Cuad. Soc. Esp. Cienc. For. 51(1): 139-150 (2025)
Doi: https://doi.org/10.31167/csef.v0i51.20171
Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales
Acceso abierto disponible en http://secforestales.org/publicaciones/index.php/cuadernossecf/index

Desarrollo de un modelo experimental para el aislamiento y selección de hongos endófitos con actividad entomopatógena para control de plagas en bosques mediterráneos

Development of an experimental model for the isolation and selection of endophytic fungi with entomopathogenic activity for pest control in Mediterranean forests

Benito-Delgado, A.[1*]; Diez-Hermano, S.[1]; Diez, J.J.[1]

[1] *Departamento Filiación: Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales, Instituto de Investigación sobre Manejo Forestal Sostenible (iuFOR). Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrícola (ETSIIAA), Universidad de Valladolid, Palencia, España*

[1] *Department Affiliation: Department of Plant Production and Forestry Resources, Institute for Research on Sustainable Forest Management (iuFOR). Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrícola (ETSIIAA), University of Valladolid, Palencia, Spain.*

[*] Autor de correspondencia: alvaro.benito@uva.es

Resumen

Una metodología para la identificación y evaluación de hongos endófitos entomopatógenos en ecosistemas forestales es presentada en este estudio, enfocándose en su potencial como agentes de control biológico de plagas forestales. Para ello, se emplea el insecto modelo *Tenebrio molitor* para evaluar la patogenicidad de los hongos encontrados. Los hongos endófitos fueron aislados de los tejidos de diversas especies de árboles mediterráneos, *Quercus ilex*, *Quercus pyrenaica*, *Quercus suber* y *Castanea sativa*, y posteriormente testados en *T. molitor*. Se comparan los hongos entomopatógenos nativos encontrados con *Beauveria pseudobassiana*. Al comparar con *Beauveria pseudobassiana*, se observa que los hongos endófitos nativos encontrados causan una mortalidad del 100 % en *T. molitor*, con un tiempo letal medio (TL50) de 15 días, con una eficacia algo mayor *Beauveria pseudobassiana* presenta un TL50 de 8 días con la misma tasa de mortalidad. Estos hallazgos sugieren que los hongos endófitos nativos podría ser una alternativa para controlar plagas potenciales dentro del marco de la Gestión Integrada de Plagas (GIP).

Palabras claves: Control biológico, hongos autóctonos, gusano de la harina, micoinsecticidas..

Abstract

A methodology for the identification and evaluation of entomopathogenic endophytic fungi in forest ecosystems is presented in this study, focusing on their potential as biological control agents of forest pests. For this purpose, the model insect *Tenebrio molitor* is used to evaluate the pathogenicity of the fungi found. Endophytic fungi were isolated from the tissues of several Mediterranean tree species, *Quercus ilex*, *Quercus pyrenaica*, *Quercus suber* and *Castanea sativa*, and subsequently tested on *T. molitor*. The entomopathogenic fungi found are compared with *Beauveria pseudobassiana*. When compared with *Beauveria pseudobassiana*, native endophyte fungi found causes 100% mortality on *T. molitor*, with a little higher efficacy *Beauveria pseudobassiana* has a TL50 of 8 days with the same mortality rate. These findings suggest that native endophytic fungi could be an alternative to control potential pests within the framework of Integrated Pest Management (IPM).

Keywords: biological control, indigenous fungi, mealworm, mycoinsecticides.

1. Introducción

Los hongos entomopatógenos (HE) constituyen el mayor grupo conocido de patógenos de insectos (Vega *et al.*, 2012). Los hongos que infectan insectos están presentes en la naturaleza y su aplicación ha demostrado ser una estrategia válida para reducir las poblaciones de insectos dañinos en los ecosistemas forestales (Lacey *et al.*, 2015). Estos hongos se han utilizado ampliamente para controlar varias especies de plagas de insectos tanto en invernaderos como en campo abierto en numerosos países (Bamisile *et al.*, 2021). Por ejemplo, a nivel forestal, el hongo *Entomophaga maimaiga* Humber, Shimazu & Soper (Entomophthoromycota: Entomophthorales) se ha introducido en EE.UU. para controlar con éxito *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Erebidae) (Hajek *et al.*, 1996). El hongo *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch se ha aplicado contra el escarabajo *Melolontha melolontha* L. (Lacey 2017).

Los HE nativos pueden servir como bioinsecticidas eficaces. Las cepas nativas de HE son hongos que han coevolucionado con sus insectos hospedadores y las condiciones ambientales locales (Picciotti *et al.*, 2023). Mann y Davis (2021) identificaron la temperatura, la exposición a la luz ultravioleta, la competencia con otros microorganismos y los metabolitos secundarios de las plantas como los principales factores que pueden inhibir o promover la patogenicidad fúngica aplicada al control de escarabajos de la corteza por HE. Además, los hongos nativos pueden ser más adaptables a las condiciones ambientales locales. Por ejemplo, Alali et al. (2019) encontraron que *B. bassiana* (Bals. - Criv.) Vuill recolectado en las zonas más cálidas son los más tolerantes en términos de crecimiento, esporulación y germinación a altas temperaturas. Lovett y Leger (2018) demostraron que el cultivo continuo de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin a altas temperaturas aumenta su tasa de crecimiento en estas condiciones.

Numerosos estudios han demostrado que el rango de hospedadores de los HE puede extenderse más allá de los insectos. Varios tienen la capacidad de crecer dentro de las plantas como endófitos, por ejemplo, los hongos *B. bassiana*, *Lecanicillium* spp, *M. anisopliae* y *Trichoderma harzianum* Rifai han sido reportados como endófitos de plantas, no solo en cultivos herbáceos (Vega *et al.*, 2012; Gurr *et al.*, 2018; Jaber y Ownley 2018) sino también en especies forestales como *Pinus radiata* D.Don (Reay *et al.*, 2010) y *Pinus monticola* Douglas ex D.Don (Ganley y Newcombe 2006). Los HE también pueden desempeñar un papel importante en la reducción de la herbivoría cuando se comportan como endófitos tras su colonización de las plantas (Jaber y Ownley 2018).

El insecto *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae es un insecto susceptible a los microorganismos entomopatógenos (Lacey y Kaya 2007). Se cría fácilmente en grandes cantidades con controles sencillos de población y edad. Numerosos estudios lo utilizan como insecto modelo para confirmar la patogenicidad de los hongos (Reay *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2018; Maistrou *et al.*, 2018; Karaborklu *et al.*, 2019; Bamisile *et al.*, 2021; Eski y Murat Gezgin 2022; Shin *et al.*, 2022).

El objetivo de este estudio fue la búsqueda de HE endófitos nativos en especies forestales mediterráneas (*Quercus ilex*, *Q. suber*, *Q. pyrenaica* y Castanea sativa Mill.) que pudieran ser utilizados para el control de sus especies plaga. Se realiza-

ron ensayos de patogenicidad en el insecto modelo *T. molitor* y se compararon con el efecto de *Beauveria pseudobassiana* (Bpseu) Rehner y Humber.

2. Materiales y métodos

Aislamiento de hongos de tejidos vegetales

Se tomaron muestras de madera, ramillos y hojas de dos especies caducifolias y dos no caducifolias de cuatro zonas de la provincia de Salamanca (este de España). Las especies seleccionadas fueron *Quercus suber* (Valdelosa), *Q. pyrenaica* (Cubo de Don Sancho), *Q. ilex* (La Alamedilla) y *Castanea sativa* (Linares de Riofrío). Se muestrearon 30 árboles de cada zona.

Los hongos se aislaron de los tejidos vegetales siguiendo a Inglis *et al.*, (2012). Los fragmentos se esterilizaron y se cultivaron en un medio general de agar papa dextrosa (PDA) con antibióticos (estreptomicina (0,100 g/L) y ampicilina (0,050 g/L)). Las placas se incubaron a 23 °C.

A medida que los diferentes hongos emergían de los tejidos esterilizados, se aislaron en placas individuales y se seleccionaron los que produjeron esporulación en PDA para utilizarlos en las pruebas de patogenicidad.

Cría en laboratorio de T. molitor

Se estableció una población viable de *T. molitor* en el laboratorio del Grupo de Patología Forestal del Campus de La Yutera, Palencia, Universidad de Valladolid. Los ejemplares iniciales fueron adquiridos localmente y reproducidos en condiciones de laboratorio. La colonia se mantuvo y propagó en bandejas en una cámara de crecimiento a 27 ± 1 °C, 70 ± 5 % de humedad relativa y fotoperiodo de 16:8 horas (luz: oscuridad) con alimentación de salvado de trigo y PDA cada dos días como fuente de agua (Deruytter *et al.*, 2021).

Prueba de supervivencia en T. molitor

Las pruebas de patogenicidad se realizaron en escarabajos *T. molitor*, que son susceptibles a los microorganismos entomopatógenos y fáciles de manipular para bioensayos con insectos (Kim *et al.*, 2019; Shin *et al.*, 2022). Se utilizaron 111 aislados de hongos esporulantes para las pruebas.

La actividad entomopatógena se evaluó siguiendo la metodología descrita por Güerri-Agulló *et al.* (2010) con pequeñas modificaciones. Se colocaron adultos de *T. molitor* (10-15 días de edad) por parejas en placas de Petri de 5,5 cm de diámetro que contenían un cultivo de los hongos a probar. Se utilizaron diez insectos por hongo. Los hongos tenían entre 12 y 20 días, habían crecido en PDA y habían esporulado. El control consistió en insectos en placas Petri con sólo PDA. Se dejó que los insectos se movieran libremente en la placa durante 10 minutos, con dos agitaciones manuales de 5 segundos, y luego se colocaron en placas Petri de 11 cm de diá-

metro con fondos de papel de filtro húmedo que actuaron como cámaras de humedad a 23 °C durante 12 horas. A continuación, los insectos se transfirieron a placas individuales con salvado de trigo esterilizado como alimento y un lecho de papel de filtro autolavado *(Fig. 1)*. Cada dos días se proporcionó un trozo de PDA autoclavado (0,3 cm^3) como fuente de agua, tal como sugieren Deruytter *et al.* (2021). La mortalidad se comprobó diariamente. Tras la muerte del insecto, los hongos entomopatógenos se reaislaron en PDA.

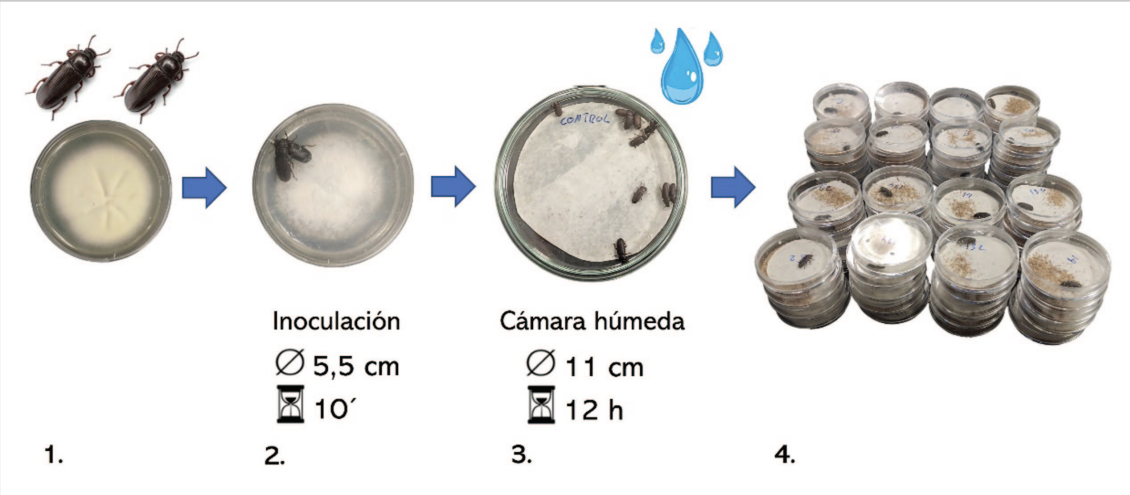

Figura 1. Inoculación por contacto directo: 1. Hongos esporulados de 12-20 días de edad y dos individuos de *T. molitor* por placa (10 por hongo). 2. 10 minutos con los insectos caminando sobre la placa (dos sacudidas manuales). 3. Cámara húmeda durante 12 horas con los 10 *T. molitor* juntos. 4. Placas Petri individuales con salvado de trigo esterilizado como alimento y un lecho de papel de filtro autolavado.

Los hongos nativos se compararon con el efecto entomopatógeno causado por *Beauveria pseudobassiana*.

Identificación de los hongos

Los hongos que obtuvieron mejores resultados en la prueba de patogenicidad se identificaron mediante secuenciación de su región del espaciador transcrito interno ribosómico (ITS). Se realizó una extracción de ADN y se secuenció. Las secuencias se compararon mediante BLAST con la base de datos nr/nt del NCBI.

Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron en programación R (R Core Team 2022). El tiempo letal medio (TL50) se estimó como el número de días en los que la mitad de los insectos habían muerto. Los intervalos de confianza se estimaron mediante transformación logarítmica. Las diferencias se declararon significativas para p-valores corregidos $< 0,05$

3. Resultados

Endófitos con actividad entomopatógena

Se obtuvieron un total de 1173 aislados individuales en placas de PDA. De ellos, 111 produjeron esporulación en PDA. Tres de los 111 (2,7 %) hongos esporulantes aislados de muestras vegetales causaron mortalidad en *T. molitor (Fig. 2)*. Cada aislado pertenecía a una especie diferente de *Quercus (Tabla 1)*. Los tres fueron identificados como *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann) Zare & Gama tras la secuenciación ITS. No se aisló ningún HE de Castanea sativa.



Figura 2. Tenebrios siendo inoculados en placa. El hongo de la izquierda se corresponde con *Beauveria pseudobassiana* y el de la derecha con una de las cepas nativas entomopatógenas aisladas.

Tabla 1. Ubicación y tejido de origen de cada HE aislado.

Código	Especie huésped	Tejido	Identidad
G-151	*Quercus suber*	Madera	*Lecanicillium lecanii*
CDS-E1	*Quercus pyrenaica*	Hoja	*Lecanicillium lecanii*
G-12	*Quercus ilex*	Hoja	*Lecanicillium lecanii*

Comparación entre los HE aislados y Beauveria pseudobassiana (Bpseu).

Las comparaciones en la mortalidad de los 10 individuos de *T.molitor* inoculados con cada uno de los diferentes hongos entomopatógenos encontrados y respecto a *Beauveria pseudobassiana* (Bpseu) se muestran en la *Fig. 3*. No se murió ningún individuo del grupo control durante los 35 días que duro el experimento.

Los tres aislados de campo de *L. lecanii* redujeron la supervivencia de *T. moli-*

tor en comparación con el control *(Fig. 3)*. El TL50 fue de 14 días tanto para G-12 como para G-151, alcanzando el 100 % de mortalidad a los 34 días del ensayo. El TL50 fue de 16 días para CDS E1, muriendo el 90 % de los insectos a los 16 días y sobreviviendo el 10 % al final del experimento. No se encontraron diferencias estadísticas entre los efectos de los tres aislados de *L. Lecanii*. *B. pseudobassiana* presentó tasas de mortalidad más rápidas que los aislados de *L. lecanii* con un TL50 de 8 días *(Fig. 3)*.

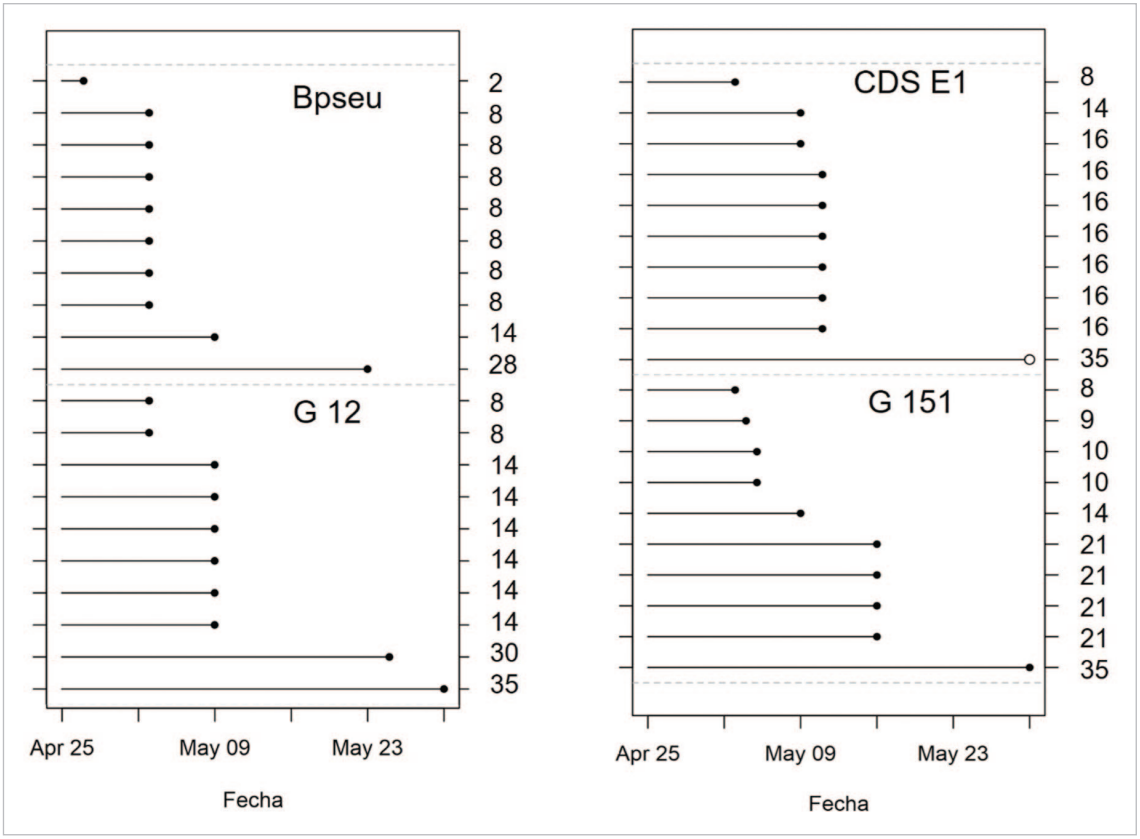

Figura 3. Comparación de supervivencia por pares entre el control, los aislados de campo y *Beauveria pseudobassiana* (Bpseu). Los puntos negros muestran el día en el que murió el insecto en cuestión. Los insectos que no murieron al final del experimento se reflejan con un punto relleno de blanco. El eje vertical son los días hasta la muerte del individuo. El eje horizontal es la fecha en la que se produjo la muerte. Glicerol 12: *L. lecanii* aislado de *Q. ilex*, Glicerol 151: *L. lecanii* aislado de *Q. suber*, CDS E1: *L. lecanii* aislado de *Q. pyrenaica*.

4. Discusión

El hongo *Lecanicillium lecanii* se encontró como endófito en hojas de *Q. pyrenaica* y *Q. ilex* y en madera de *Q. suber*. Otros estudios muestran la presencia de *L. lecanii* como hongo endófito en tejidos de otras especies, principalmente cultivos, en contextos silvestres (Nicoletti y Becchimanzi 2020) y en bosques (Jaber y Ownley 2018). Del género *Lecanicillium*, también se ha encontrado *L. muscarius* como

endófito sobre *Q. robur* (Nicoletti y Becchimanzi, 2020). *L. lecanii* parece ser un endófito común en una amplia variedad de plantas.

La cepa con mayor mortalidad en el menor periodo de tiempo fue *Beauveria pseudobassiana*, con un TL50 de 8 días, frente a los aislados de *Lecanicillium Lecanii* que presentaron un TL50 de 14-16 días. Los aislados de *L. lecanii* tardaron más en hacer efecto y permitieron que el insecto sobreviviera más tiempo antes de causarle la muerte. Este mayor tiempo necesario para causar mortalidad podría ser de interés para combatir aquellos insectos que presentan patrones de comportamiento de agregación. Estos patrones podrían permitir la transmisión horizontal, en la que los individuos susceptibles se encuentran con la siguiente generación del hongo producida en los cadáveres micóticos. Cheraghi *et al.* (2012) descubrieron que el comportamiento social de la termita *Microcerotermes diversus* Silvestri (Termitidae), como el acicalamiento, puede ser eficaz para promover brotes epizoóticos en una colonia. Lerche *et al.* (2004) informaron de que la densidad de población del trips occidental de las flores (*Frankliniella occidentalis* Pergande) influía en la diseminación de esporas fúngicas de *L. lecanii*.

L. Lecanii, como parte de la comunidad de hongos endófitos de *Q. ilex*, *Q. pyrenaica* y *Q. suber*, podría utilizarse para el control de sus plagas. El microbioma presente de forma natural en los árboles o su inoculación y establecimiento como endófito podría ayudar a controlar especies plaga. Gómez-Vidal *et al.* (2006) mostraron cómo hongos entomopatógenos colonizaban los tejidos de la palmera datilera después de ser herida en el pecíolo al ser tratados con *Beauveria bassiana* y *Lecanicillium dimorphum* (J.D. Chen) Zare & W. Gams. Shin *et al.* (2022) informaron de que los hongos entomopatógenos (*B. bassiana*) inyectados en palmeras mostraban actividad insecticida y sobrevivían en el árbol durante al menos un mes. La forma de actuar del hongo endofítico entomopatógeno parece implicar la producción de sustancias químicas perjudiciales para los insectos herbívoros (Vega *et al.*, 2008; Cory y Ericsson 2010). Cory y Ericsson (2010) proponen que los hongos entomopatógenos con rangos de hospedadores relativamente amplios deberían ser los candidatos más adecuados para convertirse en guardianes del hospedador. La integración de estos hongos en los programas de MIP requiere una comprensión detallada de sus interacciones con otros métodos de control biológico y su impacto a largo plazo en las comunidades microbianas y de insectos.

La metodología de este estudio podría utilizarse para buscar HE endófitos y agilizar su evaluación sin necesidad de identificación previa. Kim *et al.* (2018) y Eski y Murat Gezgin (2022) también utilizaron *T. molitor* para aislar hongos entomopatógenos de muestras de suelo. Criaron a los insectos sobre el suelo donde potencialmente podrían estar los HE y aislaron los hongos de los insectos muertos. Normalmente, la búsqueda de HE endofíticos se realiza mediante identificación morfológica y/o molecular (Bamisile *et al.*, 2021; Jamunarani *et al.*, 2022). Este estudio describe una metodología que podría simplificar este proceso y ahorrar recursos mediante el uso de *T. molitor*.

Son necesarias investigaciones futuras para aclarar la función específica de *L. lecanii* en los tejidos del hospedador y su potencial como mecanismo de defensa contra las plagas de insectos. La metodología de este estudio acelera la identifica-

ción de hongos entomopatógenos y propone al insecto *T. molitor* como insecto modelo para evaluar la patogenicidad de aislados de hongos endófitos.

6. Financiación

Este trabajo fue apoyado por el proyecto LIFE MYCORESTORE «Uso innovador de los recursos micológicos para bosques mediterráneos resilientes y productivos amenazados por el cambio climático, LIFE18 CCA/ES/001110», y los proyectos VA178P23 y VA208P20 financiados por la JCYL (España), ambos cofinanciados por el presupuesto FEDER (UE).

7. Bibliografía

Alali, S.; Mereghetti, V.; Faoro, F.; Bocchi, S.; Azmeh, F.A.; Montagna, M.; 2019. Thermotolerant isolates of Beauveria bassiana as potential control agent of insect pest in subtropical climates. PLoS ONE 14(2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211457

Bamisile; B.S.; Siddiqui, J.A.; Akutse, K.S.; Aguila, L.C.R.; Xu, Y.; 2021. General limitations to endophytic entomopathogenic fungi use as plant growth promoters, pests and pathogens biocontrol agents. *Plants* 10(10) https://doi.org/10.3390/plants10102119

Cheraghi, A.; Habibpour, B.; Mossadegh, M.; Sharififard, M.; 2012. Horizontal transmission of the entomopathogen fungus metarhizium anisopliae in microcerotermes diversus groups. *Insects* 3(3): 709–718. https://doi.org/10.3390/insects3030709

Cory, J.S.; Ericsson, J.D.; 2010. Fungal entomopathogens in a tritrophic context. *BioControl*. 55(1), 75–88. https://doi.org/10.1007/s10526-009-9247-4

Deruytter, D.; Coudron, C.L.; Claeys, J.; 2021. The influence of wet feed distribution on the density, growth rate and growth variability of *Tenebrio molitor*. *Journal of Insects as Food and Feed* 7(2), 141–149. https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0049

Eski, A.; Murat Gezgin, M.; 2022. Susceptibility of different life stages of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to indigenous entomopathogenic fungi. *Journal of Stored Products Research* 98. https://doi.org/10.1016/j.jspr.2022.102008

Ganley, R.J.; Newcombe, G.; 2006. Fungal endophytes in seeds and needles of Pinus monticola. *Mycological Research*. 110(3), 318–327. https://doi.org/10.1016/j.mycres.2005.10.005

Gardes, M.; Bruns, T.D.; 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*. 2(2), 113–118. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x

Gómez-Vidal, S.; Lopez-Llorca, L.V.; Jansson, H.B.; Salinas, J.; 2006. Endophytic colonization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves by entomopathogenic fungi. *Micron*. 37(7), 624–632. https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.02.003

Güerri-Agulló, B.; Gómez-Vidal, S.; Asensio, L.; Barranco, P.; Lopez-Llorca, L.V.; 2010. Infection of the Red Palm Weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*) by the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana: A SEM study. Microscopy Research and Technique. 73(7), 714–725. https://doi.org/10.1002/jemt.20812

Hajek, A.E.; Elkinton, J.S.; Witcosky, J.J.; 1996. Introduction and spread of the fungal pathogen Entomophaga maimaiga (Zygomycetes: Entomophthorales) along the leading edge of gypsy

moth (Lepidoptera: Lymantriidae) spread. *Environmental Entomology*. 25(5), 1235–1247. https://doi.org/10.1093/ee/25.5.1235

Inglis, G.D.; Enkerli, J.; Goettel M.S.; 2012. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. Manual of Techniques in Invertebrate *Pathology* 189–253. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2.00007-5

Jabe, L.R.; Ownley, B.H.; 2018. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biological Control* 116, 36–45. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.018

Jamunarani, G.S.; Ramanagouda, S.H.; Venkateshalu, B.; Jayappa, J.; Raghavendra, G.; Rudresh, D.L.; Kulkarni, M.S.; Mahantesha, B.N.N.; Gopali, J.B.; 2022. Isolation and evaluation of indigenous endophytic entomopathogenic fungus, Beauveria bassiana UHSB-END1 (Hypocreales: Cordycipitaceae), against Spodoptera litura Fabricius. Egyptian Journal of Biological Pest Control 32(1). https://doi.org/10.1186/s41938-022-00617-4

Karaborklu, S.; Altin, N.; Karabörklü, S.; Keskin, Y.; 2019. Native Entomopathogenic Fungi Isolated from Duzce, Turkey and their Virulence on the Mealworm Beetle [*Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae)] Native Entomopathogenic Fungi Isolated from Duzce, Turkey and their Virulence on the Mealworm Beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). Philippine Agricultural Scientist 102, 82–89. https://www.researchgate.net/publication/333447762

Kim, J.C.; Lee, M.R.; Kim, S.; Lee, S.J.; Park, S.E.; Baek, S.; Gasmi, L.; Shin, T.Y.; Kim, J.S.; 2019 Long-term storage stability of Beauveria bassiana ERL836 granules as fungal biopesticide. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 22(2), 537–542. https://doi.org/10.1016/j.aspen.2019.04.001

Kim, J.C.; Lee, M.R.; Kim, S.; Lee, S.J.; Park, S.E.; Nai, Y.S.; Lee, G.S.; Shin, T.Y.; Kim, J.S.; 2018. Tenebrio molitor-mediated entomopathogenic fungal library construction for pest management. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 21(1), 196–204. https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.11.018

Lacey, L.A. (2017) Microbial control of insect and mite pests: from theory to practice (Lawrence A. Lacey, Ed.) Elsevier.

Lacey, L.A.; Grzywacz, D.; Shapiro-Ilan, D.I.; Frutos, R.; Brownbridge, M.; Goettel, M.S.; 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology* 132, 1–41. https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009

Lacey, L.A.; Kaya, H.K.; (2007) Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Springer. https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-1-4020-5933-9.pdf

Lerche, S.; Meyer, U.; Sermann, H.; Buettner, C.; 2004. Dissemination of the entomopathogenic fungus verticillium lecanii (Zimmermann) Viégas (Hyphomycetales: Moniliaceae) in a population of Frankliniella occidentalis (Pergande, 1895) (Thysanoptera: Thripidae). Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences 69(3), 195–200.

Lovett, B.; St. Leger, R.J.; 2018. Genetically engineering better fungal biopesticides. Pest Management Science 74(4),781–789 https://doi.org/10.1002/ps.4734

Maistrou, S.; Paris, V.; Jensen, A.B.; Rolff, J.; Meyling, N.V.; Zanchi C.; 2018. A constitutively expressed antifungal peptide protects Tenebrio molitor during a natural infection by the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana. Developmental and Comparative Immunology 86, 26–33. https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.04.015

Mann, A.J.; Davis, T.S.; 2021, Entomopathogenic fungi to control bark beetles: a review of ecological recommendations. *Pest Management Science* 77(9), 3841–3846. https://doi.org/10.1002/ps.6364

Nicoletti, R.; Becchimanzi, A.; 2020. Endophytism of lecanicillium and akanthomyces. Agriculture (Switzerland) 10(6) MDPI AG. https://doi.org/10.3390/agriculture10060205

Picciotti, U.; Araujo Dalbon, V.; Ciancio, A.; Colagiero, M.; Cozzi, G.; De Bellis, L.; Finetti-Sialer, M.M.; Greco, D.; Ippolito, A.; Lahbib, N.; Logrieco, A.F.; López-Llorca, L.V.; Lopez-Moya, F.; Luvisi, A.; Mincuzzi, A.; Molina-Acevedo, J.P.; Pazzani, C.; Scortichini, M.; Scrascia, M.; Porcelli, F.; 2023. "Ectomosphere": Insects and Microorganism Interactions. Microorganisms 11(2) https://doi.org/10.3390/microorganisms11020440

R Core Team. 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. https://www.R-project.org/

Reay, S.D.; Brownbridge, M.; Gicquel, B.; Cummings, N.J.; Nelson, T.L.; 2010. Isolation and characterization of endophytic *Beauveria* spp. (Ascomycota: Hypocreales) from *Pinus radiata* in New Zealand forests. *Biological Control* 54(1), 52–60. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.03.002

Shin, T.Y.; Lee, M.R.; Kim, J.C.; Nai, Y.S.; Kim, J.S.; 2022. A new strategy using entomopathogenic fungi for the control of tree borer insects. *Entomological Research* 52(7), 327–333. https://doi.org/10.1111/1748-5967.12605

Vega, F.E.; Meyling, N.V.; Luangsa-ard, J.J.; Blackwell, M.; 2012. Fungal Entomopathogens. Insect Pathology, Second Edition 171–220. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384984-7.00006-3

Vega, F.E.; Posada, F.; Catherine Aime, M.; Pava-Ripoll, M.; Infante, F.; Rehner, S.A.; 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control* 46(1), 72–82. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.008

White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J.; 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. Pcr protocols 315–322. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1

Wraight, S.P.; Carruthers, R.I.; 1999. Production, Delivery, and Use of Mycoinsecticides for Control of Insect Pests on Field Crops. *Biopesticides* 233–270. https://doi.org/10.1385/0-89603-515-8:233