

ISOLAT VIRULEN CENDAWAN ENTOMOPATOGEN *Lecanicillium lecanii* SEBAGAI BIOINSEKTISIDA UNTUK PENGENDALIAN TELUR KEPIK COKLAT *Riptortus linearis* (F.) PADA KEDELAI

Yusmani Prayogo¹

ABSTRAK

Lecanicillium lecanii (= *Verticillium lecanii*) (Zimm.) (Viegas) Zare dan Gams merupakan salah satu jenis cendawan entomopatogen yang efektif untuk mengendalikan kepicoklat *Riptortus linearis* pada kedelai. Kelebihan cendawan *L. lecanii* dapat menginfeksi semua stadia serangga kepicoklat, termasuk stadia telur, nimfa maupun imago. Telur kepicoklat yang terinfeksi cendawan *L. lecanii* akhirnya tidak dapat menetas karena cendawan tersebut bersifat ovisidal. *L. lecanii* bersifat kosmopolit, mudah ditemukan di berbagai daerah baik tropis maupun sub tropis sehingga mempunyai virulensi yang sangat beragam. Virulensi cendawan dipengaruhi oleh keragaman intraspecies yang memiliki perbedaan karakter fisiologi. Untuk mendapatkan isolat *L. lecanii* yang memiliki virulensi tinggi dapat eksplorasi dari berbagai sumber, yaitu dari bangkai serangga (*cadaver*), menggunakan metode pengumpulan serangga dan isolasi dari dalam tanah. Isolat *L. lecanii* yang virulen tumbuh lebih cepat, karakter koloni wholly, mampu memproduksi konidia lebih banyak, ukuran konidia lebih besar hingga mencapai 6,5 x 2,5 µm, serta memiliki daya kecambah konidia di atas 95% dalam waktu hanya 12 jam. Suhu untuk pertumbuhan vegetatif *L. lecanii* lebih luas, yaitu 20–27 °C, sedangkan suhu untuk fase generatif pada suhu 27 °C. Isolat yang virulen memiliki kesamaan karakter fisiologi yang sangat dekat dengan derajat kemiripan 98%. Dengan demikian, empat isolat yang virulen memiliki peluang yang sama untuk digunakan sebagai salah satu bioinsektisida yang prospektif dalam pengelolaan hama terpadu (PHT) untuk hama kepicoklat *R. linearis* pada stadia telur.

Kata kunci: *Lecanicillium lecanii*, karakter fisiologi, konidia, isolat, suhu, telur

ABSTRACT

Virulence isolates entomopathogenic fungi *lecanicillium lecanii* as bioinsecticide for control brown stink bug *Riptortus linearis* (F.) on soybean. *Lecanicillium lecanii* (= *Verticillium lecanii*)

(Zimm.) (Viegas) Zare dan Gams is one of the most effective entomopathogenic fungi to control brown sucking bug *Riptortus linearis* on soybean. The advantage of fungi which able infect to all insect stages included egg, nymph and adult. The egg of *R. linearis* which infected by *L. lecanii*, finally do not hatching caused the fungi has ovicidal properties. *L. lecanii* is a cosmopolite fungi which can obtained of different areas, both tropical and sub tropical therefore has high virulent diversity. The virulence of fungi is influenced by intraspecies diversity having different physiological characters. The virulent isolates can were obtained by exploration of different sources i.e; isolation on cadaver, by insect baiting and from top soil. The virulent isolates were physiologically characterized by greater growth rate than other isolates and wholly colony formed which indicated higher conidia production, size of conidia till 6,5 x 2,5 µm, and more than 95% germ tubes were formed after 12 hours of incubation in the water. Vegetative stage of all *L. lecanii* isolates grew well in a wider range of temperature between 20–27 °C as compared with generative stage which was only 27 °C. The virulent isolate *L. lecanii* have similarity in physiological character equal to 98%. Thus, four virulent isolates has the opportunity can be used a prospective bioinsecticide in integrated pest management (IPM) especially egg stage of brown sucking bug *R. linearis*.

Key words: *Lecanicillium lecanii*, physiological character, conidia, isolate, temperature, egg

PENDAHULUAN

Kepicoklat (*Riptortus linearis*) (Hemiptera: Alydidae) merupakan salah satu hama pengisap polong kedelai yang sangat penting karena mampu menyebabkan kehilangan hasil hingga mencapai 80%. Pengendalian kepicoklat hingga saat ini masih mengandalkan pestisida kimia, karena hasilnya dapat diketahui dalam waktu singkat. Pengendalian kepicoklat menggunakan insektisida kimia belum mampu mengatasi peledakan hama (*outbreak*), karena insektisida kimia hanya mampu membunuh stadia nimfa dan imago. Sedangkan stadia telur masih dapat bertahan dan berkembang lebih lanjut sehingga

¹ Peneliti Hama dan Penyakit Tanaman Balitkabi
Diterbitkan di Bul. Palawija No. 21: 39–54 (2011).

keberadaan hama tersebut di lapangan dapat berlangsung terus menerus. Oleh karena itu, pengendalian kepik coklat menggunakan insektisida kimia kurang berhasil.

Prayogo (2004) melaporkan bahwa stadia telur kepik coklat dapat diinfeksi oleh cendawan entomopatogen *Lecanicillium lecanii* (*Verticillium lecanii*) (Zimm.) (Viegas) Zare dan Gams (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Telur yang terinfeksi *L. lecanii* akhirnya tidak mampu menetas hingga mencapai 51%, karena cendawan ini mampu mematikan telur serangga (*ovicidal*). Sedangkan telur yang mampu menetas menjadi nimfa I tidak semuanya dapat berkembang lebih lanjut. Fenomena ini diduga karena cendawan sudah menginfeksi embrio di dalam telur. Laporan lain menyebutkan bahwa *L. lecanii* juga mampu menginfeksi telur *Bemisia tabaci*, *B. argentifolii*, dan *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) (Gindin *et al.* 2000; Aiuchi *et al.* 2008b). Bahkan menurut Shinya *et al.* (2007) cendawan ini sangat toksik terhadap telur nematoda *Heterodera glycines*. Kejadian tersebut disebabkan karena cendawan tersebut mampu memproduksi toksin bassianolide yang bersifat ovisidal (Soman *et al.* 2000; Blackburn *et al.* 2005). Ditinjau dari berbagai kelebihan cendawan tersebut maka *L. lecanii* prospektif untuk digunakan sebagai salah satu agens hayati dalam program pengelolaan hama terpadu (PHT) khususnya untuk stadia telur hama kepik coklat.

Menurut Anyala-Zermeno *et al.* (2005) *L. lecanii* memiliki virulensi yang sangat bervariasi. Hal ini disebabkan cendawan ini bersifat kosmopolit sehingga banyak ditemukan di daerah tropis maupun subtropis, dengan demikian terjadi keragaman isolat yang cukup tinggi (Jung *et al.* 2006; Aiuchi *et al.* 2008a). Untuk memperoleh isolat yang virulen maka langkah awal yang dapat dilakukan adalah eksplorasi dari berbagai sumber inang dan lokasi yang berbeda (Lee *et al.* 2002; Alavo *et al.* 2004; Aiuchi *et al.* 2007). Menurut Zhen-Hiang *et al.* (2005) dan Fatiha *et al.* (2007) bahwa virulensi cendawan entomopatogen dipengaruhi oleh karakter fisiologi. Karakter fisiologi cendawan berkaitan erat dengan kecepatan pertumbuhan koloni (Ibrahim *et al.* 2002; Kope *et al.* 2007), sporulasi (Grajek 2008), daya kecambah konidia (Feng *et al.* 2002; Yeo *et al.* 2003), dan toleransi terhadap perbedaan suhu (Davidson *et al.* 2003; Kope *et al.* 2008).

Di Indonesia, pemanfaatan cendawan *L. lecanii* sebagai agens pengendalian hama belum banyak dilaporkan. Dengan diperolehnya isolat *L. lecanii* yang virulen dari berbagai lokasi diharapkan pengendalian hama kepik coklat dapat diatasi sehingga kehilangan hasil kedelai dan biaya pengendalian dapat ditekan. Dengan demikian produksi kedelai dapat ditingkatkan sehingga dapat mendukung salah satu program pemerintah dalam swasembada kedelai pada tahun 2014.

METODE EKSPLORASI CENDAWAN ENTOMOPATOGEN

Cendawan entomopatogen dapat diperoleh dengan cara eksplorasi dari berbagai lokasi dengan metode yang dilakukan oleh Humber (1997 dan 1998) dan Zimmermann (1998).

a. Isolasi dari Bangkai Serangga

Bangkai serangga (*cadaver*) yang terkolonisasi cendawan dapat dikumpulkan dari berbagai lahan pertanian di lapangan. Cadaver yang sudah terkumpul dipotong-potong sebesar 0,5 cm kemudian direndam di dalam larutan hipoklorit 0,25% selama 30 detik untuk mematikan mikroba kontaminan. Masing-masing potongan cadaver direndam di dalam air steril selama 60 detik dan dikeringkan menggunakan kertas saring sebelum ditumbuhkan pada media potato dextrose agar (PDA). Untuk beberapa jenis cendawan entomopatogen yang sulit ditumbuhkan pada media tumbuh PDA maka harus dikulturkan menggunakan media selektif (Keller 1991). Pada umur tujuh hari setelah inokulasi (HSI), semua jenis koloni cendawan yang tumbuh selanjutnya dapat diidentifikasi berdasarkan karakter morfologi cendawan (Samson *et al.* 1988; Lacey 1997).

b. Sistem Pengumpanan Serangga

Isolat cendawan juga dapat diperoleh melalui metode pengumpanan serangga (*insect bait method*), yaitu dengan cara memaparkan serangga hidup pada contoh tanah yang diambil dari lahan pertanian di berbagai lokasi dan komoditas kemudian dimasukkan ke dalam cawan Petri (Anderson *et al.* 2007). Untuk mempermudah mendapatkan serangga untuk umpan dapat menggunakan ulat Hongkong, yaitu ulat yang umum dipakai sebagai pakan burung. Contoh tanah dapat diambil dari lahan tanaman

pangan, perkebunan, maupun hortikultura khususnya yang memiliki pH 3–4. Tanah dimasukkan ke dalam cawan Petri kemudian serangga untuk umpan dipaparkan ke dalam tanah kemudian dimasukkan ke dalam inkubator (suhu 20–25 °C) sampai serangga mati dan terkolonisasi cendawan. Cadaver yang terkolonisasi cendawan diisolasi kemudian diidentifikasi sesuai dengan metode di atas.

c. Isolasi dari Contoh Tanah

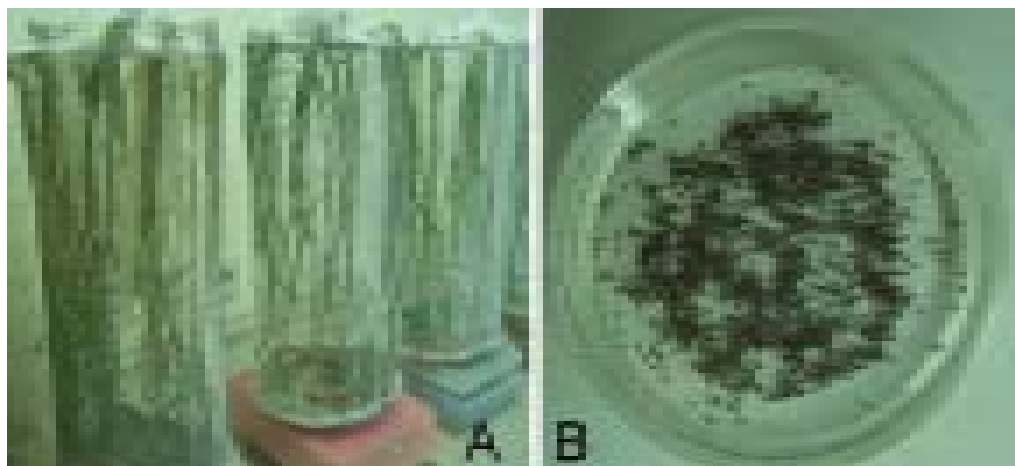
Cendawan entomopatogen yang infeksiif juga dapat diperoleh dari dalam tanah. Hal ini disebabkan karena sebagian besar cendawan merupakan mikroba yang hidup di dalam tanah. Isolasi dari tanah dilakukan dengan cara mengambil contoh tanah dari sekitar lahan tanaman pangan, perkebunan maupun hortikultura yang banyak mengandung bahan organik terutama yang memiliki pH (3–4) dengan kedalaman ±10 cm beserta sisa-sisa tanaman kemudian dicampur hingga homogen (Asensio *et al.* 2003). Contoh tanah ditimbang 1 g kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, serta ditambahkan air steril 9 ml. Tabung reaksi dikocok menggunakan vortex selama 60 detik dan suspensi yang terbentuk diambil 1 ml dengan mikro pipet kemudian dibuat seri pengenceran bertingkat hingga memperoleh seri pengenceran 10^{-4} . Hasil dari masing-masing seri pengenceran diambil 1 ml yang sebelumnya dikocok menggunakan vortex selama 30 detik kemudian diinkubasi di dalam media PDA 10 ml di dalam cawan Petri. Setelah tumbuh koloni

cendawan selanjutnya diidentifikasi berdasarkan karakter morfologi cendawan seperti kedua metode di atas.

d. Uji Efikasi untuk Memperoleh Isolat yang Virulen

Efikasi perlu dilakukan dengan tujuan untuk menyeleksi isolat cendawan yang virulen. Kegiatan ini dilakukan setelah semua isolat cendawan yang sudah diisolasi dan diidentifikasi, uji efikasi dapat diinfeksi pada beberapa jenis serangga uji. Virulensi dinilai dari jumlah serangga uji yang mati jika diinfeksi ke nimfa maupun larva serangga. Namun virulensi dinilai dari jumlah telur yang tidak menetas karena serangga yang akan dikendalikan adalah stadia telur. Oleh karena itu, perkembangbiakan serangga (*rearing*) sangat diperlukan untuk memperoleh kelompok telur (Gambar 1). Untuk memperoleh keseragaman telur yang digunakan maka telur pada generasi F2 sangat representatif untuk digunakan sebagai unit perlakuan karena serangga yang diperoleh dari lapangan masih banyak mengalami banyak cekaman lingkungan.

Masing-masing isolat cendawan yang sudah teridentifikasi selanjutnya diperbanyak pada media PDA di dalam cawan Petri. Pada umur 21 hari setelah inokulasi diambil konidianya menggunakan kuas halus yang dibasahi dengan air. Konidia dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi air steril kemudian dikocok menggunakan shaker selama 30 detik. Kerapatan konidia yang digunakan pada umumnya adalah konsentrasi



Gambar 1. Perbanyakannya serangga imago kepik coklat untuk memperoleh kelompok telur (a) dan kelompok telur kepik coklat (b).

tertinggi yang membunuh serangga inang. Jumlah serangga uji dalam setiap unit contoh harus sekitar 100 ekor atau 100 butir telur karena yang digunakan tolok ukur virulensi adalah persentase. Jumlah serangga uji kurang 100 ekor masih kurang representatif untuk uji efikasi. Cara menghitung tingkat virulensi isolat cendawan yang diuji yaitu dengan mengamati jumlah telur yang tidak menetas yang terinfeksi cendawan.

VIRULENSI ISOLAT *L. lecanii* TERHADAP TELUR KEPIK COKLAT

Virulensi isolat dapat diukur dari persentase telur kepek coklat yang tidak menetas hingga enam hari setelah aplikasi (HSA). Hasil penelitian Prayogo (2009) menunjukkan bahwa virulensi isolat dipengaruhi oleh asal isolat. Diperoleh empat isolat yang mempunyai virulensi lebih tinggi yaitu LI-JTM11, LI-JTM12, LI-JTM15, dan LI-TB2 karena persentase telur yang tidak menetas di atas 60% (Tabel 1). Seluruh isolat *L. lecanii* yang virulen terhadap telur kepek coklat diperoleh dari cadaver *S. litura*, kecuali isolat LI-JTM15 yang diperoleh dari cadaver kepek coklat. Ditinjau dari sumber isolat diperoleh ada indikasi bahwa cendawan *L. lecanii* tidak spesifik inang, dengan kata lain bahwa untuk mencari isolat yang lebih virulen dapat diperoleh dengan cara eksplorasi dari berbagai serangga lain. Menurut Trizelia (2005) bahwa virulensi isolat cendawan entomopatogen *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) yang diperoleh dari serangga yang sama dengan serangga uji juga tidak menunjukkan perbedaan virulensi dengan isolat yang diperoleh dari jenis serangga yang berbeda dengan serangga uji.

Isolat *L. lecanii* yang diperoleh dari metode pengumpulan maupun isolasi dari tanah menunjukkan virulensi lebih rendah, yaitu hanya di bawah 45% apabila dibandingkan dengan isolat yang diperoleh dari cadaver. Hal ini diduga karena isolat yang diperoleh dari tanah mengalami fase saprob dan cendawan mengalami banyak cekaman, seperti aktivitas pestisida kimia maupun senyawa metabolit bekas tanaman yang ada di permukaan tanah. Oleh karena itu, isolat *L. lecanii* yang diperoleh dari tanah maupun metode pengumpulan dianjurkan untuk diinfeksi ke serangga inang terlebih dahulu sebelum diuji agar fase patogenesis setiap isolat dapat diekspresikan. Menurut laporan Ropek dan Para (2002) bahwa

pertumbuhan *L. lecanii* yang diperoleh dari tanah dipengaruhi oleh berbagai kontaminan logam berat seperti cadmium (Cd) dan plumbum (Pb). Popowska-Nowak *et al.* (2000) juga menyatakan bahwa pertumbuhan cendawan *Paecilomyces farinosus* (Wize) Brown dan Simth (Deuteromycotina: Hyphomycetes) dipengaruhi oleh aktivitas logam berat. Sementara itu, senyawa metabolit sekunder tanaman dapat menghambat pertumbuhan cendawan *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) (Deuteromycotina: Hyphomycetes) meskipun dalam konsentrasi yang rendah, sedangkan pada konsentrasi yang tinggi dapat menyebabkan toksik (Klingen *et al.* 2002). Senyawa metabolit dari serasah berbagai tanaman khususnya dari kelompok Brassicaceae sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan cendawan *B. bassiana* meskipun cendawan tersebut sudah dikulturkan beberapa kali (Sudirman *et al.* 2008).

Hasil penelitian Prayogo (2009) mengindikasikan bahwa virulensi isolat sangat beragam tergantung dari asal isolat, serangga inang, maupun kondisi ekologi setempat. Alavo *et al.* (2004) menyatakan bahwa kisaran inang dan kondisi ekologi dapat mempengaruhi keragaman genetik yang akan berpengaruh langsung terhadap tingkat virulensi cendawan. Menurut Fatiha *et al.* (2007) perbedaan virulensi isolat *L. lecanii* dipengaruhi oleh keragaman intraspecies. Sementara itu, keragaman intraspecies dipengaruhi oleh keragaman genetik isolat *L. lecanii* (Sugimoto *et al.* 2003a dan 2003b). Keragaman genetik dapat terjadi karena mutasi, rekombinasi gen, reproduksi seksual dan parasexual, seleksi, heterokariosis, dan migrasi gen dari suatu tempat ke tempat lain (McDonald dan McDermott 1993; Dalzoto *et al.* 2003).

Isolat yang diperoleh dari serangga inang yang sama tetapi dari geografi yang berbeda atau isolat yang diperoleh dari serangga yang berbeda namun dari geografi yang sama kemungkinan memiliki virulensi yang berbeda (Fatiha *et al.* 2007). Perbedaan virulensi *L. lecanii* akibat pengaruh dari serangga inang maupun geografi isolat juga pernah dilaporkan oleh Mor *et al.* (1996). Sementara itu, Ekesi (2001) mempunyai pendapat lain bahwa perbedaan virulensi pada cendawan *M. anisopliae* dan *B. bassiana* terutama dipengaruhi oleh faktor intraspecies.

Tabel 1. Jumlah telur kepik coklat yang tidak menetas, jumlah konidia tiap telur kepik coklat yang tidak menetas dan persentase nimfa II kepik coklat hidup setelah terinfeksi *L. lecanii*.

Isolat	Asal isolat	Lokasi	Telur tidak menetas (%)	Jumlah konidia tiap telur (x10 ⁶)	Persentase nimfa II hidup (%)*
Ll-JTM1	Tanah	Banyuwangi	25 ± 11,0	2,675 ± 1,342	53 ± 5,5
Ll-JTM2	Tanah	Banyuwangi	23 ± 10,6	3,125 ± 1,142	61 ± 12,6
Ll-JTM3	Tanah	Banyuwangi	20 ± 13,0	1,775 ± 0,231	71 ± 14,0
Ll-JTM4	Tanah	Jember	21 ± 7,4	2,050 ± 0,410	63 ± 7,1
Ll-JTM5	Tanah	Jember	35 ± 5,5	1,500 ± 0,392	46 ± 9,3
Ll-JTM6	Tanah	Jember	32 ± 5,2	2,800 ± 0,744	58 ± 3,7
Ll-JTM7	Tanah	Jember	27 ± 7,6	4,225 ± 0,673	60 ± 7,4
Ll-JTM8	<i>Spodoptera litura</i>	Jember	37 ± 13,3	3,925 ± 0,945	59 ± 10,6
Ll-JTM9	<i>Spodoptera litura</i>	Jember	24 ± 5,2	2,250 ± 0,547	57 ± 7,6
Ll-JTM10	<i>Nezara viridula</i>	Lumajang	26 ± 3,7	2,150 ± 0,652	52 ± 5,2
Ll-JTM11	<i>Spodoptera litura</i>	Lumajang	75 ± 9,7	7,150 ± 1,125	18 ± 6,4
Ll-JTM12	<i>Spodoptera litura</i>	Lumajang	72 ± 11,7	7,250 ± 0,358	21 ± 5,5
Ll-JTM13	Tanah	Lumajang	44 ± 10,9	6,450 ± 0,469	53 ± 9,7
Ll-JTM14	Tanah	Probolinggo	44 ± 8,0	4,950 ± 1,157	50 ± 7,7
Ll-JTM15	<i>Riptortus linearis</i>	Probolinggo	69 ± 12,2	7,375 ± 0,929	21 ± 4,6
Ll-JTM16	<i>Spodoptera litura</i>	Probolinggo	32 ± 9,1	4,425 ± 1,028	62 ± 8,8
Ll-JTM17	<i>Trialeurodes</i> sp.	Trenggalek	30 ± 4,8	1,625 ± 0,819	53 ± 6,3
Ll-ME1	<i>Spodoptera litura</i>	Palembang	49 ± 4,6	3,000 ± 0,818	43 ± 8,7
Ll-ME2	<i>Nezara viridula</i>	Palembang	44 ± 6,0	4,550 ± 0,727	43 ± 1,8
Ll-ME3	<i>Piezodorus hybneri</i>	Palembang	37 ± 14,3	1,775 ± 0,977	53 ± 8,0
Ll-OK1	Tanah	Palembang	35 ± 7,6	2,700 ± 0,855	46 ± 13,7
Ll-OK2	Tanah	Palembang	30 ± 7,7	4,550 ± 0,746	57 ± 10,6
Ll-LT1	Tanah	Lampung	22 ± 4,8	4,400 ± 0,495	69 ± 8,2
Ll-LT2	Tanah	Lampung	21 ± 7,0	3,600 ± 0,941	66 ± 6,4
Ll-LT3	Tanah	Lampung	26 ± 7,7	2,550 ± 0,410	66 ± 15,6
Ll-TB1	<i>Spodoptera litura</i>	Lampung	19 ± 6,7	2,025 ± 0,681	71 ± 19,7
Ll-TB2	<i>Spodoptera litura</i>	Lampung	73 ± 10,6	7,825 ± 0,681	22 ± 12,3
Ll-TB3	Tanah	Lampung	27 ± 3,5	3,775 ± 0,706	61 ± 7,1
Ll-TB4	Tanah	Lampung	28 ± 10,9	3,025 ± 0,086	65 ± 14,0
Ll-TB5	Tanah	Lampung	36 ± 4,3	5,100 ± 2,338	50 ± 6,4
Ll-TB6	<i>Spodoptera litura</i>	Lampung	32 ± 11,7	4,575 ± 0,706	63 ± 6,3
Ll-NTB1	Tanah	Lombok	26 ± 8,8	1,900 ± 0,627	57 ± 4,6
Ll-NTB2	Tanah	Lombok	29 ± 9,6	2,600 ± 0,434	57 ± 8,2
Ll-NTB3	Tanah	Mataram	25 ± 8,2	3,300 ± 1,302	60 ± 3,0
Ll-NTB4	Tanah	Mataram	12 ± 5,2	1,400 ± 0,839	76 ± 10,0
Ll-NTB5	Tanah	Mataram	23 ± 6,4	2,525 ± 0,886	67 ± 9,2
Ll-NTB6	Tanah	Mataram	17 ± 6,3	2,175 ± 0,416	59 ± 12,2

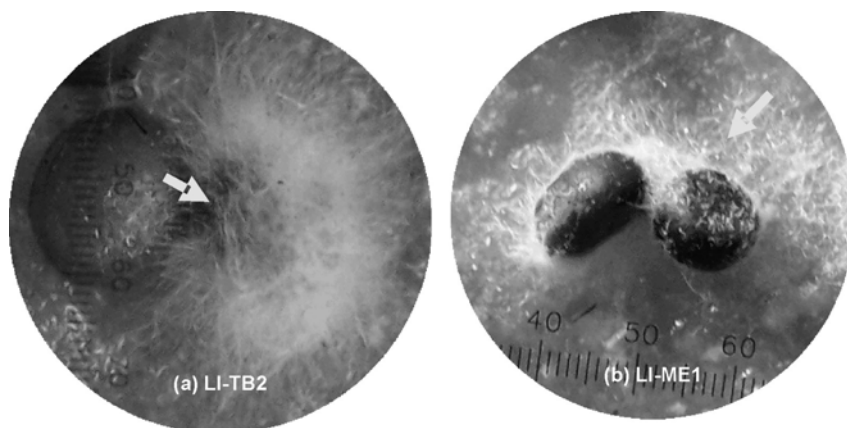
a. Jumlah Konidia pada Telur Kepik Coklat yang Tidak Menetas

Jumlah konidia yang dihasilkan dari telur kepik coklat berkaitan dengan virulensi setiap isolat yang diperoleh. Isolat cendawan *L. lecanii* yang virulen mampu memproduksi konidia lebih banyak dibandingkan dengan isolat yang kurang virulen. Hasil eksplorasi Prayogo (2009) mengindikasikan bahwa asal isolat berpengaruh terhadap jumlah konidia yang terbentuk pada tiap telur kepik coklat yang tidak menetas (Tabel 1). Jumlah konidia yang terbanyak hingga mencapai $7,825 \times 10^6$ /telur kepik coklat yang tidak menetas. Sementara itu, produksi konidia pada isolat yang kurang virulen sangat rendah, yaitu hanya berkisar $1-5,1 \times 10^6$ /telur.

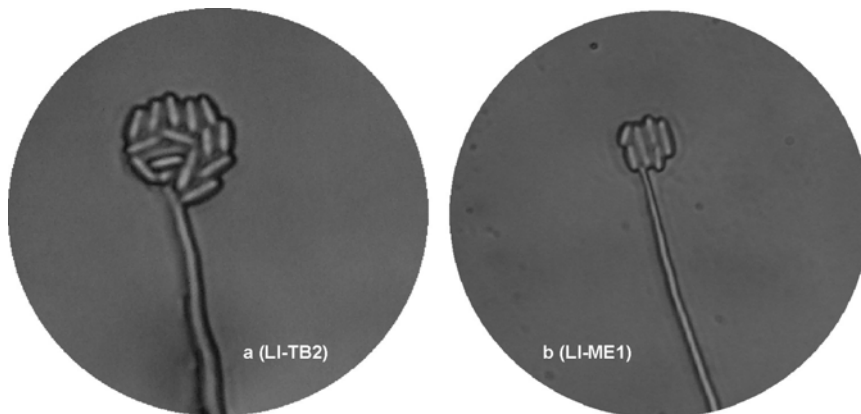
Pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa karakter isolat yang virulen ditandai dengan per-

tumbuhan dan kolonisasi miselium pada telur lebih cepat dan lebih tebal dibandingkan dengan isolat yang kurang virulen (Gambar 2). Hasil temuan Geden *et al.* (1995) bahwa pertumbuhan isolat *B. bassiana* yang virulen pada serangga lalat rumah *Musca domestica* lebih cepat, struktur miselium lebih padat, dan konidia yang dihasilkan lebih banyak. Sementara itu, isolat yang kurang virulen tumbuh lebih lambat, miselium lebih tipis, dan jumlah konidia yang dihasilkan lebih sedikit.

Karakter lain yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi isolat *L. lecanii* yang virulen adalah pada organ konidiofor cendawan yang ditandai dengan produksi konidia lebih banyak dibandingkan dengan isolat yang kurang virulen (Gambar 3). Hasil penelitian Kamp dan Bidochka (2002) menunjukkan bahwa isolat yang virulen memiliki karakter kolonisasi lebih cepat, miselium



Gambar 2. Kolonisasi miselium isolat *L. lecanii* yang virulen (a) dan isolat yang kurang virulen (b) pada telur kepik coklat tujuh hari setelah aplikasi (HSA).



Gambar 3. Perbedaan jumlah konidia *L. lecanii* yang diproduksi oleh setiap tangkai konidiofor pada isolat yang virulen (a) dan isolat yang kurang virulen (b).

yang terbentuk lebih tebal dan padat serta produksi konidia lebih banyak pada setiap tangkai konidiofornya. Namun, Drummond *et al.* (1987) berpendapat lain bahwa tidak ada korelasi yang jelas antara jumlah dan ukuran konidia terhadap virulensi *L. lecanii* yang menginfeksi serangga *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). Hal ini disebabkan jumlah isolat yang diuji lebih sedikit sehingga akan mempengaruhi tingkat keragaman isolat yang diperoleh.

Kemampuan cendawan entomopatogen untuk memproduksi konidia mempunyai arti yang sangat penting karena konidia merupakan propagul infeksi bagi cendawan tersebut yang berperan utama sebagai organ untuk pemencaran dan proses infeksi untuk menimbulkan epizooti (Chun dan Mingguang 2004; Lerche *et al.* 2004). Isolat yang mampu memproduksi konidia lebih banyak akan lebih cepat pemencarannya (Lerche *et al.* 2004). Dengan demikian, akan lebih menguntungkan karena isolat tersebut mampu menimbulkan epizooti dalam waktu yang lebih pendek sehingga lebih efektif sebagai agens bioinsektisida untuk pengendalian hama (Ganga-Visalakshy *et al.* 2004).

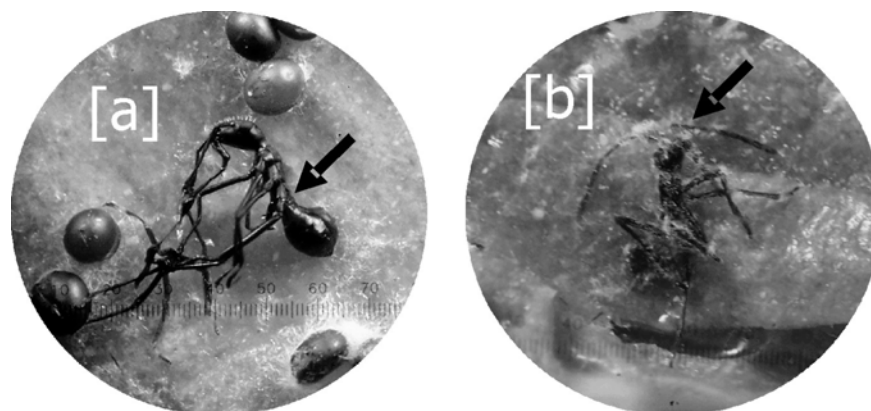
b. Infeksi *L. lecanii* pada Telur dan Pengaruhnya terhadap Nimfa Kepik Coklat

Telur kepik coklat yang terinfeksi cendawan *L. lecanii* secara tidak langsung akan berpengaruh terhadap kelangsungan hidup nimfa yang akan berkembang menjadi serangga dewasa. Cendawan entomopatogen yang menginfeksi serangga pada stadia telur, sebagian besar nimfa yang akan

terbentuk tidak dapat berkembang lebih lanjut karena embrio di dalam telur telah terinfeksi cendawan meskipun akhirnya telur masih mempunyai peluang menetas. Fenomena tersebut tampak dari isolat *L. lecanii* yang virulen, yaitu Ll-JTM11, Ll-JTM12, Ll-JTM15 dan Ll-TB2 mampu menekan perkembangan nimfa yang akan berkembang menjadi serangga dewasa hanya sebesar 22% (Tabel 1).

Hasil penelitian Prayogo (2009) menunjukkan bahwa nimfa kepik coklat yang berkembang dari telur yang telah terinfeksi *L. lecanii*, tidak dapat berkembang menjadi nimfa II karena serangga tidak dapat berganti kulit dan akhirnya mati (Gambar 4). Begitu juga terjadi pada telur *B. argentifolii* yang terinfeksi *L. lecanii* peluang menetas dan berkembang menjadi nimfa II sangat kecil (Hoddle 1999). Ditinjau dari kemampuan *L. lecanii* dalam menginfeksi telur kepik coklat dan dampaknya terhadap peluang kelangsungan hidup serangga lebih lanjut sangat rendah, maka pengendalian kepik coklat menggunakan cendawan *L. lecanii* pada stadia telur lebih menguntungkan. Hal ini disebabkan karena perkembangan serangga tertekan lebih awal sehingga peluang serangga yang akan hidup menjadi terbatas, dengan demikian peluang peledakan kepik coklat menjadi lebih rendah.

Gindin *et al.* (2000) menegaskan bahwa *L. lecanii* yang mengkolonisasi telur *B. tabaci* sekaligus juga menginfeksi jaringan embrio, sehingga nimfa yang terbentuk akan mati. Kejadian ini juga pernah dilaporkan oleh del-Prado *et al.* (2008) bahwa telur kutu kapuk kelapa *Aleu-*



Gambar 4. Nimfa I kepik coklat yang gagal *moulting* menjadi nimfa II (a) dan nimfa I mati setelah terinfeksi *L. lecanii* pada isolat yang virulen (b).

rodicus coccis Curtis. (Homoptera: Aleyrodidae) yang terinfeksi *L. lecanii* tidak menetas mencapai 83%. Meskipun telur berhasil menetas akan tetapi tidak mempunyai peluang berkembang menjadi serangga dewasa karena nimfa yang terbentuk telah terinfeksi cendawan.

c. Ukuran Konidia Isolat *L. lecanii* yang Virulen

Semakin besar ukuran konidia *L. lecanii* semakin virulen. Namun tidak semua isolat yang memiliki ukuran konidia lebih besar memiliki virulensi lebih tinggi. Hasil penelitian Prayogo (2009) menunjukkan bahwa ukuran konidia *L. lecanii* sangat bervariasi mulai dari (3,5 x 1,2) – (6,5 x 2,5) µm (Tabel 2). Isolat *L. lecanii* yang memiliki ukuran konidia lebih besar hingga mencapai 6,5 x 2,5 µm memiliki virulensi lebih tinggi dibandingkan dengan isolat yang ukuran konidianya lebih kecil (Gambar 5a). Isolat L1-JTM16 meskipun ukuran konidianya lebih besar namun kurang virulen, diduga disebabkan oleh periode waktu kecambah konidia relatif lebih lambat hingga mencapai 18 jam setelah inkubasi (JSI). Selain itu, isolat tersebut juga diperoleh dari metode isolasi pengumpulan serangga. Hasil uji virulensi mengindikasikan bahwa isolat yang memiliki virulensi tinggi hanya diperoleh dari metode isolasi cadaver.

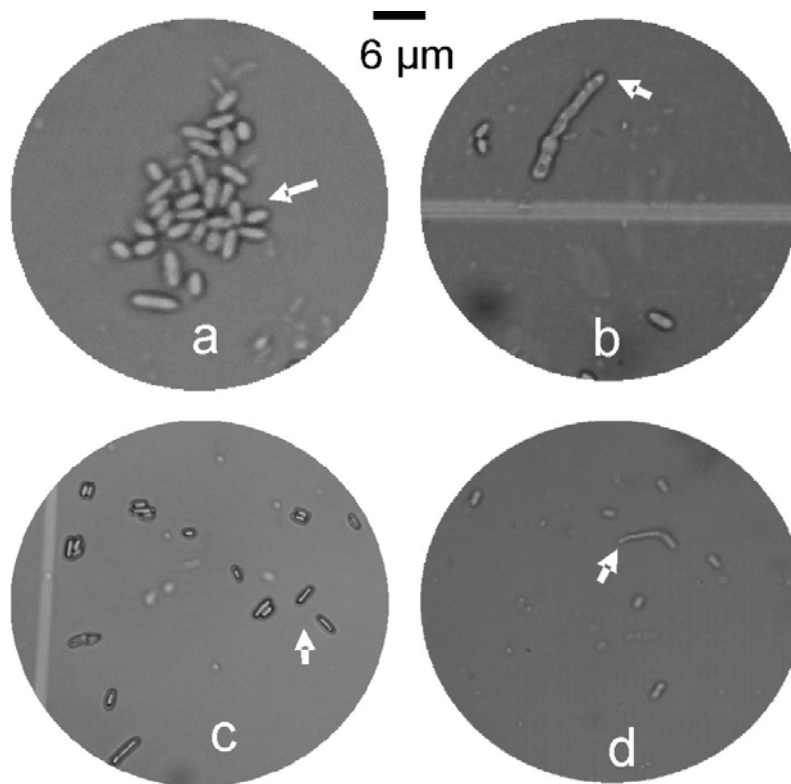
Menurut Humber (1998) ukuran konidia *L. lecanii* bervariasi mulai 2,5–10 x 1–2,5 µm, sedang Olivares-Bernabeu dan Lopez Llorca (2002) menyatakan bahwa ukuran konidia *L. lecanii* adalah 1,6 x 4,8 µm. Ukuran konidia *L. lecanii* hasil temuan Vu *et al.* (2007) berkaitan erat dengan tingkat perkecambahan dan virulensi cendawan. Fenomena ini terbukti dari kandungan dan aktivitas enzim amilase dan kitinase yang tinggi pada isolat-isolat *L. lecanii* yang virulen. Oleh karena itu, semakin besar ukuran konidia semakin banyak kandungan enzim yang terdapat pada konidia tersebut sehingga efikasi konidia semakin tinggi dalam membunuh serangga inang dalam waktu yang relatif lebih pendek.

Tabung kecambah yang terbentuk pada isolat-isolat yang virulen juga lebih besar dan lebih panjang (Gambar 5b) dibandingkan dengan isolat yang berindikasi kurang virulen (Gambar 5c dan 5d). Tabung kecambah yang terbentuk akan berkembang membentuk apresorium yang berfungsi untuk menempelkan organ infektif pada permu-

Tabel 2. Ukuran dan daya kecambah konidia *L. lecanii* setelah diinkubasi di dalam air selama 10 jam, serta periode waktu kecambah konidia hingga 95%.

Isolat	Ukuran konidia (µm)	Konidia yang berkecambah setelah 10 jam diinkubasi (%)	Periode waktu kecambah konidia 95% (JSI)*
L1-JTM1	3,5 x 1,3	82,3 ± 0,1	19,3 ± 0,3
L1-JTM2	3,5 x 1,3	83,5 ± 1,2	19,3 ± 0,5
L1-JTM3	3,5 x 1,3	80,1 ± 0,8	15,3 ± 0,8
L1-JTM4	3,5 x 1,3	83,3 ± 0,3	16,3 ± 0,8
L1-JTM5	5,3 x 2,0	80,5 ± 1,1	18,0 ± 0,3
L1-JTM6	5,3 x 2,0	84,8 ± 1,3	19,0 ± 0,6
L1-JTM7	3,5 x 1,3	83,8 ± 1,4	19,3 ± 0,5
L1-JTM8	5,3 x 2,0	80,1 ± 2,2	17,3 ± 0,5
L1-JTM9	5,3 x 2,0	80,3 ± 2,0	19,0 ± 0,3
L1-JTM10	5,3 x 2,0	80,7 ± 0,9	19,0 ± 0,3
L1-JTM11	6,5 x 2,5	86,0 ± 1,7	12,3 ± 0,0
L1-JTM12	6,5 x 2,5	85,5 ± 0,3	12,3 ± 0,3
L1-JTM13	6,5 x 2,5	80,5 ± 2,1	13,3 ± 1,1
L1-JTM14	6,5 x 2,5	81,1 ± 1,6	13,3 ± 0,5
L1-JTM15	6,5 x 2,5	84,8 ± 0,9	13,0 ± 0,3
L1-JTM16	6,5 x 2,5	81,9 ± 0,5	18,0 ± 0,3
L1-JTM17	5,3 x 2,0	81,9 ± 2,0	18,0 ± 0,3
L1-ME1	5,3 x 2,0	80,9 ± 4,3	13,3 ± 0,3
L1-ME2	6,5 x 2,5	81,3 ± 1,3	17,0 ± 0,0
L1-ME3	5,3 x 2,0	81,4 ± 3,0	17,3 ± 0,6
L1-OK1	5,3 x 2,0	82,7 ± 1,6	18,0 ± 0,3
L1-OK2	5,3 x 2,0	81,9 ± 2,2	19,0 ± 0,3
L1-LT1	3,5 x 1,2	80,9 ± 2,2	18,3 ± 0,9
L1-LT2	3,5 x 1,3	81,1 ± 1,9	19,3 ± 0,9
L1-LT3	3,5 x 1,3	80,8 ± 2,8	19,0 ± 0,6
L1-TB1	5,3 x 2,0	82,3 ± 1,6	20,0 ± 0,3
L1-TB2	6,5 x 2,5	84,6 ± 0,4	12,3 ± 0,0
L1-TB3	3,5 x 1,3	81,8 ± 1,2	19,0 ± 0,6
L1-TB4	3,5 x 1,3	81,4 ± 2,6	18,3 ± 0,6
L1-TB5	3,5 x 1,3	80,2 ± 1,9	17,3 ± 0,6
L1-TB6	3,5 x 1,3	81,7 ± 2,3	18,0 ± 0,6
L1-NTB1	3,5 x 1,2	80,9 ± 1,5	19,0 ± 0,3
L1-NTB2	3,5 x 1,2	83,5 ± 0,7	19,0 ± 0,3
L1-NTB3	3,5 x 1,2	81,3 ± 2,3	19,0 ± 0,6
L1-NTB4	3,5 x 1,3	82,2 ± 1,4	20,0 ± 0,3
L1-NTB5	3,5 x 1,3	82,2 ± 2,8	18,3 ± 0,6
L1-NTB6	3,5 x 1,2	81,7 ± 3,1	20,0 ± 0,3

kaan inang. Diduga semakin cepat tabung kecambah terbentuk dan semakin besar ukurannya akan semakin besar pula peluang inang dapat dipenetrasi oleh cendawan karena permukaan inang lebih cepat dihidrolisis oleh enzim yang dihasilkan oleh cendawan.



Gambar 5. Ukuran konidia dan tabung kecambah *L. lecanii* yang terbentuk pada isolat yang virulen (a & b) isolat yang kurang virulen (c & d).

d. Daya Kecambah dan Periode Waktu Kecambah Konidia *L. lecanii*

Daya kecambah konidia dapat digunakan sebagai tolok ukur untuk menseleksi cendawan. Semakin cepat daya kecambah semakin virulen isolat cendawan yang diperoleh. Hasil Penelitian Prayogo (2009) menunjukkan bahwa isolat yang virulen memiliki daya kecambah di atas 80% setelah diinkubasi di dalam air selama 10 jam (Tabel 2). Empat isolat yang bersifat ovisidal yang menggagalkan penetasan telur kepik coklat memiliki daya kecambah tertinggi dibandingkan dengan isolat yang lain, masing-masing adalah 86% untuk LI-JTM11, 85% untuk LI-JTM12, dan 84% untuk LI-JTM15 maupun LI-JTMTB2. Daya kecambah mengekspresikan kemampuan konidia yang dapat tumbuh dan berkembang apabila faktor lingkungan mendukung. Daya kecambah konidia mempunyai peran yang cukup besar bagi keberhasilan konidia dalam proses penetrasi dan infeksi ke serangga inang (Sitch dan Jackson 1997; Alavo *et al.* 2002). Semakin tinggi daya kecambah konidia maka semakin besar pula

peluang agens hayati tersebut dapat menginfeksi serangga inang sehingga kolonisasi dan proses epizooti di lapangan semakin cepat terjadi (Wagner dan Lewis 2000; Lewis *et al.* 2000). Oleh karena itu, daya kecambah konidia sebagai karakter fisiologi cendawan perlu diprioritaskan sebagai salah satu kriteria dalam seleksi agens hayati (Fatiha *et al.* 2007).

Menurut Kassa (2003), Luz dan Fargues (2004) daya kecambah konidia cendawan entomopatogen yang digunakan sebagai agens hayati minimal harus 80%. Sedangkan Liu *et al.* (2003) menyarankan agar daya kecambah konidia cendawan yang akan digunakan sebagai agens hayati harus di atas 90%. Sementara itu, Samuels dan Coracini (2004) menegaskan bahwa proses infeksi akan mencapai optimal apabila daya kecambah konidia isolat yang digunakan mencapai 99%. Namun demikian, periode waktu yang dibutuhkan konidia untuk berkecambah di dalam air pada beberapa hasil penelitian tersebut di atas lebih dari 18 jam setelah diinkubasi. Bahkan Trizelia (2005) melaporkan bahwa daya kecam-

bah cendawan *B. bassiana* hingga mencapai 24 jam. Daya kecambah diduga dipengaruhi oleh strain dan jenis cendawan. Hal ini disebabkan setiap isolat memiliki kebutuhan nutrisi yang berbeda. Selain itu, ukuran konidia juga ada pengaruhnya terhadap kecepatan perkecambahan, semakin besar ukuran konidia semakin cepat waktu yang dibutuhkan konidia untuk berkecambah.

Tidak semua isolat yang membutuhkan waktu kecambah lebih pendek memiliki virulensi lebih tinggi. Fenomena tersebut terjadi pada isolat Ll-JTM13, Ll-JTM14, dan Ll-ME1 yang ketiganya hanya membutuhkan waktu 13,30 jam. Jumlah telur yang tidak menetas pada isolat tersebut masing-masing 44–49% (Tabel 1). Telur yang tidak menetas pada ketiga isolat tersebut lebih rendah dibandingkan dengan keempat isolat yang memiliki virulensi tertinggi, yaitu Ll-JTM11, Ll-JTM12, Ll-JTM15, dan Ll-TB2. Semakin lama periode waktu berkecambah maka semakin rendah peluang agens hayati tersebut untuk dapat menginfeksi serangga inang. Hal ini disebabkan konidia sebagai inokulum akan terpapar di alam terbuka lebih lama. Sementara itu, apabila kondisi suhu dan kelembaban kurang mendukung maka konidia akan mengalami kekeringan sehingga akhirnya mati sebelum menemukan inang (Barbosa *et al.* 2002; Lazzarini *et al.* 2006). Menurut Devi *et al.* (2005) perkecambahan konidia sangat dipengaruhi oleh suhu, kelembaban, nutrisi, dan jenis isolat. Hal ini disebabkan setiap jenis isolat cendawan entomopatogen membutuhkan kebutuhan nutrisi yang berbeda-beda (Safavi *et al.* 2007). Dengan demikian, daya kecambah dan periode waktu berkecambah sangat berperan dalam menentukan virulensi cendawan.

e. Toleransi *L. lecanii* terhadap Suhu

Suhu juga dapat digunakan sebagai tolok ukur dalam menyeleksi isolat cendawan yang virulen. Isolat yang virulen umumnya memiliki toleransi yang lebih tinggi terhadap suhu dibandingkan dengan isolat yang kurang virulen karena isolat yang virulen biasanya tahan terhadap paparan faktor lingkungan. Cendawan *L. lecanii* tumbuh pada suhu antara 20 °C sampai dengan 30 °C (Tabel 3). Pertumbuhan koloni cendawan semakin baik dengan semakin meningkatnya suhu, namun pada kondisi suhu di atas 30 °C pertumbuhan cendawan mengalami penurunan. Bahkan pada suhu

32 °C, pertumbuhan cendawan mengalami stagnasi dan tidak berkembang. Dari 37 isolat *L. lecanii* yang berhasil diidentifikasi Prayogo (2009) tidak memperoleh satu isolat yang benar-benar toleran terhadap suhu tinggi yaitu di atas 30 °C. Fenomena tersebut juga yang pernah dilaporkan Vu *et al.* (2007) bahwa 40 isolat *L. lecanii* yang berhasil diisolasi, namun tidak diperoleh satu isolat yang benar-benar mampu bertahan pada suhu 32 °C. Lee *et al.* (2006) juga melaporkan bahwa untuk mendapatkan isolat *L. lecanii* yang toleran terhadap suhu tinggi dan lebih virulen sulit diperoleh sehingga apabila waktu aplikasi di lahan yang kering, dianjurkan memakai bahan pelindung (*UV protectant*).

Yeo *et al.* (2003) menjelaskan bahwa kerentanan isolat cendawan terhadap suhu sangat ditentukan oleh strain isolat. Begitu juga Lopez-Llorca dan Carbonell (1999) menegaskan bahwa kerentanan *L. lecanii* terhadap suhu ditentukan oleh karakter isolat cendawan. Karakter isolat yang toleran terhadap suhu tinggi mengindikasikan terbentuknya struktur dinding konidia yang lebih tebal dibandingkan dengan isolat yang kurang toleran (Parker *et al.* 2003; Sugimoto *et al.* 2003b).

f. Jumlah Konidia *L. lecanii* yang Virulen

Suhu berpengaruh terhadap pembentukan konidia pada setiap isolat cendawan. Jumlah konidia berkaitan dengan laju pertumbuhan cendawan, semakin cepat pertumbuhan semakin banyak jumlah konidia yang terbentuk. Isolat *L. lecanii* yang diperoleh Prayogo (2009) mengindikasikan bahwa pertumbuhan dan pembentukan konidia cendawan optimal terjadi pada suhu 27 °C, sedangkan pada suhu yang lebih tinggi jumlah konidia lebih rendah karena pertumbuhan cendawan mengalami stagnasi. Suhu cukup berperan terhadap produksi konidia *L. lecanii* (Aiuchi *et al.* 2008b).

Yeo *et al.* (2003) melaporkan bahwa pertumbuhan dan pembentukan konidia *L. lecanii* yang optimal terjadi pada suhu 25–27 °C dibandingkan dengan suhu yang lebih rendah antara 10–15 °C maupun suhu yang lebih tinggi (30–32 °C). Pernyataan yang sama juga disampaikan Kope *et al.* (2008) bahwa pertumbuhan dan pembentukan konidia *L. lecanii* optimal juga terjadi pada suhu antara 25–27 °C. Sementara itu selain faktor suhu, pembentukan konidia berkaitan dengan

Tabel 3. Diameter koloni berbagai jenis isolat *L. lecanii* pada berbagai tingkat suhu.

Isolat	Diameter koloni berbagai isolat <i>L. lecanii</i> pada umur 21 HSI (mm)				
	20 °C	25 °C	27 °C	30 °C	32 °C
Ll-JTM1	56,7	58,0	58,7	19,3	12,0
Ll-JTM2	55,0	55,7	56,0	18,0	11,7
Ll-JTM3	53,3	54,7	54,7	17,3	12,7
Ll-JTM4	59,0	59,3	60,0	19,7	13,3
Ll-JTM5	55,7	56,7	57,3	18,0	13,3
Ll-JTM6	50,0	50,7	52,0	17,0	12,7
Ll-JTM7	53,7	54,3	54,7	17,3	11,3
Ll-JTM8	56,3	56,7	58,0	20,3	12,7
Ll-JTM9	51,7	52,3	53,7	16,0	12,0
Ll-JTM10	51,7	52,0	53,3	21,0	12,0
Ll-JTM11	61,3	62,7	63,0	22,0	13,0
Ll-JTM12	57,3	60,3	63,7	21,3	13,0
Ll-JTM13	47,0	49,0	50,7	19,3	11,7
Ll-JTM14	52,7	54,0	54,5	21,3	11,3
Ll-JTM15	54,3	59,7	61,3	21,3	12,0
Ll-JTM16	53,7	54,7	55,7	20,0	11,3
Ll-JTM17	60,0	60,0	63,7	21,0	11,3
Ll-ME1	54,7	55,3	56,0	22,7	11,3
Ll-ME2	53,7	54,3	56,3	20,3	12,7
Ll-ME3	60,0	60,0	61,0	20,3	11,3
Ll-OK1	57,0	57,3	59,0	21,7	12,3
Ll-OK2	58,3	59,0	59,3	22,0	11,3
Ll-LT1	54,3	55,0	57,7	21,7	11,3
Ll-LT2	56,0	56,7	56,0	21,7	11,0
Ll-LT3	56,7	57,0	56,7	21,0	11,0
Ll-TB1	54,7	55,3	55,7	20,7	11,0
Ll-TB2	57,7	59,3	64,3	22,3	12,7
Ll-TB3	55,3	55,7	56,7	21,7	12,0
Ll-TB4	42,0	45,0	45,0	24,7	11,0
Ll-TB5	60,0	60,0	55,3	19,3	13,7
Ll-TB6	57,7	58,7	50,3	20,0	13,0
Ll-NTB1	48,3	49,3	50,0	18,3	11,7
Ll-NTB2	59,7	51,0	50,7	20,7	12,0
Ll-NTB3	54,0	54,3	55,0	20,7	12,3
Ll-NTB4	55,0	56,3	57,0	20,3	12,0
Ll-NTB5	53,7	54,3	55,3	20,3	11,3
Ll-NTB6	55,0	56,7	58,0	21,3	13,0

kandungan C/N ratio yang terdapat pada media tumbuh (Sun dan Liu 2006). Kamp dan Bidochka (2002) menambahkan bahwa ketebalan media tumbuh yang digunakan untuk seleksi juga mempunyai peran yang cukup penting dalam menentukan jumlah konidia yang dihasilkan selain faktor suhu.

g. Karakter Koloni *L. lecanii* yang Virulen

Koloni cendawan entomopatogen memiliki

beberapa karakter yaitu; (1) *cottony* (hifa agak panjang dan menyebar ke segala arah), (2) *velvety* (hifa pendek, lurus, dan tebal), (3) *wholly* (hifa atau kelompok hifa agak panjang, koloni tumbuh menebal, merata, dan berbentuk seperti wol), (4) *plumose* (tumpukan miselium dengan hifa panjang dan kelompok hifa muncul dari tengah berbentuk kipas), (5) *farinaceous* (bentuk koloni seperti tepung), dan (6) *pellicular* (koloni tipis saling berhubungan dengan garis konsen-

tris) (Tabel 4). Isolat *L. lecanii* yang yang virulen menurut Prayogo (2009) memiliki karakter koloni berbentuk wholly, yaitu seperti; JTM11, Ll-JTM12, Ll-JTM15, dan Ll-TB2. Namun tidak semua isolat cendawan yang berkarakter wholly memiliki sifat yang virulen, yaitu pada isolat Ll-Ll-JTM13, Ll-JTM16, Ll-JTM17, Ll-ME1, Ll-LT1, Ll-LT2, Ll-TB3, Ll-TB4, Ll-TB5, dan Ll-TB6 (Gambar 6a). Sementara itu, isolat yang membentuk karakter velvety (Gambar 6f), plumose (Gambar 6e), pellicular (Gambar 6b) dan farina-ceous (Gambar 6d) adalah kurang virulen.

Karakter koloni berhubungan dengan karakter fisiologi yang lain seperti virulensi, produksi koni-

Tabel 4. Jumlah konidia yang diproduksi oleh berbagai isolat *L. lecanii* pada berbagai tingkat suhu.

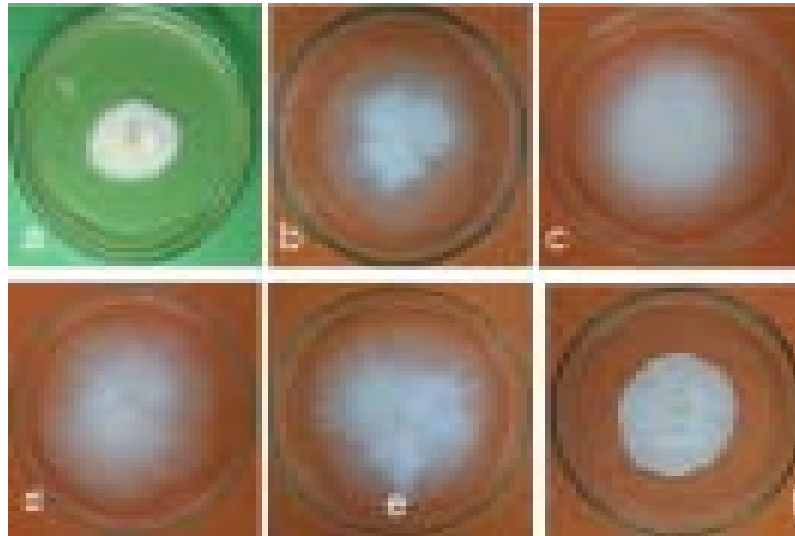
Isolat	Jumlah konidia tiap g biakan isolat <i>L. lecanii</i> (x106/ml)				
	20 °C	25 °C	27 °C	30 °C	32 °C
Ll-JTM1	4,0	5,4	42,7	2,2	0,00134
Ll-JTM2	12,5	13,2	33,3	6,9	0,00267
Ll-JTM3	8,7	10,4	31,3	5,8	0,00534
Ll-JTM4	8,8	10,3	20,7	6,4	0,01070
Ll-JTM5	9,5	10,8	33,3	7,1	0,01600
Ll-JTM6	6,8	7,8	21,3	4,8	0,02000
Ll-JTM7	8,1	9,6	14,0	7,2	0,00134
Ll-JTM8	10,4	10,7	37,3	7,5	0,03400
Ll-JTM9	10,9	11,7	42,7	6,8	0,00540
Ll-JTM10	6,4	8,1	21,3	7,4	0,00400
Ll-JTM11	27,0	28,9	192,2	14,1	0,01600
Ll-JTM12	24,7	28,5	213,3	10,6	0,04400
Ll-JTM13	9,2	11,0	64,0	8,8	0,00200
Ll-JTM14	16,0	17,0	42,7	9,2	0,00670
Ll-JTM15	17,2	22,5	256,1	12,3	0,01600
Ll-JTM16	10,6	12,0	33,3	9,9	0,00670
Ll-JTM17	12,5	14,0	42,7	12,4	0,00130
Ll-ME1	19,2	19,9	42,7	11,5	0,00400
Ll-ME2	5,1	6,7	17,3	6,2	0,00400
Ll-ME3	11,0	11,8	13,3	4,4	0,00400
Ll-OK1	10,9	12,3	17,3	7,4	0,00267
Ll-OK2	6,9	10,4	14,7	5,8	0,00670
Ll-LT1	13,8	15,4	21,3	8,6	0,00267
Ll-LT2	10,5	13,0	9,3	8,5	0,00267
Ll-LT3	7,1	9,7	14,1	5,6	0,00134
Ll-TB1	10,7	12,6	21,3	8,1	0,00200
Ll-TB2	25,6	27,7	234,7	19,2	0,04400
Ll-TB3	9,6	11,5	21,3	8,4	0,00267
Ll-TB4	10,7	12,1	21,3	10,0	0,03730
Ll-TB5	9,0	10,1	50,7	6,5	0,04133
Ll-TB6	11,2	13,0	21,3	10,1	0,00400
Ll-NTB1	7,1	8,6	14,7	5,9	0,00400
Ll-NTB2	5,5	7,7	12,1	4,2	0,00400
Ll-NTB3	10,5	11,2	29,3	6,3	0,00134
Ll-NTB4	7,2	8,6	21,3	6,1	0,00400
Ll-NTB5	7,6	8,3	14,1	3,7	0,01600
Ll-NTB6	9,6	11,3	25,3	7,3	0,01070

dia, dan periode waktu kecambah konidia. Isolat *L. lecanii* yang mempunyai karakter koloni wholly terutama pada isolat Ll-JTM11, Ll-JTM12, Ll-JTM15, dan Ll-TB2 umumnya memiliki virulensi lebih tinggi, mampu memproduksi konidia lebih banyak, dan daya kecambah konidia hanya membutuhkan waktu yang relatif lebih singkat. Isolat yang memiliki karakter koloni wholly namun kurang virulen disebabkan periode waktu kecambahnya juga relatif lebih lama dibanding isolat yang lebih virulen. Jumlah konidia yang dihasilkan pada isolat yang memiliki karakter wholly relatif lebih banyak dibandingkan dengan isolat yang kurang virulen. Isolat *L. lecanii* yang memiliki karakter koloni wholly namun kurang virulen, disebabkan periode waktu kecambah konidia membutuhkan rentang waktu yang relatif lama, yaitu hingga 18 jam seperti pada isolat Ll-JTM16, Ll-JTM17, Ll-LT1, Ll-TB3, Ll-TB4, Ll-TB5, dan Ll-TB6. Dengan keterlambatan konidia dalam membentuk tabung kecambah maka konidia yang menempel pada korion telur berpeluang besar mengalami kekeringan akibat kelembaban yang kurang mendukung sehingga konidia gagal melakukan infeksi.

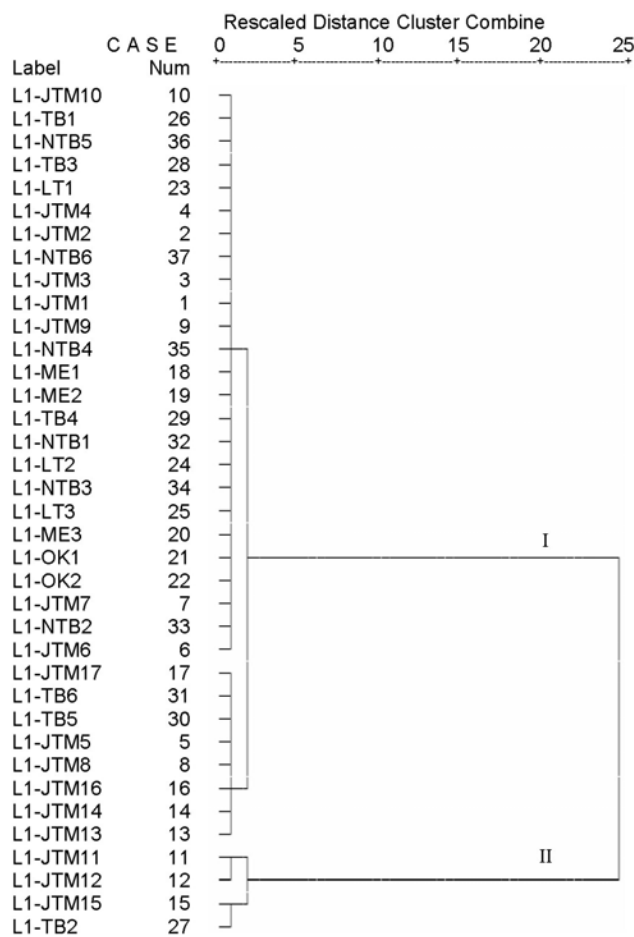
Karakter koloni dapat digunakan sebagai salah satu tolok ukur potensi dari agens hayati dalam seleksi isolat cendawan entomopatogen yang virulen. Menurut Feng *et al.* (2000) isolat *L. lecanii* yang mempunyai tekstur koloni tebal, padat, dan kompak yang membentuk wol maka konidia yang diproduksi lebih mudah dipanen dari permukaan media dengan jumlah inokulum yang lebih banyak sehingga waktu yang dibutuhkan untuk perbanyakannya hanya sedikit. Selain itu, cendawan tersebut lebih mampu bersaing dengan mikroorganisme lainnya dan di lapangan isolat tersebut lebih cepat dalam proses transmisi ke serangga inang sehat sehingga epizooti lebih mudah tercipta (Atkinson dan Durshner-Pelz 1995).

h. Pengelompokan Keragaman Isolat *L. lecanii* yang Virulen

Pengelompokan isolat yang virulen digunakan untuk mengetahui sampai sejauh mana kemiripan karakter fisiologi cendawan meliputi efikasi, jumlah konidia yang diproduksi pada tiap telur yang tidak menetas, ukuran konidia, daya kecambah konidia, periode waktu kecambah, toleransi terhadap suhu, dan karakter koloni. Hasil seleksi



Gambar 6. Karakter koloni isolat *L. lecanii* yang berbentuk wholly (a), pellicular (b), cottony (c), farinaceous (d), plumose (e), dan velvety (f).



Gambar 7. Pengelompokan berbagai isolat *L. lecanii* berdasarkan kemiripan karakter fisiologi cendawan.

berbagai jenis isolat yang dilakukan Prayogo (2009) menunjukkan bahwa isolat L1-JTM11, L1-JTM12, L1-JTM15, dan L1-TB2 membentuk satu kelompok dengan kemiripan karakter fisiologi mencapai 98% (Gambar 7). Keempat isolat yang tergabung dalam kelompok ini memiliki peluang yang sama besarnya untuk dapat digunakan sebagai salah satu agens hayati untuk mengendalikan telur kepik coklat. Menurut Fatiha *et al.* (2007). karakter morfologi dan fisiologi berkaitan dengan virulensi cendawan sehingga isolat yang memiliki kesamaan karakter fisiologi mempunyai peluang yang sama besarnya untuk digunakan sebagai agens hayati. Meskipun Varela dan Morales (1996) mengindikasikan bahwa karakter fisiologi dan morfologi belum tentu digunakan sebagai salah satu tolok ukur dalam menyeleksi cendawan entomopatogen sebagai agens hayati pengendalian hama.

KESIMPULAN

Isolat cendawan *L. lecanii* yang virulen memiliki pertumbuhan lebih cepat, mampu memproduksi konidia lebih banyak, daya kecambah di atas 90%, periode kecambah konidia hanya membutuhkan waktu 12 jam, memiliki karakter koloni berbentuk wholly dan memiliki kemiripan karakter fisiologi yang sangat dekat hingga 98%. Isolat *L. lecanii* L1-JTM11, L1-JTM12, L1-JTM15, dan L1-TB2 mampu bersifat ovisidal terhadap telur kepik coklat dengan virulensi hingga mencapai

75% sehingga semua isolat tersebut mempunyai peluang yang sama besarnya untuk digunakan sebagai calon bioinsektisida yang prospektif untuk mengendalikan telur kepik coklat.

DAFTAR PUSTAKA

- Aiuchi, D., Y. Baba, K. Inami, R. Shinya, M. Tani, K. Kuramochi, S. Horrie, and M. Koike. 2007. Screening of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium lecanii*) hybrid strains based on evaluation of pathogenicity against cotton aphid and greenhouse whitefly and viability on the leaf surface. *J Appl Entomol and Zool* 51: 205–212.
- Aiuchi, D., K. Inami, M. Sugimoto, R. Shinya, M. Tani, K. Kuramochi, and M. Koike. 2008a. A new method for producing hybrid strains of entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium lecanii*) through protoplast fusion by using nitrate non-utilizing (Nit) mutants. *Mycol Aplicada Internat.* 20(1): 1-16.
- Aiuchi, D., Y. Baba, K. Inami, R. Shinya, M. Tani, and M. Koike. 2008b. Variation in growth at different temperatures and production and size of conidia in hybrid strains of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium lecanii*) (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *J Appl Entomol* 43(3): 427–436.
- Alavo, T.B.C., H. Sermann, and H. Bochow. 2002. Biocontrol of aphid using *Verticillium lecanii* in greenhouse: Factor reducing the effectiveness of the entomopathogenic fungus. *J Arch Phytopathol and Plant Protect* 34(6): 407–424.
- Alavo, T.B.C., H. Sermann, and H. Bochow. 2004. Virulence of strains of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* to Aphids: Strain improvement. *J Arch of Phytopathol and Plant Protect* 34(6): 379–398.
- Anderson, C.M.T., P.A. McGee, D.B. Nehl, and R.K. Mensah. 2007. The fungus *Lecanicillium lecanii* colonies the plant *Gossypium hirsutum* and the aphid *Aphis gossypii*. *Australasian Mycol* 26(2): 65–70.
- Anyala-Zermeno, M.A., T. Mier, J.B. Robles, and C. Toriello. 2005. Intraspecific variability of *Lecanicillium lecanii* (*Verticillium lecanii*): Effect of temperature on growth. *Revista Mexiana De Micol* 20: 93–97.
- Asensio, L., T. Carbonell, J.A. Lopez-Jimenez, and L.V. Lopez-Llorca. 2003. Entomopathogenic fungi in soils from Alicante province. *Spanish J Agric Res* 1(3): 37–45.
- Atkinson, H.J. and U. Durshner-Pelz. 1995. Spore transmission and epidemiology of *Verticillium chlamydosporium* an endozoic fungal parasite of nematodes in soil. *J Invertebr Pathol* 65: 237–242.
- Barbosa, C.C., A.C. Monteiro, and A.C.B. Correia. 2002. Growth and sporulation of *Verticillium lecanii* isolates under different nutritional conditions. *Pesq Agropec Bras* 37(6): 821–829.
- Blackburn, M.B., J.M. Domek, D.B. Gelman, and J.S. Hu. 2005. The broadly insecticidal *Photographus* *luminenscens* toxin complex a (Tca): activity against the Colorado beetle *Leptinotarsa decemlineata* and sweet potato whitefly *Bemisia tabaci*. *J Insect Sci* 11(5): 32–50.
- Chun, C. and F. Mingguang. 2004. Observation on the initial inoculum source and dissemination of entomophthorales caused epizootics in populations of cereal aphids. *Sci China C Life Sci* 47(1): 38–43.
- Dalzoto, P.R., C. Glienke-Blanco, V. Kava-Cordeiro, W.L. Araujo, and J.L. Azevedo. 2003. RAPD analyses of recombinant processes in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycol Res* 107(9): 1069–1074.
- Davidson, G., K. Phelps, K. Sunderland, J. Pell, B. Ball, K. Shaw, and D. Chandler. 2003. Study of temperature-growth interactions of entomopathogenic fungi with potential for control of *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata) using nonlinear model of poikilotherm development. *J Appl Microbiol* 94(5): 816–825.
- del-Prado, E.N., J. Lannacone, and H. Gomez. 2008. Effect of two entomopathogenic fungi in controlling *Aleurodicus cocois* (CURTIS. 1846) (Homoptera: Aleyrodidae). *Chilean J Agric Res* 68(1): 21–30.
- Devi, K.U., V. Sridevi, C.M. Mohan, and J. Padmavathi. 2005. Effect of high temperature and water stress on invitro germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *J Invertebr Pathol* 88: 181–189.
- Drummond, J., J.B. Heale, and A.T. Gillespie. 1987. Germination and effects of reduced humidity on expression of pathogenicity in *Verticillium lecanii* against the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *Ann Appl Biol* 111(1): 193–201.
- Ekesi, S. 2001. Pathogenicity and antifeedant activity of entomopathogenic hyphomycetes to the cowpea leaf beetle *Ootheca mutabilis* Shalberg. *Insect Sci Applic* 21(1): 55–60.
- Fatiha, L., S. Ali, S. Ren, and M. Afzal. 2007. Biological characteristics and pathogenicity of *Verticillium lecanii* against *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on eggplant. *J Pak Entomol* 29(2): 63–72.
- Feng, K.C., B.L. Liu, and Y.M. Tzeng. 2000. *Verticillium lecanii* spore production in solid-state fermentations. *Bioproc Engine* 23(1): 25–29.
- Feng, K.C., B.L. Liu, and Y.M. Tzeng. 2002. Morphological characterization and germination of aerial and submerged spores of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *World J Microbiol and Biotechnol* 18(3): 217–224.

- Ganga-Visalakshy, P.N., A. Manoj-Kumar, and A. Krishnamoorthy. 2004. Epizootics of fungal pathogen *Verticillium lecanii* Zimmermann on Thrips palmi Karny. *Insect Environ* 10(3): 134–135.
- Geden, C.J., D.A. Rutz, and D.C. Steinkraus. 1995. Virulence of different isolates and formulations of *Beauveria bassiana* for house flies and the parasitoid *Musci difurax raptor*. *Biocontr* 5: 615–621.
- Gindin, G., N.U. Geschtovt, B. Raccah, and I. Barash. 2000. Pathogenicity of *Verticillium lecanii* to different developmental stages of the silverleaf whitefly *Bemisia argentifolii*. *Phytopar* 28(3): 231–242.
- Grajek, W. 2008. Sporogenesis of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in solid-state cultures. *Folia Microbiol* 39(1): 29–32.
- Hoddle, M.S. 1999. The Biology and management of Silverleaf Whitefly *Bemisia argentifolii* Bellows and Perring (Homoptera: Aleyrodidae) on greenhouse grown ornamentals. <http://www.biocontrol.ucr.edu/bemisia.html#verticillium> [5 Jan 2008].
- Humber, R.A. 1997. Fungi: Identification. *Dalam* Lacey LA, editor. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Acad Press, London. pp:153–185.
- Humber, R.A. 1998. Entomopathogenic fungal identification. APS/ESA Workshop. APS/ESA Joint Annual Meeting. 8-12 November 1998. Las Vegas. NV. http://www.ppru.cornell.edu/mycology/insect_mycology.html [23 Nop 2008].
- Ibrahim, L., T.M. Butt, and P. Jenkinson. 2002. Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycol Res* 106: 705–715.
- Jung, H.S., H.B. Lee, K. Kim, and E.Y. Lee. 2006. Selection of *Lecanicillium lecanii* (*Verticillium lecanii*) strains for aphid (*Myzus persicae*) control. *Korean J Mycol* 34: 112–118.
- Kamp, A.M. and M.J. Bidochka. 2002. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Appl Microbiol* 35(1): 74–77.
- Kassa, A. 2003. Development and testing of mycoinsecticides based on submerged spores and aerial conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for control of locusts, grasshoppers, and storage pests. [disertation]. Gotingen: <http://wcbdoc.sub.gwdg.de/diss/2003/kassa/kassa.pdf>. [5 Mar 2007].
- Keller, S. 1991. Arthropod-pathogenic Entomophthorales of Switzerland. II. *Erynia*, *Eryniopsis*, *Neozygites*, *Zoopthora*, and *Tarichium*. *Sydowia* 43: 39–122.
- Klingen, I., A. Hajek, R. Meadow, and J.A.A. Renwick. 2002. Effect of brassicaceous plants on the survival and infectivity of insect pathogenic fungi. *Biol Contr* 47: 411–425.
- Kope, H.H., R.I. Alfaro, and R. Lavallee. 2007. Effects of temperature and water activity on *Lecanicillium* spp. conidia germination and growth and mycosis of *Pisodes strobe*. *Biol Contr* 53: 489–500.
- Kope, H.H., R.I. Alfaro, and R. Lavallee. 2008. Effects of temperature and water activity on *Lecanicillium* spp. conidia germination and growth, and mycosis of *Pissodes strobi*. *Pest Manag Sci* 53(3): 489–500.
- Lacey, L.A. 1997. *Manual of techniques in insect pathology*. Acad Press. NY, USA. p.409.
- Lazzarini, G.M.J., L.F.N. Rocha, and C. Luz. 2006. Impact of moisture on *in vitro* germination of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and their activity on *Triatoma infestans*. *Mycol Res* 110(4): 485–492.
- Lee, M.H., Y.S. Yoon, T. Yun, H.S. Kim, and J.K. Yoo. 2002. Selection of a highly virulent *Verticillium lecanii* strain against *Trialeurodes vaporariorum* at various temperatures. *J Microbiol Biotechnol* 12: 145–148.
- Lee, M.H., C.S. Yoon, T.Y. Yun, H.S. Kim, and J.K. Yoo. 2006. *Verticillium lecanii* spore formulation using UV protectant and wetting agent and the biocontrol of cotton aphids. *Biotechnol Letters* 28(13): 1041–1045.
- Lerche, S., U. Meyer, H. Sermann, and C. Buettner. 2004. Dissemination of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viegas (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in population of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Commun Agric Appl Biol Sci* 69(3): 195–200.
- Lewis, L.C., D.J. Bruck, R.D. Gunnarson, and K.G. Bidne. 2000. Colonization of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on Bt transgenic corn (*Zea maize* Still) and their genetic isolines and assessment of possible plant pathogenicity. *Crop Sci* 39: 191–200.
- Liu, H., M. Skinner, M. Brownbridge, B.L. Parker. 2003. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *J Invertebr Pathol* 82(3): 139–147.
- Lopez-Llorca, L.V. and T. Carbonell. 1999. Characterization of Spanish strains of *Verticillium lecanii*. *Rev Iberoam Micol* 16: 136–142.
- Luz, C. and J. Farques. 2004. Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. *Mycopathol* 138(3): 117–125.
- McDonald, B.M. and J.M. Dermott. 1993. Population genetic of plant pathogenic fungi. Electrophoretic markers given unprecedented precision to analysis of genetic structure of population. *Bio Sci* 43: 311–319.

- Mor, H., G. Gindin, I.S. Ben-Zeev, B. Raccach, N.V. Geschtot, N. Ajtkehozhina, and I. Barash. 1996. Diversity among isolates of *Verticillium lecanii* as expressed by DNA polymorphism and virulence towards *Bemisia tabaci*. *Phytopar* 24(2): 111–118.
- Olivares-Bernabeu, C.M. and L. V. Lopez-Llorca. 2002. Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. *Rev Iberoam Micol* 19: 104–110.
- Parker, B.L., M. Skinner, S.D. Costa, S. Gouili, W. Rreid, M. El-Bouhssini. 2003. Entomopathogenic fungi of *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae): Collection and characterization for development. *Biol Contr* 27(3): 260–272.
- Popowska-Nowak, E., P. Bienkowski, C. Bajan, and D. Tyrawaska. 2000. Influence of some heavy metal ions on biological activity of two strains of entomopathogenic fungus *Paecilomyces farinosus*. *Chem Ins Ekol* 7(11): 1121–1128.
- Prayogo, Y. 2004. Keefektifan lima jenis cendawan entomopatogen terhadap hama pengisap polong kedelai *Riptortus linearis* (F.) (Hemiptera: Alydidae) dan dampaknya terhadap predator *Oxyopes javanus* Thorell (Araneida: Oxyopidae). [tesis]. Bogor: Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Prayogo, Y. 2009. Kajian cendawan entomopatogen *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) (Viegas) Zare dan Gams sebagai agens hayati untuk mengendalikan telur hama pengisap polong kedelai *Riptortus linearis* (F.) (Hemiptera: Alydidae). [disertasi]. Sekolah Pascasarjana, Departemen Proteksi Tanaman, Institut Pertanian Bogor.
- Ropek, D. and A. Para. 2002. The effect of heavy metal ions and their complexons upon the growth, sporulation, and pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *J Invertebr Pathol* 79: 123–125.
- Safavi, S.A., G.R. Rassulian, H. Askary, and A.K. Pakdel. 2007. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *B. bassiana*. *FEM Microbiol Letters* 270(1): 116–123.
- Samson, R.A., H.C. Evans, and J.P. Latge. 1988. Atlas of entomopatogenic fungi. Prinejerverlag Berlin Heodelberg New York. London. Tokyo.
- Samuels, R.I. and D.L.A. Coracini. 2004. Selection of *B. bassiana* and *M. anisopliae* isolates for the control of *B. antillus* (Hemiptera: Lygaeidae). *Sci Agric* 61(3): 271–275.
- Shinya, R., A. Watanabe, D. Aiuchi, M. Tani, and K. Kuramochi. 2007. Effects of fungal culture filtrates of *Verticillium lecanii* (= *Lecanicillium lecanii*) hybrid strains on *Heterodera glycines* eggs and juveniles. *J Invertebr Pathol* 72:181–183.
- Sitch, J.C. and C.W. Jackson. 1997. Pre-penetration events affecting host specificity of *Verticillium lecanii*. *Mycol Res* 101: 535–541.
- Soman, A.G., J.B. Gloer, R.F. Angawi, D.T. Wicklow, and P.K. Dowd. 2000. Vertilecanins: New phenopicolinic acid analogues from *Verticillium lecanii*. *J Nat Prod* 64(2): 189–192.
- Sudirman, L.I., Y. Prayogo, Yunimar, and S. Ginting. 2008. Effect of leaf litters and soils on viability of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Hayati J Biosci* 15(3): 93–98.
- Sugimoto, M., M. Koike, H. Nagao, K. Okumura, and M. Tani. 2003a. Genetic diversity of the entomopathogen *Verticillium lecanii* on the basis of vegetative compatibility. *Phytopar* 31:450–457.
- Sugimoto, M., M. Koike, N. Hiyana, and H. Nagao. 2003b. Genetic, morphological, and virulence characterization of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *J Invertebr Pathol* 82: 176–187.
- Sun, M.H. and X.Z. Liu. 2006. Carbon requirements of some nematophagous entomopathogenic and mycoparasitic Hyphomycetes as fungal biocontrol agents. *Mycopathol* 161(5): 295–305.
- Trizelia. 2005. Cendawan entomopatogen *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes): Keragaman genetik, karakterisasi fisiologi, dan virulensinya terhadap *Crociodolomia pavonana* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae). [disertasi]. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Departemen Proteksi Tanaman, Institut Pertanian Bogor.
- Varela, A. and E. Morales. 1996. Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the coffee berry *Hypothenemus hampei*. *J Invertebr Pathol* 67: 147–152.
- Vu, V.H., S.I.I. Hong, and K. Kim. 2007. Selection of entomopathogenic fungi for aphid control. *J Bio Sci and Bio Engine* 104(6): 498–505.
- Wagner, B.L. and L.C. Lewis. 2000. Colonization of corn, *Zea mays* L., by endophytic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Environ Microbiol* 66: 3468–3473.
- Yeo, H., H.K. Pell, P.G. Alderson, S.J. Clark, and B.J. Pye. 2003. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and their pathogenicity to two aphid species. *Pest Manag Sci* 59(2): 156–165.
- Zhen-Hiang, L., L. Andre, and H.C. Huang. 2005. Isolation and characterization of chitinases from *Verticillium lecanii*. *Can J Microbiol* 51(12): 1045–1055.
- Zimmermann. 1998. Suggestion for a standardized method for reisolation of entomopathogenic fungi from soil using the bait method. *Insect pathogen and insect parasitic nematodes*. *IOBC Bull* 21(4): 289–298.