

Capítulo 3

Microorganismos con actividad entomopatógica

Fabiola Altimira P.

Bioquímica, Dra.

fabiola.altimira@inia.cl

1. Antecedentes generales

A pesar de que los microorganismos entomopatógenos, tales como hongos, bacterias y nematodos son prometedores pesticidas biológicos para el control de insectos, existen pocos productos registrados y adoptados en programas de manejo integrado de plagas. A continuación, se realizará una concisa revisión de la historia y mecanismo de acción insecticida de los hongos y bacterias con actividad entomopatógica.

2. Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos (HEP) son microorganismos que poseen la capacidad de infectar y matar artrópodos. Esta capacidad ha permitido que se utilicen como una alternativa segura a los insecticidas químicos tóxicos para el control de plagas. Las especies pertenecientes al orden Hypocreales, conformado por más de 750 especies de HEP, han sido ampliamente estudiados y utilizados en biocontrol debido a que tienen un rango de huéspedes relativamente amplio y son fáciles de producir a gran escala (But et al., 2016). Alrededor del 80% de los productos HEP disponibles en el mercado se basan en los géneros *Metarhizium* y *Beauveria* (But et al., 2016; de Faria y Wraight, 2007). Estos géneros están conformados por diferentes especies que en el transcurso del tiempo han ido aumentando debido a los nuevos aislamientos que se realizan en todo el mundo y al empleo de técnicas moleculares que permiten su identificación de forma certera y concluyente.

Los hongos entomopatógenos no sólo controlan naturalmente las poblaciones de artrópodos, sino que también forman complejas relaciones con las plantas. Se ha demostrado que las especies de HEP, *M. robertsii* y *B. bassiana*, proporcionan a las plantas parte del nitrógeno que ellos asimilan durante la parasitación de insectos (Behie y Bidochka, 2014; Litwin et al., 2020), promoviendo el crecimien-

to de estas (Ríos Moreno et al., 2016). *Beauveria bassiana* actúa como endófito (coloniza el interior de las plantas) de aproximadamente 25 especies de plantas, contribuyendo al control de plagas y hongos fitopatógenos (McKinnon et al. 2017; Litwin et al., 2020; Vega, 2018). Coloniza hojas y brotes, además de las raíces, permitiendo que las plantas sean más resistentes a los insectos (Klieber y Reineke 2016; Litwin et al., 2020), y también las protege de los patógenos microbios.

2.1. Historia

El género fúngico mayormente estudiado por su acción entomopatógena es *Beauveria* sp. Su actividad entomopatógena fue inicialmente descrita en 1835 por el italiano Agostino Bassi di Lodi. Él observó una enfermedad en los gusanos de seda, *Bombyx mori*, que llamó "muscardina blanca" y comenzó con los primeros experimentos de infección, demostrando por primera vez que un hongo puede causar una enfermedad en insectos. Posteriormente, *Beauveria* sp. fue estudiada por el naturalista italiano Giuseppe Gabriel Balsamo-Crivell, quien le dio nombre de *Botrytis bassiana* en honor a Bassi. En 1912, Vullemin creó el nuevo género *Beauveria* en honor a al micólogo Jean Jules Beauverie, del cual la especie tipo es *Beauveria bassiana* (Zimmermann, 2007). Por otra parte, *Metarhizium anisopliae* fue el primer hongo del mundo en ser producido de forma masiva para el control de plagas de insectos (Roberts y Leger, 2004).

Las primeras pruebas de campo innovadoras con HEP las realizó un microbiólogo ruso, Elie Metchnikoff en 1888, quien más tarde se convirtió en ganador del Premio Nobel. Metchnikoff produjo conidias fúngicas en un sustrato esterilizado y lo combinó con gránulos de arena para esparcirlos en cultivos de campo (Lord 2005, Maina et al., 2018). Aunque los resultados fueron inconsistentes, el trabajo de Metchnikoff despertó la curiosidad en todo el mundo y condujo a programas en Europa y Estados Unidos para la experimentación con HEP (Lord 2005; Maina et al., 2018).

Los estudios sobre HEP disminuyeron después de la Segunda Guerra Mundial, cuando los insecticidas químicos sintéticos estuvieron disponibles para el control de plagas de insectos. En estas últimas tres décadas el estudio y aplicación de HEP en el control biológico está incrementando en gran medida debido a una mayor conciencia ambiental, preocupaciones de seguridad alimentaria y al fracaso de los productos químicos convencionales debido a un número creciente de especies resistentes a los insecticidas (Maina et al., 2018).

2.2. Mecanismo de acción

En este capítulo nos evocaremos a revisar el mecanismo de acción que han desarrollado los HEP para parasitar a los insectos. Para que ocurra este proceso se requiere que el HEP se diferencie en estructuras celulares que son morfológicamente diferentes, las cuales son: conidia (**Figura 1a**), tubo germinativo, apresorio (**Figura 1b**), hifa (**Figura 1c**) y blastosporas (**Figura 1d**). Estas estructuras participan en las siguientes etapas claves del proceso de infección y parasitación del insecto (**Figura 2**): (a) Adhesión de las conidias a la cutícula del huésped, (b) formación del tubo germinal, (c) diferenciación del tubo germinal en una estructura llamada apresorio, (d) penetración del apresorio en el interior de la cutícula del insecto, (e) colonización del hemocele (sistema circulatorio del insecto) por blastosporas, (f) emergencia de las hifas del HEP desde el interior del insecto, (g) esporulación del HEP sobre el cadáver del insecto, promoviendo de este modo la dispersión de las conidias y el comienzo de una nueva infección. En la **Figura 3** se ilustra la capacidad de las cepas HEP, empleadas en el proyecto “Desarrollo de un pesticida en base a hongos entomopatógenos para el biocontrol y/o manejo integrado de *Lobesia botrana* en vides como una alternativa sustentable en el cambio climático, PYT-2017-0182” en penetrar el capullo de las pupas de *Lobesia botrana* en estado de diapausa (**Figura 3**) (Altimira et al., 2019).

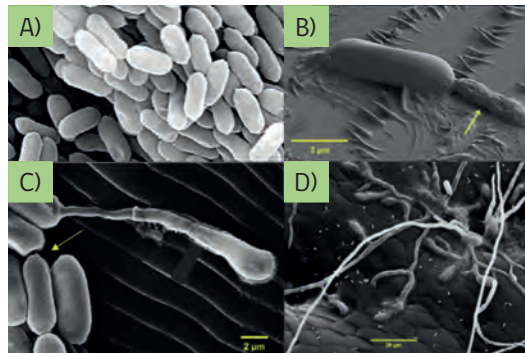


Figura 1. Diferentes estructuras y morfologías celulares de los hongos entomopatógenos. A) conidias. B) apresorio (flecha en amarillo). C) blastosporas (flecha en amarillo) en el interior del hemocele. D) micelio (Adaptado de Butt et al., 2016).



Figura 2. Ciclo de infección y desarrollo de un hongo entomopatógeno (HEP), sobre una pupa de insecto. Secuencialidad de los pasos de infección y colonización, desde la adhesión de la espora a la cutícula o capullo de la pupa hasta la emergencia del hongo. (Ilustrado por Carlo Cortés).

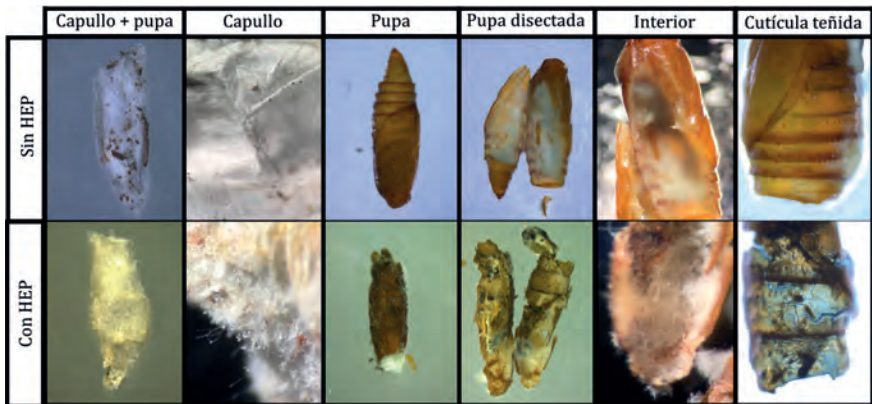


Figura 3. Imágenes representativas de colonización de HEP en pupas con capullo de *L. botrana*. En la primera fila, se muestran imágenes de una pupa del tratamiento control y en la fila inferior es de una pupa tratada con HEP. Ambas pupas se disectaron. Las hifas que penetraron la cutícula de la pupa se tiñen con azul de lactofenol (Adaptado de Altimira et al., 2019).

A continuación, se describe con mayores detalles las principales etapas que comprenden la infección y parasitación de los insectos por los HEP:

2.2.1. Adhesión y penetración del HEP sobre la cutícula del insecto

Tal como se mencionó previamente, el primer paso en el proceso de infección es la adhesión de las conidias del HEP a la superficie del huésped (**Figura 2**). Dado que la mortalidad depende de la dosis es vital que la mayor cantidad de conidias se adhieran a la cutícula (Butt et al, 2016). La superficie de las conidias de los HEP hipocreales está cubierta por una capa compuesta de proteínas de naturaleza hidrofóbica que facilitan la unión pasiva de estas a las superficies de la cutícula de los artrópodos (Holder y Keyhani, 2005) (**Cuadro 1**). Adicionalmente, los HEP secretan enzimas líticas tales como proteasa, lipasas y quitinasas, cuya principal función es la hidrólisis de los componentes de la cutícula del insecto, facilitando la penetración del apresorio hacia el interior de los artrópodos. También secretan la enzima fosfolipasa C que hidroliza los enlaces fosfodiéster de los fosfolípidos de las membranas celulares de los insectos, permitiendo que el hongo ingrese al hemocele e infecte sus tejidos (Santi et al., 2010). En la **Cuadro 1** se mencionan los genes y sus funciones en la cascada de eventos que ocurren en el proceso de parasitación de los insectos por los HEPs.

2.2.2. Post-penetración y multiplicación del HEP en la hemolinfa del insecto

Una vez que el HEP invade la hemolinfa, se multiplican como blastosporas. Este tipo de estructura celular fúngica ofrece una gran relación superficie/volumen para la absorción de nutrientes. Las blastosporas colonizan rápidamente el hemocele, donde se encuentran con las defensas celulares y humorales del huésped y presión osmótica elevada (300 a 500 mOsmol / l). En el hemocele, las blastosporas secretan la enzima trehalasa ácida (ATM1) que hidroliza la trehalosa (principal carbohidrato de la hemolinfa) para su nutrición. Ante la invasión de los HEPs, los insectos han desarrollado receptores de reconocimiento de patógenos (RRP). Los RRP se expresan constitutivamente y se secretan en la hemolinfa o se presentan en la superficie de los hemocitos (células que se encuentran en el hemocele), en el cuerpo graso y las membranas plasmáticas de las células epidérmicas. Los RRP se unen a restos de azúcar u otros ligandos que se encuen-

tran en las superficies de las células de los HEPs para facilitar la eliminación del microbio mediante fagocitosis (**Figura 4**). Adicionalmente, las células de los insectos pueden producir una amplia gama de defensas humorales para resistir la infección por hongos (**Figura 4**). Esto incluyen la producción de lectinas, inhibidores de la proteasa, fenoloxidasas, péptidos antimicrobianos y radicales reactivos de oxígeno y nitrógeno (Jiang et al., 2010) (**Figura 4**). Concomitantemente, los HEPs han desarrollado estrategias para minimizar el impacto de las defensas inmunes del huésped (**Figura 5**), que incluyen la represión de las proteasas que activan la fenoloxidasa, la eliminación de los carbohidratos de la superficie inmunogénica que son reconocidos por el sistema inmune del insecto, la secreción de inmunomoduladores y la capacidad de tolerar los péptidos antimicrobianos secretados por el huésped (**Figura 5**). *M. anisopliae* secreta una proteína de evasión inmune similar al colágeno, MCL1 (Wang y St. Leger, 2006). La interrupción de MCL1 aumenta el ataque de las blastosporas por parte de los hemocitos y reduce la virulencia (Wang y St. Leger, 2007). La función de MCL1 es actuar como una “capa” protectora antiadhesiva que enmascara los componentes antigénicos de la pared celular (β -glucanos). Adicionalmente, los HEPs secretan abundantes compuestos orgánicos de menor masa molecular llamados metabolitos secundarios. Estos son necesarios tanto para suprimir el sistema de defensa del insecto como para impedir que los microorganismos oportunistas se propaguen (Donzelli y Krasnoff, 2016). Los metabolitos secundarios que producen los HEP del género de *Beauveria* son bassianina, bassiacridina, bassianólido, tenellina y oosporeína, mientras que los HEP pertenecientes al género *Metarhizium* producen ciclosporina, swainsonina y destruxinas (Butt et al., 2016). Algunos metabolitos bioactivos son inmunomoduladores que limitan el impacto de las defensas del huésped y permiten al hongo colonizar y generar biomasa con relativa facilidad, lo que conducirá a la producción de conidias necesarias para la dispersión y la supervivencia. También estos compuestos tienen actividad antimicrobiana para excluir bacterias y hongos saprófitos oportunistas. Algunos compuestos secretados por los HEP son multifuncionales. Por ejemplo, las hidroxifungerinas producidas por especies de *Metarhizium* tienen actividad antibiótica e insecticida (Uchida et al., 2005). Del mismo modo, la miriocina producida por el HEP, *Isaria sinclairii*, funciona como un antibiótico y supresor inmune (de Melo et al., 2013). La producción de compuestos con funciones duales o múltiples asegura la colonización eficiente del huésped.

2.2.3 Emergencia y esporulación del HEP

Cuando el insecto ha muerto y los nutrientes en el hemocele se agotan, el hongo debe crecer fuera del insecto para producir y dispersar sus conidias (**Figura 5**). Las blastosporas que aún circulan en el hemocele se diferencian a la estructura de hifas, las cuales emergen hacia el exterior del insecto para la posterior esporulación en la superficie del huésped (Butt et al., 2016).

Las principales ventajas de estos hongos como biocontroladores son (Cañedos y Ames, 2004):

1. Presentan grados variables de especificidad, pueden ser específicos a nivel de familia o especies muy relacionadas.
2. Si el HEP encuentra las condiciones adecuadas para introducirse y colonizar un ecosistema, se reproduce y renueva en forma continua, es decir, se vuelve persistente, haciendo innecesarias nuevas aplicaciones.
3. Se pueden aplicar mezclas de HEP con dosis subletales de insecticidas, para lograr efectos sinérgicos superiores a los logrados con aplicaciones de cada producto por separado.
4. No contaminan el medio ambiente ni afectan al hombre u otros animales superiores.

Las desventajas que presentan son (Cañedos y Ames, 2004):

1. Sensibilidad a la variación de las condiciones climáticas como temperaturas extremas, desecación y luz ultravioleta. Estas limitantes están siendo contrarrestadas mediante el uso de aditivos en la formulación (protectores solares, aceites y antidesecantes).
2. Requieren de condiciones de almacenamiento más exigentes que las moléculas inorgánicas, para evitar que pierdan su patogenicidad.
3. En general, los insecticidas biológicos no matan instantáneamente. Alcanzan buenos niveles de control entre una y tres semanas después de la aplicación, dependiendo de la plaga y del ambiente. Sin embargo, el insecto deja de ser plaga al ser parasitado por el hongo, deja de alimentarse mucho antes de morir, disminuyendo el daño.

Cuadro 1. Genes de virulencia involucrados en HEP. (Adaptado de Butt et al., 2016)

Grupo funcional	Genes	Descripción
Adhesión a la cutícula	Mad 1, Mad 2 Hyd 1, Hyd 2, Hyd 3 SsgA cwp 10	Proteínas-tipo adhesina Hidrofobinas Proteínas tipo hidrofobinas Incrementa la hidrofobicidad de las esporas.
Degradación de cutícula	Pr1, Pr2, Pr4 chi 1, chi 2, chi 3, chi 4 Bbchit 1, Bbchit 2	Subtilisina, tripsina y cistein proteasa Quitinasas
Manejo del estrés	HSP25, HSP30, HSP70, HSP90 Hog1, Pmr1	Proteínas de shock térmico Proteína quinasa activada por mitógeno
Adaptación a la hemolinfa/ inmunomodulación	Mos 1 Mcl 1 Mr-npc2a dtxS1-dtxS4	Osmosensor Proteína tipo colageno Carrier de esterol Biosíntesis de dextruxinas
Multifactorial (Factores de transcripción)	MrpacC MrSkn7 cag8	Degradación de la cutícula Micosis de los cadáveres de insectos Evasión de la inmunidad Formación de apesorio Biosíntesis de pared celular Evasión de la inmunidad Síntesis de hidrofobina
	BbMF1 MaPKA1 <i>nrr1</i> Crr1 Mest1 ATM1 MrGAT	Crecimiento miceliar Producción de blastosporas Regulación de la esporulación Tolerancia al estrés oxidativo, osmótico y térmico. morfogénesis de las hifas Degradación de la cutícula Adquisición de nutrientes Respuesta a la regulación del nitrógeno Regulador del carbono Hidrólisis de almacenamiento de lípidos Metabolismo de lípidos Enzima de hidrólisis de la trehalosa Biosíntesis de triacilglicerol

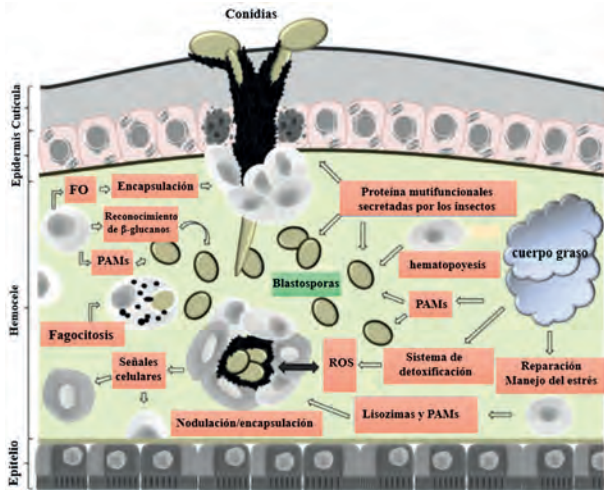


Figura 4. Respuestas celulares y humorales de los insectos a los hongos entomopatógenos. Las células de HEP en la hemolinfa son reconocidas por los hemocitos y los receptores solubles. Los hemocitos fagocitan y encapsulan las blastosporas, el insecto secreta proteínas multifuncionales y compuestos bioactivos para inmovilizar y matar el hongo. Las blastosporas activan redes de respuesta, para el control del estrés junto con compuestos antioxidantes. FO, feniloxidasa; PAMs, péptidos antimicrobianos; ROS, especies reactivas de oxígeno (Adaptado de Butt et al., 2016).

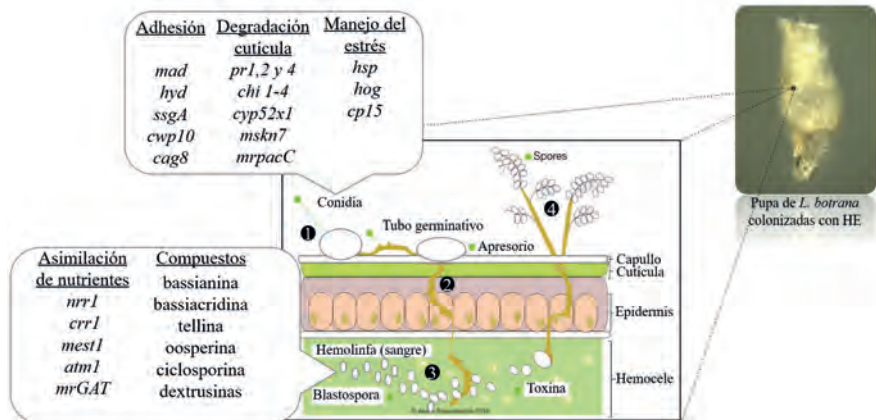


Figura 5. Ilustración del mecanismo de acción insecticida de los hongos entomopatógenos. Se ilustran las etapas de infección de los HEP tales como adhesión (1), penetración (2), colonización (3) y emergencia (4) junto con los genes que participan en la adhesión y que codifican las enzimas de degradación cuticular, manejo de estrés y asimilación de nutrientes, además de los metabolitos secundarios que secretan al interior del insecto, secretan al interior del insecto (Adaptado de Butt et al 2016 y Ramírez et al., 2018).

3. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria entomopatógena, con forma de bastón, Gram positiva, formadora de esporas y aeróbica que se encuentra generalmente en el suelo, granos de polvo, insectos muertos y agua (Lambert y Pefe-roen, 1992). Los biopesticidas en base a Bt son los más utilizados en el mundo, debido a su toxicidad hacia una amplia gama de plagas de insectos como Diptera, Lepidoptera y Coleoptera (Federici *et al.*, 2006; Lacey *et al.*, 2015) y a su inocuidad hacia el ser humano.

3.1. Historia

La era de Bt se inició en 1901, cuando el científico japonés, Shigetane Ishiwata, aisló una bacteria de las larvas de gusanos de seda muertos mientras investigaba la causa de la llamada "enfermedad de sotto" (enfermedad de colapso repentino). La enfermedad fue responsable de la pérdida de un gran número de gusanos de seda en Japón y la región circundante. Ishiwata denominó a la bacteria causante de la enfermedad *Bacillus sotto* (Ibrahim *et al.*, 2010).

Unos años después, el científico alemán Ernst Berliner aisló una cepa relacionada en larvas de polilla mediterránea muerta que encontró en un molino de harina en el estado alemán de Turingia, denominándola en el año 1915, *Bacillus thuringiensis* (Milner, 1994). Berliner estudió la bacteria y encontró cuerpos de inclusión o "Restkörper" junto con la endospora (Roh *et al.*, 2007). Posteriormente, en el año 1953, Thomas Angus demostró la actividad insecticida de estos cuerpos altamente refráctiles, denominándolos, "cristales parasporal". Thomas Angus junto con Philip Fitz-James y Christopher Hannay descubrió en 1955 que estos cristales tóxicos eran proteínas. Las cuales recibieron el nombre de proteína Cry.

El primer insecticida comercial basado en Bt (Sporine) se produjo en Francia en 1938 y se empleó principalmente para controlar las polillas de la harina. En los Estados Unidos, Bt se fabricó comercialmente por primera vez en 1958 y, se registró en 1961 en la Agencia de Protección Ambiental de EEUU (Roh *et al.*, 2007). A pesar de que los productos desarrollados en base a *Bacillus thuringiensis* se intensificaron en los años 50, solamente en 1970 se masificó la comercialización de la cepa *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 en varias compañías (Navon *et al.*, 2010). En 1977, Goldberg y Margalit identificaron una cepa que mostraba toxicidad en contra Dipteras. La cepa fue aislada en Israel desde una moribunda larva de *Cules pipiens*, siendo llamada *B.thuringiensis* var. *israelensis*, la cual fue la

primera bacteria usada en programas de control biológico en contra de Dipteras en el mundo.

Actualmente, los biopesticidas en base a *Bacillus thuringiensis* y proteínas dan cuenta del 90% del mercado de control biológico. En las últimas décadas se han identificado más de 700 secuencias de genes cry que codifican proteínas cristalinas (Cry). Si bien muchas proteínas Cry tienen propiedades insecticidas para el control de plagas en la agricultura, otras proteínas producidas como cristales parasporales por cepas Bt no tienen actividad insecticida conocida y se han denominado parasporinas. Algunos de este grupo de parasporina de proteínas Cry, tales como Cry31A, Cry41A, Cry45A, Cry46A, Cry63A y Cry64A, exhiben una actividad citotóxica fuerte y específica contra células cancerosas humanas de diversos orígenes y se les ha dado los nombres alternativos parasporin-1 (PS1), parasporin-3 (PS3), parasporin-4 (PS4), parasporina-2 (PS2), parasporina-6 (PS6) y parasporina-5 (PS5), respectivamente. Además, los aislados de Bt también pueden sintetizar otras proteínas insecticidas durante la fase de crecimiento vegetativo; estos se secretan posteriormente en el medio de cultivo y se han designado como proteínas insecticidas vegetativas (Vip-9) y la proteína insecticida secretada (Sip) (Palma et al., 2014).

El cristal Bt (**Figura 6**) y las otras toxinas solubles secretadas son altamente específicas para los diferentes ordenes de insectos (Lepidóptera, Diptera, Hymenoptera, etc) adquiriendo importancia mundial como alternativa a los insecticidas químicos (**Figura 7**). La utilidad de estas proteínas insecticidas también ha motivado la búsqueda de nuevos aislados de Bt de los hábitats más diversos para identificar y caracterizar nuevas proteínas insecticidas con diferentes especificidades. Algunos de estos aislamientos muestran actividades tóxicas novedosas e inesperadas contra organismos distintos de los insectos, lo que sugiere una naturaleza pluripotencial de algunas toxinas (Palma et al., 2014).

3.2. Mecanismo de acción

La actividad insecticida de las mayorías de las subespecies de Bt están relacionadas a la producción de una inclusión de una estructura de cristal llamada-endotoxina, la cual es sintetizada durante la esporulación y está asociada a la espora (Vontersch *et al.*, 1994). Dependiendo de la variedad de especie, la-endotoxina está compuesta de diferentes estructuras y masa molecular (27 a 160 kDa). Estas proteínas (protoxinas) son llamadas proteínas Cry y presentan diferentes grados de toxicidad sobre varios ordenes de insectos susceptibles

(Palma et al., 2014). Cuando la larva ingiere, estas inclusiones, las protoxinas son solubilizadas y son convertidas en toxinas activas de baja masa molecular por las enzimas del insecto (proteasas) en el pH alcalino del estómago de la larva. Las toxinas se unen a receptores específicos, e inducen a la formación de poros en la membrana plasmática de las células intestinales provocando la pérdida de la integridad de la membrana. Tales eventos conducen a la lisis celular y finalmente a la muerte del insecto por inanición y sepsis (Kumar *et al.*, 2006) (Figura 8).

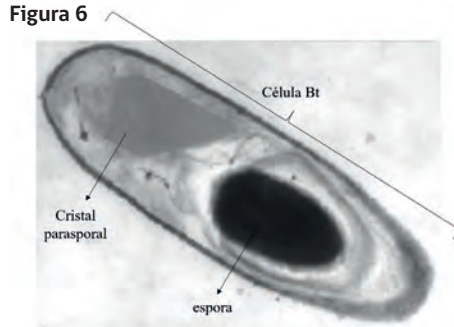


Figura 6. Micrografía electrónica de transmisión de una sección longitudinal de Bt. Se observa la espora (estructura ovoide negra) y el cristal de proteína con propiedades insecticidas (inclusión bipiramidal) (Adaptado de Sanchis y Bourguet, 2008).

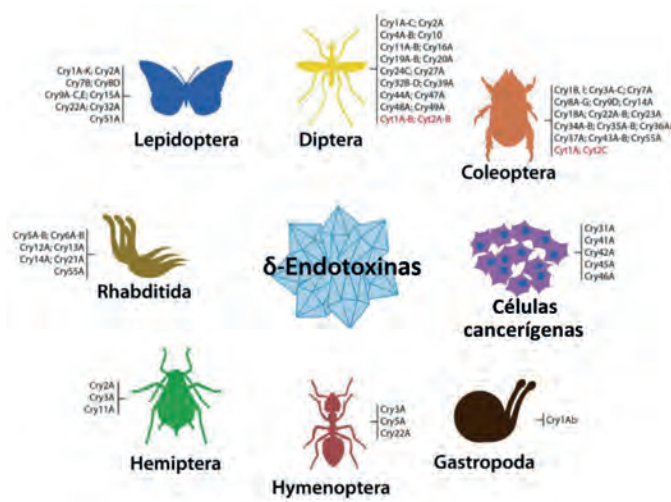


Figura 7. Especificidad de acción insecticida de las o-endotoxinas producidas por Bt. (Adaptada de Palma et al., 2014).



Figura 8. Actividad insecticida de *Bacillus thuringiensis* sobre una larva de *L. botrana*. Se indican con las flechas la secuencialidad de la acción de *B. thuringiensis* y su toxina Cry. (Ilustración realizada por Carlo Cortés).

4. Bibliografía

Altimira F, De La Barra N, Rebufel P, Soto S, Soto R, Estay P, Vitta N, Tapia E. 2019. Potential biological control of the pupal stage of the European grapevine moth *Lobesia botrana* by the entomopathogenic fungus *Beauveria pseudobassiana* in the winter season in Chile. BMC Res Notes 12:548.

Behie SW, Bidochka MJ. 2014. Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. Appl Environ Microbiol 80:1553-1560.

Butt TM, Coates CJ, Dubovskiy IM, Ratcliffe NA. 2016. Chapter nine-entomopathogenic fungi: New insights into host-pathogen interactions. Advances in Genetics. 94:307-364.

Cañedo V., Ames T. 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima, Perú. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 62 p.

de Faria MR; Wraight, SP. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control. 43:237-256.

de Melo NR, Abdrahman A, Greig C, Mukherjee K, Thornton C, Ratcliffe NA, Vilcinskis A, Butt, TM. 2013. Myriocin significantly increases the mortality of a non-mammalian model host during *Candida* pathogenesis. PLoS One. 8:e78905. 19

Donzelli BGG, Krasnoff SB, Churchill ACL, Vandenberg DMG. 2010. Identification of a hybrid PKS-NRPS required for the biosynthesis of NG-391 in *Metarhizium robertsii*. Curr Genet. 56:151-162. Federici BA, Park HW, Sakano Y. 2006. Insecticidal protein crystals of *Bacillus thuringiensis*, in Inclusions in Prokaryotes, ed Shively J. M., editor. (Berlin; Heidelberg; Springer-Verlag) 195-235.

Goldberg LJ, Margalit JA. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosquito News.37: 355-358.

Holder DJ, Keyhani N O. 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. Applied and Environmental Microbiology. 71:5260e5266.

Ibrahim MA1, Griko N, Junker M, Bulla LA. 2010. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. *Bioeng Bugs*. 1:31–50.

Jiang H, Vilcinskas A, Kanost M R. 2010. Immunity in lepidopteran insects. In *Invertebrate immunity* (pp. 181e204). US: Springer.

Klieber J, Reineke A. 2016. The entomopathogen *Beauveria bassiana* has epiphytic and endophytic activity against the tomato leaf miner *Tuta absoluta*. *J Appl Entomol*. 140:580–589.

Kumar PA, Sharma RP, Malik VS. 1996. The Insecticidal Proteins of *Bacillus thuringiensis*, *Advances in Applied Microbiology* 42: 1–43.

Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel M S. 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *J Invertebr. Pathol*. 132, 1–41. 10.1016/j.jip.2015.07.009.

Lambert B, Höfte H, Annys K, Jansens S, Soetaert P, Peferoen M. 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:2536–2542.

Litwin A, Nowak M, Różalska S. 2020. Entomopathogenic fungi: unconventional applications. *Re/views in environmental science and bio/technology*, 19:23–42.

Lord JC. 2005. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. *J Invertebr Pathol*. 89:19–29.

Maina UM, Galadima IB, Gambo FM, Zakaria D. 2018. A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 6: 27–32..

McKinnon AC, Saari S, Moran-Diez ME, Meyling NV, Raad M, Glare T. 2017. *Beauveria bassiana* as an endophyte: a critical review on associated methodology and biocontrol potential. *Biocontrol*. 62:1–17. Milner RJ. 1994. History of *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture Ecosystems & Environment*. 49:9–13.

Navon, A. 2000. *Bacillus thuringiensis* Insecticides in Crop Protection – Reality and Prospects. *Crop Protection*.19:669–676.

Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins (Basel)*. 6:3296 –3325.

Ríos-Moreno A, Garrido-Jurado I, Resquín-Romero G et al. (2016) Destruxin A production by *Metarhizium brunneum* strains during transient endophytic colonisation of *Solanum tuberosum*. *Biocontrol Sci Technol* 26:1574-1585.

Ríos-Moreno A, Garrido-Jurado I, Resquín-Romero G, Arroyo-Manzanares N, Arce L, Quesada-Moraga E. 2016. Destruxin A production by *Metarhizium brunneum* strains during transient endophytic colonisation of *Solanum tuberosum*. *Biocontrol science and technology*. 26:1574-1585.

Roberts DW, Leger RJ. 2004. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Adv Appl Microbiol*. 54:1-70.

Roh JY1, Choi JY, Li MS, Jin BR, Je YH. 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J Microbiol Biotechnol*. 17:547-559.

Sanchis V, Bourguet D. 2008. *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. A review. *Agron Sustain Dev*. 28:11- 20.

Santi L, da Silva WOB, Berger M, Guimaraes JA, Schrank A, Vainstein MH. 2010. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon*, 55(4), 874e880.

Shah FA, Wang CS, Butt TM. 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett* 251:259-266.

Uchida R, Imasato R, Yamaguchi Y, Masuma R, Shiomi K, Tomoda H, Omura S. 2005. New insecticidal antibiotics, hydroxyfungierins A and B, produced by *Metarhizium* sp. FKI-1079. *Journal of Antibiotics*. 58: 804e809.

Vega FE. 2018. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. *Mycologia*. 110:4-30.

Vontersch, MA, Slatin SL, Kulesza CA, Eglis, G.H. 1994. Membrane permeabilising activities of *Bacillus thuringiensis* Cry IIIB2 and Cry IIIB2 domain I peptide, *Applied and Environmental Microbiology*. 60:3711-3717.

Wang C, Duan Z, Leger RJ. 2008. MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryotic Cell*. 7:302e309.

Wang C, St Leger RJ. 2007. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell*. 6: 808e816.

Wang C, St. Leger RJ. 2006. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 6647e6652.

Zimmermann G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocont Sci Technol* 17:553–596.