

POLIMORFISMO DAS α -ESTERASES E DA PATOGENICIDADE
DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Beauveria bassiana*
(BALS.) VUILL.

Myrian S. Tiganó²

Guy Riba²

ABSTRACT

Esterases polymorphism and pathogenicity of the
entomogenous fungus *Beauveria bassiana*
(Bals.) Vuill.

Strains of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. originating from various insects and countries, were compared for their profiles of α -esterases isoenzymes. A total of 17 different bands were identified in 43 electrophoretic profiles. A correspondent factorial analysis confirmed the high genetical variability between the strains analysed.

Some of the strain were also tested for their pathogenicity towards *Ostrinia nubilalis* (Hübner). No relationship was observed between virulence and the electrophoretical patterns of α -esterases. However, the analysis of the α -esterases isoenzymes allowed the characterization of strains of *B. bassiana* and the estimative of the polymorphism in populations of this fungus.

RESUMO

As linhagens de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isoladas de vários insetos hospedeiros e diversas origens geográficas foram comparadas através de análises dos perfis eletroforéticos das α -esterases. Obteve-se um total de 17 bandas diferentes com 43 fenótipos eletroforéticos identificados. Uma aná-

Recebido em 10/07/90

1. Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN/EMBRA
PA, Caixa Postal 102372, 70849 Brasília DF, Brasil.
2. Station de Recherches de Lutte Biologique, INRA F-78280 Guyancourt,
França.

lise fatorial de correspondência confirma a alta variabilidade genética entre as linhagens estudadas.

Algumas destas linhagens foram testadas quanto à patogenicidade em lagartas de *Ostrinia nubilalis* (Hübner). Não se observou nenhum tipo de correlação entre a patogenicidade e o perfil eletroforético das α -esterases. No entanto, análise das isoenzimas de α -esterases em *B. bassiana*, demonstra ser uma boa ferramenta para caracterizar linhagens e avaliar o polimorfismo de populações da espécie.

INTRODUÇÃO

O fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. vem sendo utilizado no controle microbiano de insetos na U.R.S.S. e na China (KONONOVA, 1978; RIBA, 1985). Em outros países, como no Brasil, ele vem sendo testado no controle de pragas apresentando boas perspectivas de utilização com o bio-inseticida (ALVES, 1986).

Esse fungo é com freqüência isolado da natureza causando infecção em diferentes insetos-pragas. Os bioensaios realizados em laboratório vêm demonstrando diferenças entre as linhagens a nível de patogenicidade, de acordo com o inseto hospedeiro (FARGUES, 1981; RIBA, 1985). Para melhor avaliar a variabilidade genética das espécies, e para caracterizar as linhagens em programas de controle biológico se faz necessário o estudo de parâmetros polimórficos e fáceis de serem analisados.

A análise de proteínas por eletroforese é uma técnica que vem sendo empregada no estudo de linhagens de diferentes espécies de fungos entomopatogênicos (DE CONTI *et al.*, 1980; FARGUES, 1981; BOUCIAS *et al.*, 1982; RIBA *et al.*, 1986a,b).

Neste trabalho, procedeu-se a análise de uma amostra de 92 linhagens de *B. bassiana* isoladas de vários insetos hospedeiros e diversas origens geográficas. A técnica de focalização isoelétrica foi escolhida para separar extratos proteicos endocelulares das linhagens estudadas. Uma análise preliminar demonstrou que as isoenzimas α -esterases são bastante polimórficas para *B. bassiana* (TIGANO, 1985).

Foram também realizados testes de patogenicidade com 39 linhagens sobre lagartas de *Ostrinia nubilalis* (Hübner), uma importante praga do milho em clima temperado. A relação desta característica com o perfil esterásico foi analisada.

MATERIAL E MÉTODOS

Noventa e duas culturas monospóricas de *B. bassiana* pertencentes à coleção da Estação do I.N.R.A. ("Institut National de Recherche Agronomique") La Minière, na França, foram utilizadas neste trabalho. Estas linhagens vêm de 18 países diferentes sendo 44 delas de origem francesa. A amostra contém linhagens de oito famílias ou ordens diferentes de hospedeiro, sendo uma única isolada do solo (Quadro 1).

Os conídios foram obtidos após 10 dias de cultura das linhagens a 25°C em meio semi-sintético contendo: 0,36g KH₂PO₄; 1,42g Na₂HPO₄; 1g KCl; 0,6g MgSO₄ 7H₂O; 0,7g NH₄NO₃; 1g de extrato de levedura; 10g glicose; 10g agar, em 1000 ml de água destilada.

O micélio foi produzido a partir da inoculação de conídios em 50 ml de meio líquido Adamek (ADAMEK, 1965) agitado por 7 dias a 25°C. A massa hifal foi obtida por centrifugações sucessivas, sendo a última efetuada com tampão Tris-EDTA 5.10⁻³, pH 8,2. Após secagem e pesagem, o micélio foi fragmentado com nitrogênio líquido e centrifugado a 10.000 g por 90 minutos a 4°C. O sobrenadante, contendo as proteínas solúveis, foi distribuído em tubos e estocado a -35°C. Três extrações foram feitas para cada linhagem, e estas foram examinadas em diferentes géis.

As isoenzimas foram separadas por focalização isoeletrica em géis de poliacrilamida a 10%, segundo a técnica descrita por RIBA *et al.* (1986 a).

A análise das α -esterases foi realizada segundo o método proposto por DICKSON *et al.* (1971).

Cada banda enzimática foi considerada como uma variável qualitativa (ausência ou presença). A análise fatorial de cor respondência foi escolhida para tratar os dados, pois ela não requer o agrupamento inicial dos indivíduos (CAILLIEZ & PAGES, 1983). Como em outros métodos multifatoriais de análise, o primeiro eixo descreve o máximo de variação; o segundo eixo que depende do primeiro, descreve o máximo seguinte; e assim é para os eixos subsequentes. Nesta análise, as variáveis estudadas foram as bandas eletroforéticas, o inseto hospedeiro e a origem geográfica. Cada variável contribui diferentemente para a variação expressa em cada eixo.

Para os testes de patogenicidade com relação a *O. nubilalis*, selecionaram-se 39 linhagens apresentando características diversas quanto à origem e ao perfil isoenzimático. O tratamento com as diferentes linhagens foi efetuado por imersão de cada lote de 20 lagartas do 5º instar em 20ml de uma suspensão aquosa de conídios (1x10⁷ conídios/ml) durante 45 segundos. O controle de mortalidade foi realizado diariamente até o 15º dia após a aplicação do fungo. Adotou-se o critério de mortalida-

de por micose, definida pelo desenvolvimento do fungo na superfície da lagarta morta. A patogenicidade das linhagens foi caracterizada pelo TL 50 (tempo necessário para matar 50% dos indivíduos), que foi obtido a partir de uma reta definida pelo valor proibit da porcentagem de mortalidade e o logaritmo do tempo (LELLOUCH & LAZAR, 1974).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através de várias passagens em diferentes géis, todas as linhagens utilizadas (Quadro 1) foram comparadas entre elas com relação às α -esterases. Cada linhagem se caracteriza por um conjunto de isoesterases que aparecem sob a forma de bandas, constituindo um perfil enzimático. Estas bandas foram relativamente constantes à migração nos diferentes géis. De 92 linhagens analisadas, um total de 17 bandas foi obtido. Não sendo comum a todas as linhagens, estas bandas mostram uma variabilidade importante a nível da espécie *B. bassiana*. Assim, da amostra analisada, 43 fenótipos foram identificados (Figura 1).

As esterases também já foram identificadas como sendo, polimórficas; BOUCIAS *et al.* (1982), encontraram 33 sítios de atividade para os sistemas α e β esterases na análise eletroforética de 17 isolados de *Hirsutella tompsonii*. Da mesma forma, foram encontrados 7 tipos diferentes para as α -esterases numa amostra de 16 linhagens do género *Tolypocladium* (RIBA *et al.* 1986 b). Igualmente para o fungo *Metarhizium anisopliae*, DE CONTI *et al.* (1980), demonstraram a possível utilização das α -esterases para caracterizar e separar isolados brasileiros. Este importante número de isoesterases, tanto a nível da espécie, como da linhagem, pode estar contribuindo com a adaptabilidade ecológica e parasitária destes fungos (BOUCIAS *et al.* 1982, RIBA *et al.* 1986 a).

A análise fatorial de correspondência, que foi utilizada para agrupar os indivíduos, se mostrou pouco discriminante, pois os dois eixos principais representam somente 38% da variabilidade total (Figura 2). Todas as linhagens pertencentes a um tipo eletroforético foram projetadas sobre um mesmo ponto (Figura 2). Estes tipos constituídos por linhagens do mesmo perfil esterásico, ficaram dispersos no plano formado pelos 2 eixos principais. Portanto, os tipos não foram dissociados pelas outras variáveis analisadas, (hospedeiro e origem geográfica). Os tipos mais distintos foram apresentados longe da intersecção dos eixos, como os tipos 32 e 17. Aliás, o tipo 32 se destaca por ser o único a apresentar a banda F, e por ter sido isolado de um aracnídeo, e não de um inseto (Figura 2).

As origens parasitárias e geográficas foram projetadas na intersecção dos dois eixos, não contribuindo para a discriminação das linhagens (Figura 7). Dos 43 perfis esterásicos reconhecidos, mais da metade (32) são constituídos de uma só li

nhagem (Quadro 2), o que demonstra a forte heterogeneidade das isoenzimas para *B. bassiana*. Nos tipos que apresentam mais de uma linhagem, observa-se que elas diferem bastante quanto ao inseto e país do qual foram isoladas (Quadro 2). Assim, não foi possível correlacionar tipo eletroforético com país ou inseto de origem. Estas mesmas características, quando estudadas para os fungos entomopatogênicos *Hirsutella tompsonii* e *Metarhizium anisopliae* permitiram a identificação de sub-grupos na população analisada (BOUCIAS *et al.*, 1982; RIBA, 1985).

As linhagens testadas quanto à agressividade contra lagartas de *O. nubilalis* foram selecionadas por apresentarem hospedeiro de origem ou tipo esterásico diferentes (Quadro 3). Das 29 linhagens, 5 apresentaram mortalidade nula e 14 não foram capazes de matar 50% da população. Nas linhagens mais agressivas, observa-se uma variação contínua do TL50 de 6,1 a 13,7 dias.

As 23 linhagens que não foram originalmente isoladas de *O. nubilalis*, se mostraram pouco patogênicas com relação a este inseto (mortalidade 50% não atingida), com exceção de 5 delas que apresentaram TL50 variando de 6,1 a 13,7 dias. No entanto, as linhagens isoladas de *O. nubilalis* apresentaram em geral, o tipo eletroforético 1, e foram patogênicas ao hospedeiro de origem, com exceção da linhagem 306 que não foi capaz de atacar este inseto. Apesar de certa homogeneidade, não se pode concluir sobre a existência de uma correlação entre a patogenicidade e o perfil eletroforético. O exemplo do tipo eletroforético 1 mostra que as linhagens tendo as mesmas isoenzimas α -esterases podem ser variáveis ao nível da agressividade a *O. nubilalis*. As linhagens 306 e 221 pertencentes ao tipo 2 não são capazes de atacar este inseto, enquanto a 307, também do mesmo tipo é a mais patogênica, pois o TL50 é de 6,1 dias (Quadro 3). Esta mesma observação foi feita em linhagens do fungo *M. anisopliae*, quando analisadas em 6 diferentes sistemas isoenzimáticos (RIBA *et al.*, 1987).

A situação de baixa variabilidade observada entre as linhagens obtidas originalmente de *O. nubilalis*, e em geral, isoladas no mesmo país (França), poderia ser resultante de uma pressão de seleção exercida pelo inseto hospedeiro. Em fungos fitopatogênicos observa-se uma certa semelhança entre isolados adaptados a uma planta hospedeira (CATEN, 1974; VALLAVIEILLE, 1983). Para avaliar esta hipótese, se faz necessário o estudo de um grande número de linhagens isoladas de *O. nubilalis* nas diferentes regiões da França, onde esta praga ocorre.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, demonstraram uma grande heterogeneidade na população de 92 linhagens de *B. bassiana* analisadas. Não foi possível estabelecer uma correlação entre o perfil eletroforético das α -esterases e, o hospedeiro de origem ou local de isolamento das linhagens. Através destas características, também não foi possível distinguir na amostra estudada a presença de sub-populações de linhagens.

No entanto, este estudo colocou em evidência uma característica enzimática que permite identificar as linhagens dentro da espécie *B. bassiana*. Ademais, as isoenzimas α -esterases podem ser bastante úteis no estudo do polimorfismo de populações selvagens deste fungo em um determinado agrossistema.

QUADRO 1 - Lista de linhagens de *Beauveria bassiana* estudadas.

LINHAGEM	ANO DE	HOSPEDEIRO DE	ORIGEM	LINHAGEM	ANO DE	HOSPEDEIRO DE	ORIGEM
Nº	ISOLAMENTO	ORIGEM	GEOGRÁFICA	Nº	ISOLAMENTO	ORIGEM	GEOGRÁFICA
5	1961	<i>Daucetopoea pityocampa</i>	França	148	1978	<i>Gastrophysalis</i>	Espanha
21	1969	"	França	306	1983	"	China
27	1971	"	Portugal	307	1983	"	China
17	1968	<i>Carpocapsa pomonella</i>	França	170	1981	"	Hungria
66	1974	"	França	147	1978	"	França
26	1971	<i>Septalia</i> sp.	França	149	1978	"	França
97	1974	"	Austria	157	1978	"	França
29	1971	<i>Bombyx mori</i>	França	168	1980	"	França
160	1979	"	Japão	173	1981	"	França
34	1972	<i>Chilo suppressalis</i>	França	144	1978	"	França
40	-	"	França	156	1978	"	França
68	-	"	França	171	1981	"	França
116	-	"	França	172	1981	"	França
38	1972	<i>Saturnia pyri</i>	França	199	1983	"	França
35	-	<i>Niatraea saovahalis</i>	Cuba	200	1983	"	França
59	1973	<i>Cirphis unipuncta</i>	França	146	1978	"	França
60	1973	<i>Mamestra brassicae</i>	França	188	1982	"	França
166	1979	<i>Lycophotia</i> sp.	França	191	1982	"	França
196	1983	<i>Heliothis armigera</i>	Espanha	192	1982	"	França
288	1969	<i>Stilpnotis salicis</i>	U.R.S.S.	182	1982	<i>Sitona diaspidaeus</i>	França
295	1967	<i>Symantaria dispar</i>	U.R.S.S.	220	1983	"	França
162	1979	<i>Dendrolimus</i> sp.	Japão	221	1983	"	França
145	-	<i>Gastrophysalis</i>	Espanha	231	1983	"	França
143	1978	<i>Sitona diaspidaeus</i>	Australia	293	1983	<i>Calathus micropterus</i>	Polonha
142	1977	<i>Sitona lineatus</i>	França	290	1983	"	Polonha
13	1966	<i>Sethynoderes punctiventris</i>	Iugoslavia	296	1978	-	Brasil
186	1982	<i>Citophynoxenus sulcatus</i>	França	300	-	<i>Curculionidae</i>	E.U.A.
128	1976	<i>Cyba formicarius</i>	Madagascar	286	1983	"	Polonha
47	1973	<i>Hispolepis subfasciata</i>	Colombia	305	1983	"	Polonha
176	1982	<i>Haplochelus marginalis</i>	Reunião	301	-	<i>Leptinotarsa deomil- neata</i>	E.U.A.
195	1983	<i>Laryedon senatus</i>	França	304	1976	"	Polonha
20	1969	<i>Aelia gemari</i>	Espanha	299	-	"	E.U.A.
150	1979	"	Espanha	57	1973	"	Polonha
30	1971	Aphididae	França	72	1974	"	Tchad
175	1982	<i>Lilia entreriana</i>	Brasil	43	1973	"	França
153	1978	Apidae	França	308	1984	"	Polonha
103	1975	Pingidae	Colombia	309	1984	"	Polonha
37	1972	<i>Forficula</i> sp.	França	58	1973	"	Polonha
302	-	<i>Seraphyidae</i>	E.U.A.	28	1971	"	França
285	1983	<i>Leroopidae</i>	Polonha	70	1974	"	Tchad
294	1983	<i>Formicidae</i>	Polonha	167	1980	"	França
283	1976	<i>Symenoptera</i>	Polonha	32	1972	"	França
287	1971	<i>Heteroptera</i>	Polonha	141	1978	"	França
291	1983	"	Polonha	289	1983	"	Polonha
73	1974	-	U.R.S.S.	284	1983	<i>Araucidae</i>	Polonha
298	1971	<i>Ailacna tomasetti</i>	Polonha	303	1976	<i>Pala</i>	Polonha

QUADRO 2 - Classificação das linhagens por tipo eletroforético das α -esterases

TIPO	Nº TOTAL DE LINHAGENS	LINHAGENS	Nº DE ESPÉCIES DE HOSPEDEIROS	Nº DE PAÍSES DE ORIGEM
1	21	28;60;142;147;148;149;157;170;173;188; 191;192;195;196;199;200;220;221;231 ; 306;307	4	8
2	5	34;116;144;145;156	1	3
3	4	47;68;40;103	3	2
4	1	172	1	1
5	1	171	1	1
6	1	146	1	1
7	1	168	1	1
8	6	166;29;30;150;58,153	6	4
9	1	160	1	1
10	4	38;59;128;175	4	4
11	3	55;26;37	3	3
12	1	66	1	1
13	2	17;21	2	2
14	1	27	1	1
15	1	5	1	1
16	1	13	1	1
17	1	176	1	1
18	1	70	1	1
19	1	97	1	1
20	1	143;162	2	2
21	1	182	1	1
22	1	20	1	1
23	1	186	1	1
24	5	304;296;57;43;73	2	4
25	2	298;294	2	1
26	1	72	1	1
27	1	287	1	1
28	1	283	1	1
29	1	293	1	1
30	3	299;300;301	2	1
31	1	289	1	1
32	1	284	1	1
33	4	288;308;303;309	3	2
34	1	295	1	1
35	1	167	1	1
36	1	32	1	1
37	1	141	1	1
38	1	285	1	1
39	1	286	1	1
40	1	290	1	1
41	1	291	1	1
42	1	305	1	1
43	1	302	1	1

QUADRO 3 - Patogenicidade de linhagens de *Beauveria bassiana* com relação a lagartas do 5º estágio de *Ostrinia nubilis*.

LINHAGEM	INSETO HOSPEDEIRO	TIPO (a)	TL50 (b)	INTERVALO DE CONFIANÇA
307	<i>Ostrinia nubilis</i>	1	6,1	5,1 - 7,1
191	<i>Ostrinia nubilis</i>	1	6,7	6,3 - 7,1
147	<i>Ostrinia nubilis</i>	1	7,0	6,7 - 7,4
149	<i>Ostrinia nubilis</i>	1	7,1	6,7 - 7,5
148	<i>Ostrinia nubilis</i>	1	7,3	7,0 - 7,5
145	<i>Ostrinia nubilis</i>	2	7,5	7,2 - 7,8
199	<i>Ostrinia nubilis</i>	1	8,0	7,6 - 8,4
200	<i>Ostrinia nubilis</i>	1	8,1	7,8 - 8,4
172	<i>Ostrinia nubilis</i>	4	8,2	7,7 - 8,7
157	<i>Ostrinia nubilis</i>	1	8,2	7,9 - 8,5
170	<i>Ostrinia nubilis</i>	1	8,7	8,3 - 9,2
144	<i>Ostrinia nubilis</i>	2	8,7	8,3 - 9,1
173	<i>Ostrinia nubilis</i>	1	9,2	8,6 - 9,5
171	<i>Ostrinia nubilis</i>	5	10,6	10,1 - 11,2
156	<i>Ostrinia nubilis</i>	2	13,6	19,8 - 15,8
306	<i>Ostrinia nubilis</i>	1	- (d)	-
220	<i>Sitona sp.</i>	1	6,7	6,1 - 7,4
231	<i>Sitona sp.</i>	1	7,8	7,5 - 8,1
40	<i>Chilo suppressalis</i>	3	12,6	11,6 - 13,7
30	<i>Aphididae</i>	8	13,4	12,3 - 14,6
34	<i>Chilo suppressalis</i>	2	13,7	12,0 - 15,7
66	<i>Corpocapsa pomonella</i>	12	- (e)	-
153	<i>Apidae</i>	8	- (e)	-
160	<i>Bombyx mori</i>	9	- (e)	-
60	<i>Mamestra brassicae</i>	1	- (e)	-
182	<i>Sitona discordeus</i>	21	- (e)	-
28	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	1	- (e)	-
142	<i>Sitona lienatus</i>	1	- (e)	-
55	<i>Diatrea saccharalis</i>	11	- (e)	-
186	<i>Otiophyncus sulcatus</i>	23	- (e)	-
58	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	8	- (e)	-
175	<i>Zulia sp.</i>	10	- (e)	-
176	<i>Hoplochelus marginalis</i>	17	- (e)	-
300	<i>Curculionidae</i>	32	- (e)	-
305	<i>Curculionidae</i>	42	- (e)	-
221	<i>Sitona sp.</i>	1	- (d)	-
29	<i>Bombyx mori</i>	8	- (d)	-
17	<i>Corpocapsa pomonella</i>	13	- (d)	-
295	<i>Lymantria dispar</i>	34	- (d)	-

(a) Perfil obtido a partir das análises eletroforéticas das - esterases

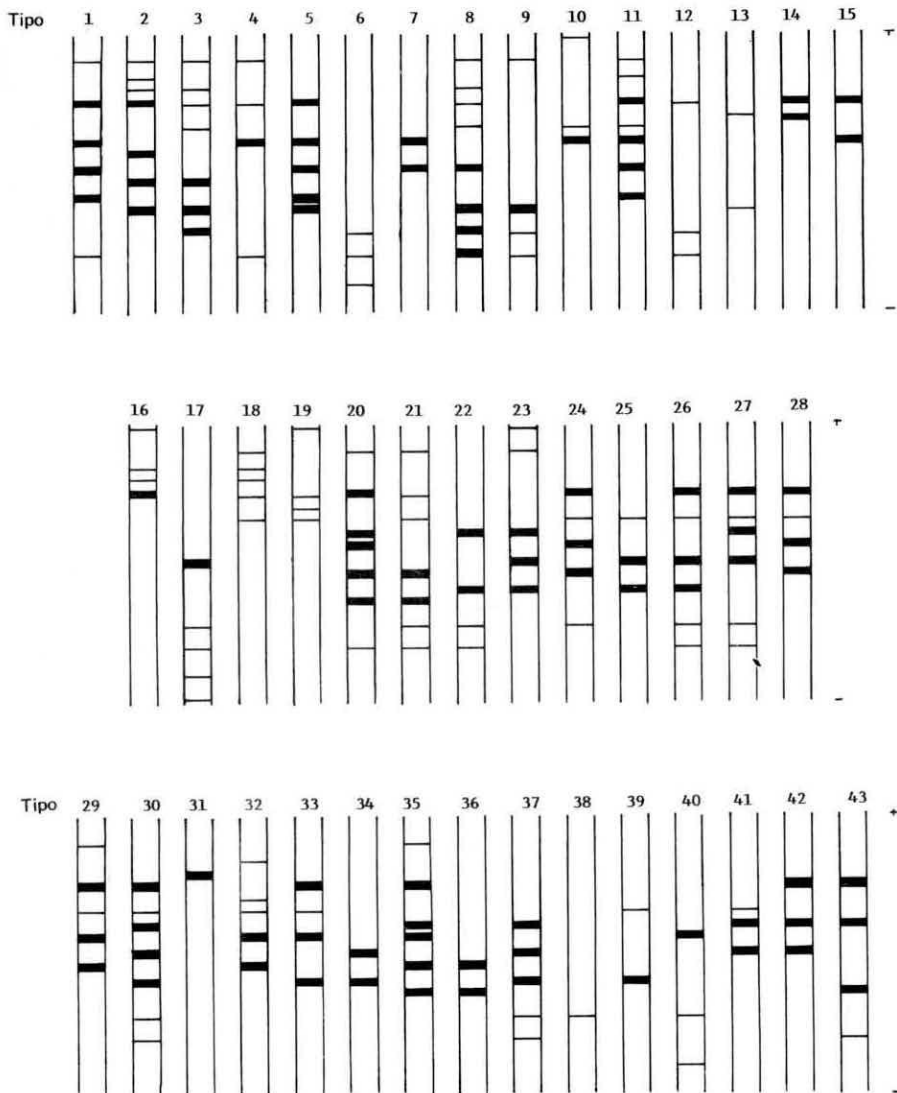
(b) Tempo letal 50% (em dias)

(c) Intervalo de confiança à 95% do TL50 (em dias)

(d) Mortalidade nula

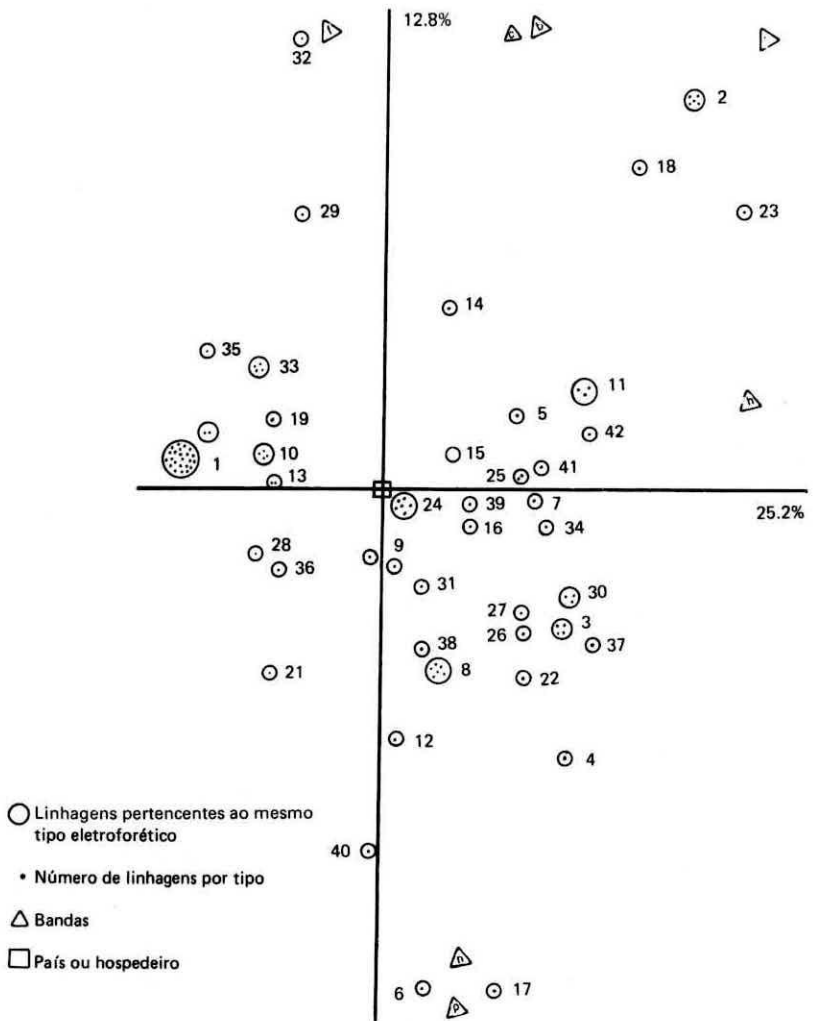
(e) Mortalidade 50% não atingida

FIGURA 1 - Representação esquemática do polimorfismo eletroforético das α -esterases para *Beauveria bassiana*.



- As bandas são representadas pelas letras.
- Os diferentes perfis eletroforéticos obtidos estão representados por um número de tipo.

FIGURA 2. Projeção do plano mais discriminatório obtido pela análise fatorial de correspondência de linhagens de *Beauveria bassiana*.



LITERATURA CITADA

- ADAMEK, L. Submerse culture of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch). *Folia Microbiol.* 10: 255-257, 1965.
- ALVES, S.B. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Ed. Manolo, 1986, 407 p.
- BOUCIAS, D.G.; MC COY, C.M.; JOSLIN, O.J. Izozyme differentiation among 17 geographical isolates of *Hirsutella thompsonii*. *J. Invertebr. Pathol.* 39: 239-237, 1982.
- CAILLIEZ, F. & PAGES, J.P. *Introduction à l'analyse des données*. Paris, Smach, 1983, 616 p.
- CATEN, C.E. Intra-racial variation in *Phytophthora infestans* and adaptation to field resistance for potato blight. *Ann. appl. Biol.* 77: 259-270, 1974.
- DE CONTI, E.; MESSIAS, C.L.; DE SOUZA, M. AZEVEDO, J.L. Electrophoretic variation in esterases and phosphatases in eleven wild-type of *Metarhizium anisopliae*. *Experientia* 26: 293-294, 1980.
- DICKSON, D.W.; HUISINGH, O.; SASSER, J.N. Dehydrogenases and alkaline phosphatase and esterases for chemotaxonomus of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera* and *Aphelenchus*. *J. Nematol.* 3: 1-16, 1971.
- FARGUES, J. *Spécificité des hyphomycètes entomopathogènes et résistance interspécifique des larves d'insectes*. Paris, Université Paris VI, 2 Vol., 1981, 244 p. (Tese de Doutorado).
- KONONOVA, E.V. Selection of commercial strains of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. In: Proceedings of project I: microbial control of insect pests; Washington, Am. Soc. Microbiol. 1978, 172-191.
- LELLOUCH, P. & LAZAR, J. *Méthodes statistiques en expérimentation biologique*. Paris. Flammarion Med. Sci, 1974, 293 p.
- RIBA. G. *Contribution à l'étude génétique de quelques hypomycètes entomopathogènes*. Paris, Université Paris VI, 1985, 261p. (Tese de Doutorado).
- RIBA. G.; BOUVIER-FOUCADE, I.; CAUDAL, A. Isoenzymes polymorphism in *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) entomogenous fungi. *Micopathologia* 96: 161-169, 1986 a.