibilidad de agua (i.e., disminución de la actividad acuosa) para los conidios sea limitada, posiblemente debido al efecto osmótico que se produce [19]. Por otra parte, la elevada salinidad también pudiera producir un efecto tóxico sobre los conidios, tal como ocurre en las plantas [12]. Sin embargo, los conidios del aislado LF14 de *B. bassiana* lograron alcanzar porcentajes de germinación >95% a [NaCl] de hasta 5%. Similarmente al presente ensayo, Luz y Fargues [13] reportaron menores porcentajes de germinación del aislado INRA 297 en cultivos sólidos y líquidos a los que se les adicionó mayores [NaCl], al verse disminuido la HR y la disponibilidad de agua, factores éstos que son críticos para que ocurra el proceso germinativo en los hyphomycetes [4, 9, 13].

Los futuros diseños de MIP en el caso particular para el control de las poblaciones de triatominos, deben tener presente las condiciones microclimáticas, incluyendo entre otras temperatura y HR, que prevalecen en los refugios (palmeras, grietas de paredes, etc.) de estos insectos-vectores. En este sentido, Heger y col. [6] refieren que, en una región endémica del estado Portuguesa, al occidente de los llanos de Venezuela, las poblaciones de *R. prolixus* en ayuno prolongado prefieren refugiarse en aquellos sitios de las palmeras, grietas de las paredes y techos de palma donde las temperaturas son más bajas y la HR más elevada, como un intento de los insectos por regular su balance hídrico y energético, cuya única fuente alimenticia y de agua proviene de la sangre de los vertebrados.

Es bien conocido que el pH tiene efecto sobre las funciones biológicas. Las variaciones extremas de pH entre alcalinos y ácidos, puede conllevar a que se rompan los enlaces de hidrógeno de enzimas, bicapa lipídica y del ADN, afectándose de esta manera la integridad y metabolismo de la célula [5]. El aislado LF14 mostró un amplio rango de tolerancia (germinación >99%) hacia condiciones extremas de pH ácidos (3-4) y básicos (10), lo cual sugiere que este aislado podría poseer una amplia adaptabilidad, plasticidad y resistencia a las condiciones adversas. Se ha reportado porcentajes nulos de germinación de *B. bassiana* a pH 10 [18].

Los medios artificiales *in vitro* representan una herramienta útil para obtener información sobre la influencia de los factores ambientales en el proceso germinativo de los conidios; sin embargo, se debe tener en cuenta las diferencias con las condiciones naturales existentes en la cutícula de los insectos, así como también la complejidad de la interacción de esta estructura con los conidios [9, 13].

No se conoce bien del mecanismo por el cual los conidios del hyphomycete poseen tolerancia hacia los rangos extremos de temperatura, sal y pH; no obstante, se sabe por ejemplo que la acumulación de solutos compatibles osmóticamente (e.g., manitol, trehalosa, glicerol) en las vacuolas de *B. bassiana*, y de otros dos hyphomycetes entomopatògenos: *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces farinosus*, ayudan a las membranas y proteínas de éstos a protegerse de los factores ambientales estresantes [5]. Por lo tanto, cabe la posibilidad de incrementar la resistencia y tolerancia, así como también de acelerar la germinación, de los conidios del aislado LF14 de *B. bassiana* hacia los factores estresantes del medio ambiente mediante la adición al medio de cultivo de polioles y/o trehalosa, las cuales son sustancias de ajuste osmótico [5]. Esta afirmación encuentra apoyo en los trabajos de Halworth y Magan [5], quienes al manipular las concentraciones de glicerol y eritritol en conidios de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, pudieron incrementar la capacidad de las mismas para germinar bajo condiciones de muy escasa actividad acuosa.

Los resultados obtenidos demuestran una amplia tolerancia *in vitro* hacia los rangos térmicos, salinos y de pH extremos del aislado LF14 de *B. bassiana* lo cual lo convierte en un potencial patotipo para ser implementado como un micoinsecticida en un futuro programa de MIP de triatominos. Sin embargo, es necesario realizar estudios más amplios y detallados acerca de la influencia de otros factores, tanto bióticos como abióticos, durante el proceso germinativo e invasivo de este aislado.

CONCLUSIONES

Los conidios del aislado LF14 de *B. bassiana* alcanzan mayores porcentajes de germinación en el rango térmico de 21- 34°C.

A temperaturas extremas de 6 y 40°C se inhibe la germinación del hyphomycete.

La germinación de *B. bassiana* decreció significativamente con el incremento de la [NaCl].

Los porcentajes de germinación del aislado nativo fueron significativamente mayores en el rango de pH de 4 a 10.

El hyphomycete no mostró tolerancia hacia las condiciones *in vitro* de pH 1,32 y 11-12.

Los programas para el manejo integrado de la tripanosomiasis americana, deben tener presente las condiciones microclimáticas de los refugios de los triatominos vectores.

El aislado LF14 de *B. bassiana* se presenta como un potencial patotipo para un programa integrado de control biológico de triatominos.

AGRADECIMIENTO

Decanato de Investigaciones (Proyecto CI-2001-007), Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda", Coro, estado Falcón, Venezuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALCALÁ DE M., D.; MARCANO, J.; MORALES, A. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* sobre adultos del picudo de la batata *Cylas formicarius elegantulus* Summers (Curculionidae) **Rev. Fac. Agron. LUZ.** 16: 52-63. 1999.
- [2] BRAGA, G.; FLINT, S.; MILLER, C.; ANDERSON, A.; ROBERTS, D. Both solar UVA and UVB radiation impairs conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochem. Photobiol.** 74: 734-739. 2001.
- [3] CAZORLA, D.; MORALES, P.; SALAS, P.; YÁNEZ, Y.; CASTILLO, C.; ACOSTA, M. Patogenicidad de un aislamiento autóctono de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) contra *Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata* (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae). **XIX Congreso Venezolano de Entomología "Dr. Carlos Pereira Núñez"**. San Felipe, 4 al 7 julio, Venezuela. 138-139 pp. 2005.
- [4] GOETTEL, M.S.; INGLIS, G.D. Fungi: Hyphomycetes. In: L. Lacey (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**. Academic Press. San Diego, California, USA. 213-249 pp. 1997.
- [5] HALLSWORTH, J.; MAGAN, N. Culture age, temperature and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 2435-2442. 1996.
- [6] HEGER, T.; GUERIN, P.; EUGSTER, W. Microclimatic factors influencing refugium suitability for *Rhodnius prolixus*. **Phy. Ent.** 31: 248-256. 2006.
- [7] HOLDER, D.; KEYHANI, N. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. **Appl. Environ. Microbiol.** 71: 260-266. 2005.
- [8] LACAZ C.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.; MELO, N. Guía para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. Sarvier. São Paulo. Brasil. 450 pp. 1998.
- [9] LAZZARINI, G.; ROCHA, L.; LUZ, C. Impact of moisture on *in vitro* germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. **Mycol. Res.** 110: 485-492. 2006.
- [10] LECUONA, R.; EDELSTEIN, J.; BERRETTA, M.; LA ROSSA, F.; ARCAS, J. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hyphomycetes) strains as a potential agent for control of *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera: Reduviidae). **J. Med. Entomol.** 38: 172-179. 2001.
- [11] LECUONA, R.; RODRÍGUEZ, J.; LA ROSSA, F. Effect of constant and cyclical temperatures on the mortality of *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae) treated with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hyphomycetes). **Neotrop. Entomol.** 34: 675-679. 2005.
- [12] LERNER, H. Adaptation to salinity at the plant cell level. **Plant and Soil.** 89: 3- 14. 1985.
- [13] LUZ, C.; FARGUES, J. Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. **Mycopathol.** 138:117-125. 1997.
- [14] LUZ, C.; SILVA, I.; CORDEIRO, C.; TIGANO, M. *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) as a possible agent for biological control of Chagas disease vectors. **J. Med. Entomol.** 35:977-979. 1998.
- [15] LUZ, C.; ROCHA, A.; NERY, G.; MAGALHAES, B.; TIGANO, M. Activity of oil- formulated *Beauveria bassiana* against *Triatoma sordida* in peridomestic areas in Central Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 99:211-218. 2004.
- [16] OLIVEIRA, R.; NEVES, P. Compatibility of *Beauveria bassiana* with Acaricides. **Neotrop. Entomol.** 33: 353-358. 2004.
- [17] SCHEFLER, W. Análisis de Varianza: primera parte. En: **Bioestadística**. Fondo Educativo Interamericano, S.A. D.F. México. 122-147 pp. 1981.
- [18] TENG, C. Studies on the biology of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with the reference to microbial control of insects. **Act. Bot. Sinica.** 10: 210-232. 1962.
- [19] VACHER, J.; DIZES, J.; ESPINDOLA, G.; CASTILLO, C. La capacidad de ajuste osmótica en la quinua *Chenopodium quinoa* (Willd.). **Agrosur.** 22:20. 1994.